



Title	Innovative delivery of siRNA to solid tumors by super carbonate apatite
Author(s)	吳, 鑫
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/51967">https://hdl.handle.net/11094/51967</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

## Synopsis of Thesis

氏名 Name	呉 鑫 (WU Xin)
論文題名 Title	Innovative delivery of siRNA to solid tumors by super carbonate apatite (スーパー炭酸アパタイトによる固形腫瘍への革新的核酸デリバリー法の開発)
論文内容の要旨	
<p>(目的) siRNA/microRNA等の核酸創薬研究が進んでいるが、比較的、送達しやすい眼・皮膚や肝・腎などの疾患以外では顕著な成果が出ていない。特に固形腫瘍への核酸の静注による治療は未だ臨床応用に至っていない。炭酸アパタイト法はリン酸、炭酸、カルシウムという単純な組成から成り、in vitroでの遺伝子導入試薬として知られている。しかし、これまで凝集の問題から血管内投与はできなかった。我々は炭酸アパタイトを改良し、静注用のスーパー炭酸アパタイトナノ粒子(super carbonate apatite: sCA)を開発した。本研究では、sCAのマウス固形腫瘍への核酸送達効率と抗腫瘍効果を、他のin vivo用DDSであるリポゾームやアテロコラーゲンと比較して検討し、マウス・サルを用いた安全性評価を加え、sCAのin vivo核酸デリバリーシステムとしての性能を明らかにすることを目的とした。</p> <p>(方法ならびに成績) ① sCA粒子の物性: レーザー顕微鏡、動的光散乱法(DLS)および原子間力顕微鏡(AFM)による粒子径解析では、sCAは二峰性の粒子径を示した。DLSによる大きい粒子径の解析では平均 653nm、AFMによる小さい粒子径の評価では 7~50 nm (<math>14.8 \pm 5.66</math> nm)であり、小さい粒子数の割合は全体の99.7%を占めた。マウス血清を用いた <i>ex vivo</i> 半減期評価では、naked-siRNAは10 min 以内にその8割が分解されたのに対して、sCA-siRNAは半減期が30 hであった。二光子顕微鏡を用いたマウス耳血管観察による <i>in vivo</i> 半減期評価では、naked-siRNAの半減期 (<math>2.29 \pm 0.32</math> min) 及びAUC (<math>3.21 \pm 1.30</math> Rel. Fluor. min)と比較して、sCA-siRNAではそれぞれ2.9倍、2.3倍の改善がみられた。② <i>in vitro</i> 核酸取り込み能とその効果: 蛍光標識したcontrol siRNAの大腸癌細胞 (HCT116, HT29, KM12SM)、頭頸部癌細胞 (FaDu)、前立腺癌細胞 (22Rv1)への細胞内取り込み効率をフローサイトメトリー及び蛍光顕微鏡でsCAとLipofectamine 2000とで比較評価したところ、4h 及び 12h後に、全ての細胞株においてsCAは有意に高い導入効率を示した。Survivin-siRNAのトランスフェクションでは、Lipofectamine 2000と比べてsCAはより早期にsurvivin蛋白発現を抑制でき、大腸癌細胞HCT116の増殖抑制効果も顕著であった。③ <i>In vivo</i> 腫瘍集積性: ヒト大腸癌およびヒト頭頸部癌固形腫瘍モデルを用いて、蛍光標識したsiRNAをsCA及び、市販のin vivo核酸デリバリーシステムであるInvivofectamine 2.0 (リポゾーム製剤) 及びAtelogene (アテロコラーゲン) に内包して静脈内に投与したところ4時間後にsCAは2~4倍高い腫瘍集積性を示した。ライトシートレーザー顕微鏡を用いた腫瘍血管周囲の集積性評価では、sCAのみで腫瘍血管周囲の腫瘍細胞質に明瞭な核酸の蛍光シグナルが確認できた。④ マウス正常組織への核酸分布: 蛍光標識したsiRNAを内包した上記3システムを用いてマウス正常組織への分布を評価したところ、sCAによる肝臓、肺、腎、脾臓への核酸の集積は他と比べて僅かであった。⑤ <i>In vivo</i> 抗腫瘍効果: HCT116ヒト大腸癌固形腫瘍モデルにおいて、survivin-siRNAを各システムに内包してマウスに全身投与したところ、sCAのみで抗腫瘍効果が確認され、固形腫瘍のsurvivinの免疫染色でもsCAのみで標的タンパクの抑制が確認できた。⑥ <i>In vivo</i> functional evidence of survivin-siRNA (HT29ヒト大腸癌固形腫瘍モデルを用いた検討): Survivin-siRNAを内包したsCAをマウスに3日連続静脈投与して4日目に回収した腫瘍中のsurvivin蛋白レベルをwestern blotで調べた結果、コントロールと比べて減少していた。またTUNEL assayによりアポトーシス陽性細胞が確認された。⑦ 毒性試験: マウスへのsCAの反復静脈投与、及びカニクイザルへのsCAの4日連続静脈投与においても、体重、血液生化学、組織検査において大きな異常を認めなかった。</p> <p>(総括) sCAは従来困難とされた固形腫瘍への核酸デリバリーを実現した。すなわち、マウス固形腫瘍への迅速かつ十分量の核酸の送達を可能とした結果、in vivoにおいても内包された核酸が期待される効果を発揮することが確認された。sCAシステムは新規のin vivo核酸デリバリー用のDDSとして有用である。</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 具 鑫	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 大阪大学教授 森 正 樹
	副 査 大阪大学教授 木 村 正
	副 査 大阪大学教授 熊 御 淳
論文審査の結果の要旨	
<p>siRNA/microRNA等の核酸創薬研究が進んでいるが、固形腫瘍への核酸の静脈注射による治療は未だ臨床応用に至っていない。本研究では、in vitro用のドラッグデリバリーシステム (DDS) である炭酸アパタイトを改良し、静脈注射可能なスーパーアパタイト (super carbonate apatite : sCA) ナノ微細粒子を作成した。結果的に、sCAは従来使用されているin vivo用のDDSであるliposome や アテロコラーゲンよりも有意に高い腫瘍集積性と抗腫瘍効果を認め、且つ正常組織の取り込みは同程度かそれ以下であった。核酸を内包したsCAは、マウス尾静脈から静注後4時間で腫瘍細胞の細胞質内に充満し、これまで生体バリアとされた細胞内でのエンドソームからの脱出を容易に達成した。sCAはin vivoでの固形腫瘍への核酸デリバリーを実現し、新たな核酸医薬の道を切り開く可能性を示したので、本研究は学位に値すると考えられる。</p>	