

22 RNA interference による HPV 陽性子宮頸癌に対する新しい遺伝子標的治療—標的配列部位による増殖抑制効果の差異の検討—

岡山大学

吉野内光夫, 長谷川幸清, 中村圭一郎, 本郷淳司, 児玉順一, 平松祐司

【目的】最近, 標的遺伝子の発現を阻害する方法として RNA interference (RNAi) が発見され, 哺乳動物細胞での遺伝子発現抑制の成功が報告された. 我々は昨年, HPV16-E6に相補的な21塩基二重鎖 RNA (siRNA) を合成し HPV16型陽性子宮頸癌細胞株 SiHa 細胞に導入して, その増殖を in vitro, in vivo ともにきわめて効果的に抑制することに成功した. 今回は, HPV18型陽性子宮頸癌細胞株 HeLa および SW756を対象に18-E6を標的とした siRNA を2種類作製し, その生物学的効果を比較解析した. 【方法】Ex-E6 siRNA (Ex) を18-E6 exon 上に, Sp-E6 siRNA (Sp) を E6 splicing donor site 上に配置して, E6/E6*/E7 mRNA レベルを RT-PCR で, E7/p53/Rb の発現を immunoblots で解析した. また, 細胞増殖抑制効果を足場依存性および足場非依存性増殖とで検討した. 【成績】Ex は E6/E6*/E7 mRNA を低下させ Rb の低リン酸化型を誘導した. 一方, Sp は E6/E7 mRNA を低下させたが, E6*mRNA には影響せず, P53をより強力に増加させた. Ex, Sp2種の siRNA は HPV18型陽性細胞の足場依存性増殖をそれぞれ30-33%および5-10%に, 足場非依存性増殖を12-44%および1-11%に抑制した. 【結論】以上から, RNAi は HPV 陽性子宮頸癌に対する新たな治療戦略として期待しうると考えられるが, 標的配列部位によりその効果が異なる可能性があり, 臨床応用を行う前にもっとも効果的な標的配列部位を決定することが重要である. 現在2種の siRNA について apoptosis 誘導効果の解析をおこなっており, この結果も併せて報告する予定である.

23 チロシンキナーゼ阻害剤 SU6668経口投与による, 腹膜播種を標的とした卵巣癌分子標的治療

自治医大¹, 自治医大大宮医療センター²町田静生¹, 嵯峨 泰¹, 鈴木 泉¹, 竹井裕二¹, 高野貴弘¹, 和田智明¹, 大和田倫孝¹, 今野 良², 鈴木光明¹

【目的】分子標的薬剤のひとつである SU6668は vascular endothelial growth factor (VEGF) をはじめとした血管新生因子の受容体のチロシンキナーゼのリン酸化を阻害し, 血管新生を抑制する作用があるとされている. 現在, 固形癌を対象に臨床第 I 相試験が終了している. マウス卵巣癌腹膜播種モデルにおいて, SU6668経口投与が腹膜播種を標的とした卵巣癌分子標的治療に有用かどうかを検討した. 【方法】顕著な腹膜播種能を有する卵巣漿液性腺癌細胞 SHIN-3 (VEGF 高発現) および KOC-2S (VEGF 低発現) の2株を用いた. ノードマウスに細胞を 5×10^6 腹注し, 腹水産生, 腹膜播種, 生存期間について SU6668 投与群 (400mg/kg, 7-28日連続経口投与) とコントロール群で比較した. in vitro の細胞増殖も検討した. 【成績】1. SHIN-3接種マウスにおける SU6668投与群では腹水産生量は 0.1 ± 0.1 ml とコントロール (3.1 ± 2.3) に比べ有意に抑制され ($p = 0.02$), 腹膜播種 (腸管重量) も有意に抑制され (2.1 ± 0.4 g vs 6.1 ± 1.7 , $p = 0.002$), また生存期間にも延長がみられた (58.1 ± 11.2 日 vs 34.5 ± 8.8 , $P = 0.002$). 2. KOC-2S 接種マウスにおける SU6668投与群では腹水量 (0.2 ± 0.2 vs 0.9 ± 0.8 , $p = 0.03$), 腹膜播種 (2.9 ± 0.4 vs 3.5 ± 0.6 , $p = 0.04$) が有意に抑制され, 生存期間の延長もみられた (16.6 ± 1.7 vs 11.0 ± 0.7 , $P = 0.008$). 3. in vitro における細胞増殖は両株ともに影響を受けなかった. 【結論】分子標的薬剤 SU6668は, VEGF を中心とした血管新生因子の作用を抑制することにより卵巣癌腹膜播種を抑制すると考えられた. 当薬剤の経口投与による, 腹膜播種を標的とした卵巣癌分子標的治療の可能性が示唆された.

24 Interleukin-10 (IL-10) 発現アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる卵巣癌遺伝子治療に関する基礎的研究

自治医大¹, 自治医大大宮医療センター²高野貴弘¹, 嵯峨 泰¹, 竹井裕二¹, 和田智明¹, 鈴木 泉¹, 高橋佳容子¹, 高橋寿々代¹, 大和田倫孝¹, 鈴木光明¹

【目的】免疫抑制性サイトカイン IL-10は VEGF を介した血管新生抑制作用を有し, 卵巣癌の腹膜播種を制御することを報告した. AAV ベクターは正常細胞にも導入可能で, 全身的に長期間の発現が期待できる. IL-10遺伝子発現 AAV ベクターによる卵巣癌腹膜播種を標的とした遺伝子治療を目指し, 基礎的研究を行った. 【方法】造腫瘍能, 腹膜播種能を有し, 顕著な VEGF 産生能を有する漿液性腺癌細胞 SHIN-3を用いた. in vitro の実験では, IL-10遺伝子導入細胞 (SHIN-3/IL-10) の培養上清中の VEGF 濃度を ELSA 法により測定した. in vivo では, アデノウイルスフリーシステムを用いて IL-10発現 AAV ベクター (AAV-IL-10) を作成した. SHIN-3腹膜播種モデルを用い, マウス後脚筋に AAV-IL-10をし, 腹水産生, 腹膜播種を検討した. 血清, 腹水中の IL-10を ELISA 法により測定した. 【成績】SHIN-3/IL-10の培養上清中 VEGF 濃度はコントロールと差がなかった. AAV-IL-10筋注によりマウス血清 IL-10は有意に上昇し, 12週にわたり40倍以上の高値を示した. AAV-IL-10筋注マウスの腹水量, 腹膜播種は有意に減少し ($p < 0.05$), 生存期間も延長した (53.6 ± 11.6 日 vs 30.4 ± 3.2 日, $p < 0.05$). 腹水中 IL-10濃度も血清中と同様, 高値を示した. 【結論】AAV-IL-10の筋注により, 血清及び腹水中に IL-10が分泌され, 腹膜播種の抑制と生存期間の延長が確認された. 尚, IL-10には直接 VEGF の産生は抑制しない. AAV-IL-10による腹膜播種を標的とした遺伝子治療の臨床応用の可能性が示唆された.