

論文内容要旨

Intratracheal Administration of siRNA Dry Powder Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Inhibits Lung Tumor Growth in Mice

(VEGF を標的とする siRNA 粉末製剤の気道投与は、マウスの肺腫瘍増殖を抑制する)

Molecular Therapy - Nucleic Acids, 12:698-706, 2018.

主指導教員：服部 登 教授
(医歯薬保健学研究科 分子内科学)
副指導教員：今泉 和則 教授
(医歯薬保健学研究科 分子細胞情報学)
副指導教員：永田 靖 教授
(医歯薬保健学研究科 放射線腫瘍学)

實綿 慶

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

RNA 干渉とは **small-interfering RNA (siRNA)** によって配列特異的に遺伝子発現が抑制される現象であり、その遺伝子抑制の配列特異性と発現抑制効果の高さから、肺癌を始めとする難治性疾患に対する治療への応用が期待されている。RNA 干渉を利用した治療を臨床応用するには、**siRNA** の標的部位への適切な送達手段が必要であり、呼吸器疾患においては経気道の投与方法が試みられている。現在経気道投与で用いられる吸入用剤は、**pressurized metered dose inhalers (MDIs)**、**nebulizers**、**dry powder inhalers (DPIs)** に分類されているが、なかでも **DPIs** は保存性、携帯性が優れていることなどの利点を有していることから吸入用核酸製剤の剤型として期待されている。**siRNA** の経気道投与により肺腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すことはいくつか報告されているが、投与剤型としては **MDIs** もしくは **nebulizers** であり、**siRNA dry powder** の経気道投与により治療効果を示した報告はない。またその **dry powder** の作成方法として近年 **Spray-Freeze-Drying (SFD)** が注目されており、**SFD** で作成した **dry powder** は多孔性で低密度という特徴を示し、高い分散性を有し肺への優れた到達性を示すことが報告されている。

Vascular endothelial growth factor (VEGF) は血管新生促進因子で癌の進行に強く寄与しており、肺癌に対して抗 **VEGF** 抗体ベバシズマブの有効性が知られている。**VEGF** をターゲットとした **siRNA (VEGF-specific-siRNA; VEGF-siRNA)** の経気道投与は、腫瘍へ効果的に到達することができれば、肺癌に対する有効な治療法となり得ると考えられた。

以上の背景から我々は、**SFD** で作成した **VEGF-siRNA dry powder** の経気道投与により、肺腫瘍における **VEGF** 遺伝子発現の抑制効果および抗腫瘍効果が得られるかどうかを検証することを目的として本研究を行った。

まず、我々が使用した **VEGF-siRNA** による遺伝子抑制効果を確認するために、*in vitro* において2つの癌細胞株 (**B16F10** および **Lewis Lung Carcinoma [LLC]**) に対する **VEGF-siRNA** の投与実験を行った。培養上清中の **VEGF** 蛋白および細胞内の **VEGF mRNA** を測定したところ2つの癌細胞株はいずれも **VEGF** を高発現しており、**VEGF-siRNA** のトランスフェクションによって培養上清中および細胞内の **VEGF** 発現が減少することが明らかとなった。

次に、**VEGF-siRNA dry powder** の生体内での遺伝子抑制効果を検討した。**B16F10**、**LLC** をそれぞれ尾静脈接種し転移性肺腫瘍モデルマウスを作成し、**VEGF-siRNA** を同モデルマウスに単回経気道投与した。**VEGF-siRNA** 治療群では **bronchoalveolar lavage fluid (BALF)** 中の **VEGF** が低下しており、さらに、免疫染色による検討でも腫瘍内の **VEGF** 発現が低下していた。

VEGF-siRNA dry powder の単回経気道投与により肺腫瘍内の **VEGF** をノックダウンできる実験結果を受けて、さらに **VEGF-siRNA dry powder** の複数回経気道投与が肺腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すかどうかを検討した。**B16F10** および **LLC** 肺転移モデルマウスに対して **VEGF-siRNA dry powder** を複数回経気道投与を行ったところ、肺表面転移数が減少し、さらに組織学的な検討において肺腫瘍面積が減少した。

最後に **VEGF-siRNA dry powder** の吸入特性を *in vitro* に検証した。カスケードインパクトを用いた検討において、薬物放出性の指標である **output efficiency** と肺送達性の指標である **fine particle fraction** は優れた数値を示しており、本 **dry powder** をヒトに応用した際にも吸入に適

していると考えられた。

我々は本研究において、SFD で作成した VEGF-siRNA dry powder を転移性肺腫瘍モデルマウスに対して単回気道投与することにより、BALF 中の VEGF が減少し、また腫瘍内における遺伝子抑制効果が得られることを示した。さらに VEGF-siRNA の複数回経気道投与によって、肺転移数および腫瘍面積の減少が得られることを示した。VEGF-siRNA dry powder の経気道投与は、その特異的な遺伝子発現抑制効果の高さから、肺癌に対する有効な治療戦略となる可能性があることが示された。