

論文内容の要旨

論文題目 表在性膀胱がんに対する膀胱内注入核酸治療 及び表在性膀胱がん特異的抗体スクリーニング

氏名 藤澤 優

序論

1. 表在性膀胱がん

膀胱がんは膀胱内に発生する腫瘍であり、腫瘍が粘膜層に存在する表在性膀胱がん、腫瘍が筋層にまで達した浸潤性膀胱がんに大別される。初期診断の内、70 から 80%の患者は表在性膀胱がんと診断されており、膀胱がんの治療は表在性膀胱がんに対するものが主となっている。現在、表在性膀胱がんに対する治療方法は、尿道にカテーテルを挿入して施術する経尿道的切除術に加え、切除術後の再発を防止する目的で抗がん剤や Bacillus Calmette-Guerin (BCG)の膀胱内投与が行われる。しかしながら現在の治療法は、膀胱内に残存したがん細胞が原因と考えられる再発が高頻度で起こる事 (*Lancet*, 342: 1087-88, 1993)や、BCG の感染による発熱等の問題点を有している (*BUJ int.*, 88: 209-16, 2001)。また、再発を繰り返す中で浸潤性膀胱がんになった場合や BCG の感染が重症化した場合、患者は膀胱の全摘を余儀なくされるため、Quality of Life (QOL)が著しく低下する。そのため、表在性膀胱がんの再発防止法の開発が望まれている。

2. 核酸治療の現状と small interfering RNA (siRNA)

現在、核酸の全身投与は成功しておらず、現時点では核酸の全身投与は困難である (*J Clin Oncol.*, 24: 1428-34, 2006)。そのため、現在の技術水準においては核酸の局所投与によって核酸療法の可否を判断すべきである。その観点からすると膀胱は体外からのアクセスが容易な閉鎖的な臓器である。また、高濃度の核酸を膀胱内に注入する事も容易であるため、核酸の局所投与の効果を検討するのに非常に適した臓器である。そこで我々は再発の原因となっている膀胱内に残存するがん細胞に対して、siRNA を導入し、がん遺伝子を抑制する事で再発防止効果を得る事を構想した。siRNA を用いた遺伝子抑制は、アンチセンスによる抑制に比べて強い抑制

効果を持つ事や、ウイルスベクターと異なり反応が一過性である特徴を有するため、患者の経過に合せた処置を施せる点が優れている (Nature, 391: 806-11, 1998)。本研究では新規再発防止法の中で技術的な障壁となる核酸のデリバリー方法の検討を行なう事とした。

3. sonoporation

直径が μm 単位のパブルに対して超音波を照射すると、パブルは超音波に対応して膨張と縮小を繰り返す。その後、パブルが崩壊した際にジェット流が生じ、近傍に存在する細胞の細胞膜に穴を開け、一過性の膜透過性を与える事が出来る (Circulation, 105: 1233-39, 2002)。この手法は sonoporation と呼ばれ、薬剤や plasmid を細胞内に導入する手法として用いられている。sonoporation は従来の物質導入法に比べ手技が簡便で、制御も容易であり、毒性が低い事が特徴である。以上の特徴から、本研究では遺伝子の導入法として sonoporation を採用し、siRNA を用いて表在性膀胱がんの強制発現させたルシフェラーゼを抑制する事を目的とした。

4. 膀胱がんの再発診断法

表在性膀胱がんの患者は切除術後の再発を診断するため、3カ月に一度程度、膀胱鏡を用いた再発診断を行っており、この診断も患者のQOLの低下を招く原因となっている。そのため、表在性膀胱がんの再発治療法に加えて、患者のQOLを低下させない再発診断法を開発する事も研究目的とした。そのため、膀胱がん特異的な抗原を同定し、患者の尿中から膀胱がんを回収し、診断を行える手技の開発を行う事とした。

