

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 医学 )	氏名	實綿 慶
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主査	教授	武島 幸男	印
審査委員	教授	杉山 一彦	
審査委員	准教授	宮田 義浩	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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的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。</p> <p>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。</p> <p>以上の背景から著者らは、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。</p> <p>まず、著者らが使用した VEGF-siRNA による遺伝子抑制効果を確認するために、<i>in vitro</i> 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。</p> <p>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。</p> <p>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</p>			

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。

著者らは本研究において、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。

以上の結果から、本論文は、VEGF-siRNA dry powder の経気道投与が肺腫瘍における遺伝子発現を抑制し、また肺腫瘍の増殖を抑制することを証明し、肺癌に対する新たな治療手段を提唱した点で高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が實綿 慶に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	實綿 慶
学位授与の条件	学位規則第4条第1項2項該当		
論文題目	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)		
最終試験担当者	主査 教授 武島 幸男 印 審査委員 教授 杉山 一彦 審査委員 准教授 宮田 義浩		
〔最終試験の結果の要旨〕 <p style="text-align: center;">判定合格</p> 上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年11月1日の第76回広島大学研究科発表会（医学）及び平成30年11月8日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。 <ol style="list-style-type: none"> <li>1 吸入により siRNA が腫瘍にとりこまれるまでの機序について</li> <li>2 原発性肺腫瘍モデルへの siRNA の経気道投与について</li> <li>3 肺腫瘍における血管新生の評価について</li> <li>4 VEGF 以外の治療ターゲットの候補について</li> <li>5 今後の臨床応用への展望について</li> <li>6 siRNA dry powder の吸入による他臓器への影響など、副作用、毒性について</li> </ol> これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			