結果・考察

1. sonoporation

(1) *in vitro* における sonoporation の条件検討

検討に用いる siRNA と同程度の分子量を有する fluorescein isothiocyanate (FITC)-Dextran を用いて sonoporation の条件を決定した。検討の結果、種々の要素の内、超音波の出力強度が最も導入効率に寄与する事が明らかとなった (図 1. A)。加えて、同様の処理を行った細胞の生存率を WST-8 法により検討した。超音波の出力を上昇させるにしたがい、殺細胞効果が上昇する事が明らかとなった (図 1. B)。上記と同様の方法により種々の要素の検討を行った結果、bubble liposome 濃度が 0.2mg/ml, 超音波の照射強度 $1\text{W}/\text{cm}^2$, 超音波の出力時間 10 秒, bubble liposome 添加後 30 秒という超音波照射の至適条件を決定した。上記方法で決定した sonoporation の条件と Luciferase-siRNA を用いて、RT-112^{Luc} のルシフェラーゼの抑制効果を検討した。処理後、24 時間後では有意な抑制効果は確認されないものの、48 時間後には他の 2 群に比べて有意な抑制効果が確認された (図 1. C)。

sonoporation はジェット流を用いて細胞膜の透過性を亢進させるため、超音波の強い出力や高濃度の bubble liposome などの過度の条件下では不可逆的な膜透過を招き、遺伝子抑制以外の操

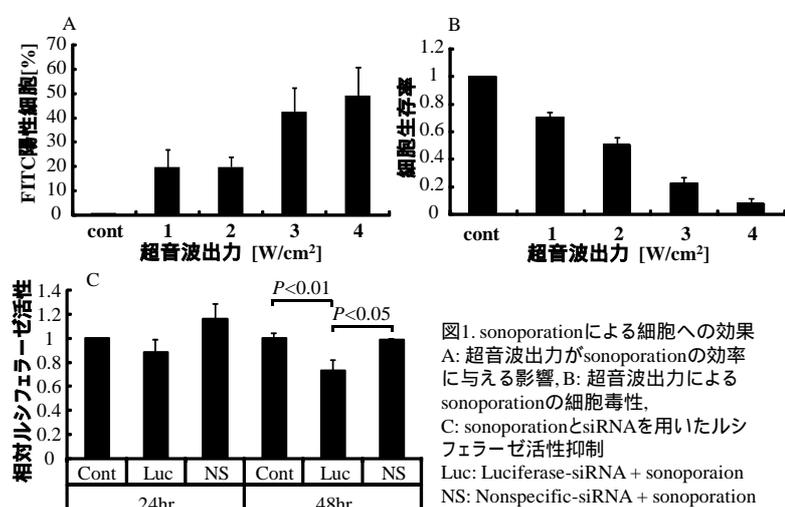


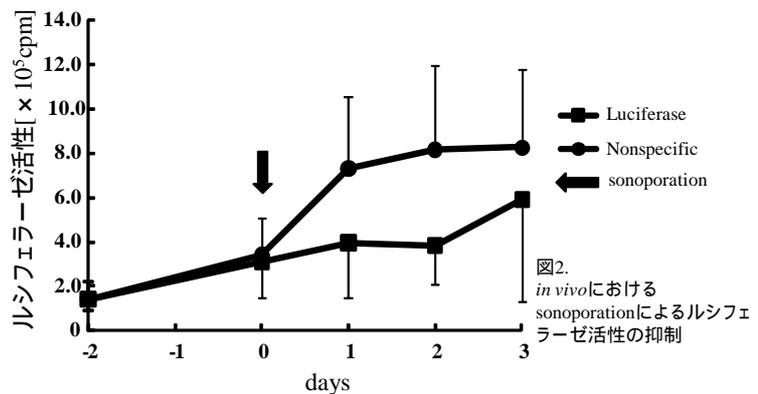
図1. sonoporationによる細胞への効果
A: 超音波出力がsonoporationの効率に与える影響, B: 超音波出力によるsonoporationの細胞毒性,
C: sonoporationとsiRNAを用いたルシフェラーゼ活性抑制
Luc: Luciferase-siRNA + sonoporation
NS: Nonspecific-siRNA + sonoporation

作そのものによる細胞障害が高まると考えられる。本研究において決定した遺伝子抑制以外で細胞障害のない条件下での sonoporation と siRNA を用いた遺伝子抑制においては、処理後 48 時間後から安定的な抑制効果が得られる事が示唆された。

(2) *in vivo* におけるルシフェラーゼ活性抑制検討

RT-112^{Luc} を BALB-c nu/nu マウスの左背に移入し、sonoporation の処理 2 日前と処理日に photon imager を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。測定後、マウスを 2 群に分けて sonoporation 処理+Luciferase-siRNA 群と sonoporation 処理+Nonspecific-siRNA 群とした。各々の群に bubble liposome と siRNA の混合液を皮下腫瘍に直接注射し、経皮的に超音波を照射した。sonoporation の条件は *in vitro* で決定したものと同様の条件で行った。sonoporation 処理後、1 日毎に 3 日間、ルシフェラーゼ活性を測定した。処理を行っていない処理 2 日前と処理日においては両群の活性値は同程度であったが、処理後 1 日後から両群の差が開き、処理後 2 日後に両群の差は最大となった (図 2)。 *in vitro* においてはルシフェラーゼ活性の抑制が確認されたが (図 1. C)、 *in vivo* においては有意な抑制効果は確認されなかった (図 2)。

これは *in vivo* と *in vitro* において、膜透過性の亢進に最適な超音波や bubble liposome の条件などが異なるためだと考えられる。そのため、 *in vivo* での実験系により適した超音波の照射を行い、sonoporation の効率の向上させる事が必須である。また、処理後 3 日から両群の差が減少し始めた事は、先行論文とも一致している (*Oral Dis.*, 15: 505-11, 2009)。これは細胞質内の siRNA が RNase により分解された事や、細胞分裂により細胞質内の siRNA が希釈された事が原因であると考えられる。本検討から、ウイルスベクターと比較して効果が一過性である siRNA を用いて、持続的な遺伝子抑制効果を得るためには、単回処理ではなく複数回の処理が必要である事が示唆された。



2. 臨床検体における膀胱がん特異的抗原の探索

候補抗体を用いて臨床検体の免疫染色を行った結果、8種類の抗体が膀胱上皮と膀胱がんの双方を特異的に染色する事が出来た(図 3)。

本検討では膀胱がん特異的抗原を同定出来なかったものの、膀胱上皮と膀胱がん双方に結合する抗体を得られた。この抗体の応用が可能な技術として、当研究室では抗体と磁性ビーズを用いた細胞の回収方法を開発している (*Gastroenterology*, 129(6): 1918-27, 2005)。これによって、抗体を用いて

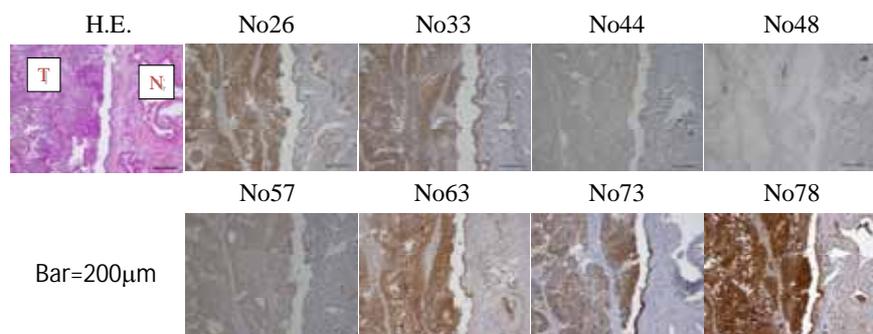


図 3. 臨床検体の免疫染色
腫瘍部分と上皮細胞が染色された抗体を示した。N: 正常組織, T: 腫瘍組織

尿中から膀胱上皮及び膀胱がん細胞を選択的に回収し、細胞診断や遺伝子診断等が可能になると考えられる。本検討から尿を用いた膀胱がんの再発診断法の可能性が示唆された。

3. *in vivo* における効率向上のための検討及び同所移植マウスの確立

(1) 照射強度及び siRNA の投与スケジュールの検討

in vitro の検討において、高い出力の超音波が sonoporation 効率の向上に寄与していた一方で、細胞障害も強かったことから、がん細胞に加えて正常細胞に与える影響も無視できないと判断したため、*in vivo* における副作用について検討を行った。BALB-c nu/nu マウスの皮下に、bubble liposome を注射し、1, 2, 3 または 4 W/cm² の超音波を照射した。同様の処理を 2 日毎に 3 回処理した後、3 回目の処理から 24 時間後に皮膚を回収し、組織学的な評価を行った。3 または 4 W/cm² で処理を行ったマウスでは、好中球の小浸潤が確認されたが(図 4. arrow)、その他の重篤な副作用は確認されなかった。

本検討により、*in vivo* においては 4 W/cm² での処理が可能である事が明らかとなった。そのため、高い

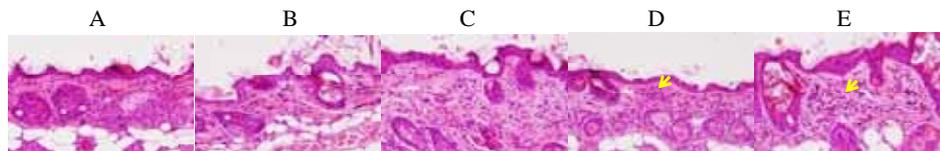


図4. sonoporationによる皮膚への副作用
A: control, B: 1W/cm², C: 2W/cm², D: 3W/cm², E: 4W/cm², arrow: 好中球の浸潤 (original magnification × 20)

出力の超音波が *in vivo* での導入効率向上に寄与するか否かを検討予定である。また、2 日毎の 3 回処理を行っても、重篤な副作用は確認されなかったため、処理後 3 日目以降に効果が減弱してしまう sonoporation の特徴も、複数回処理によって改善出来る可能性が示唆された。

(2) immuno-bubble liposome の検討

sonoporation はバブルの崩壊時に生じるジェット流により引き起こされる。そのため、バブルと細胞間の距離を近付ける事で sonoporation の効率が向上するか否かを検討した。従来の bubble liposome に、RT-112^{Luc} の膜タンパク質特異抗体を結合させた immuno-liposome を作製した。蛍光標識を施した immuno-liposome を固定した RT-112 細胞と反応させると、細胞の表面に蛍光が確認され、結合する事が確認された。この immuno-liposome を用いた sonoporation を行い、従来の sonoporation と抑制効果を比較した。immuno-bubble liposome を用いた群では、通常の bubble liposome を用いた群に比べ、ルシフェラーゼ活性が有意に抑制された。

懸濁液中において immuno-bubble liposome が RT-112^{Luc} に結合し、両者がより接近したため sonoporation の効率が向上したと考えられた。

結論

in vitro において sonoporation によるルシフェラーゼの有意な抑制効果が確認された。*in vivo* においては sonoporation による有意な抑制効果は確認されなかったが、ルシフェラーゼの抑制傾向が確認された。sonoporation の手技において、超音波の高出力での処理や複数回処理により、作用の増強が期待されるため、正常組織に障害を与えない条件 (4 W/cm², 隔日 3 回) を明らかにした。また、バブルと細胞間の距離を近付ける事で、sonoporation の効率は更に向上する事が示唆されている。今後、各々の手技を *in vivo* での検討に取り入れていく予定である。加えて、本検討では臨床検体において膀胱上皮と膀胱がん双方に結合・染色出来る抗体を同定した。本抗体を用いる事で尿を用いた再発診断が行える可能性があり、immuno-liposome にも応用可能である。本抗体は膀胱がん患者の QOL 向上に大きく貢献する事が出来る。