

## 主論文の要旨

**Preclinical evaluation of an O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase-siRNA/liposome complex administered by convection-enhanced delivery to rat and porcine brains**

〔 MGMT-siRNA／リポソーム複合体を convection-enhanced delivery によって投与するラット及びブタを用いた前臨床評価 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻  
脳神経病態制御学講座 脳神経外科学分野

(指導：若林 俊彦 教授)

辻内 高士

## 【背景】

膠芽腫 (glioblastoma, GBM) は最も予後の悪い固形腫瘍のひとつである。近年、アルキル化剤である temozolomide (TMZ) の有効性が示されたが、TMZ を使用した集学的治療を行ってもその平均生存期間は 14.6 か月にすぎない。

アルキル化剤に対する GBM の主たる耐性機構として、DNA 修復酵素である O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) の存在が挙げられる。実際に MGMT を高発現する glioma 細胞は TMZ に抵抗性であることが報告されており、また MGMT プロモーターにメチル化のない GBM 患者群で TMZ の効果が殆ど認められなかったことも報告されている。

以前、我々の研究室では MGMT-siRNA/リポソーム複合体の投与が TMZ の効果を増強することをマウスで確認し、報告した。本研究ではこの治療法の臨床応用を目的として、MGMT-siRNA/リポソーム複合体の安全性をラット及びブタで評価し、また CED による MGMT-siRNA/リポソーム複合体の投与がより大きな動物に対して有効であるかを調べた。

## 【対象及び方法】

- ・ラットの脳に対する MGMT-siRNA/LipoTrust の直接投与

マウスを 5 匹ずつ 5 群に分け、コントロール群、リポソーム (LipoTrust) 群、MGMT-siRNA/LipoTrust 複合体群、MGMT-siRNA/LipoTrust 複合体+TMZ 群、TMZ 群とした。LipoTrust を投与する 3 群では、基準日 (0 日目) に麻酔下で脳表から 5mm の位置に LipoTrust (全量 10  $\mu$  L) を投与した。TMZ を投与する 2 つの群では、1 日目から 5 日間連続で 160  $\mu$  L の TMZ を腹腔内投与した。体重測定、血液検査を定期的に行い、30 日の観察期間終了後、骨、骨髄、甲状腺、肺、気管支、心臓、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎及び脳を摘出し、組織学的検査を行った。

- ・ラットの脳に対する蛍光ラベルした LipoTrust の CED による投与

LipoTrust が白質及び灰白質に対する CED に適するかどうかラットを用いて調べた。麻酔下に脳線条体 (灰白質) 又は脳梁 (白質) にカテーテルを留置し、それぞれのマウスに CED により 0.5、2.5、5  $\mu$  L/min の速さで蛍光ラベルした LipoTrust を投与した。CED の後に脳を摘出し、蛍光顕微鏡によりリポソームの拡散を観察した。

- ・ブタの脳に対する gadolinium 包埋 MGMT-siRNA/LipoTrust 複合体の CED による投与

全身麻酔下にブタの頭部に穿頭を行い、右前頭葉にカテーテルを留置した。0.5、1、2.5、5  $\mu$  L/min の 4 段階で計 140  $\mu$  L の gadolinium 包埋 MGMT-siRNA/LipoTrust 複合体を投与し、MRI にて T1 強調画像を撮影した。28 日間の回復期間の後、脳、腎臓、肝臓、脾臓をホルマリン固定し、組織学的な検討を行った。

## 【結果】

- ・ラットの脳に対する MGMT-siRNA/LipoTrust の直接投与

30 日の観察期間中、全てのラットは生存しており、全身状態に異常は見られなかつ

た。体重はいずれの群でもコントロール群と比較し有意差は認めなかった (Figure 1A)。血液学的検査では MGMT-siRNA/LipoTrust 複合体群と TMZ 群において、コントロール群と比較して 7 日目の赤血球数で僅かな上昇が見られたが ( $798 \pm 8$ ,  $794 \pm 10$  vs.  $753 \pm 14$  ( $10^4/\mu\text{L}$ );  $P < 0.05$ )、その後有意差は見られず、またその他の血球数や白血球百分率でも有意差は認めなかった (Figure 1B-E)。生化学検査は tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、2'-5'-oligoadenylate synthetase 1 (2-5-OAS1) を含め有意な異常は見られなかった (Table 1)。組織学的検査でも、脳では針の刺入痕を除き明らかな異常を認めず (Figure 2)、他の臓器にも有害な変化を認めなかった (Table 2)。

・ラットの白質、灰白質に対する蛍光ラベルした LipoTrust の CED による投与

灰白質に対する LipoTrust の CED による投与では、カテーテルの挿入部からの十分な拡散は得られなかった。白質では  $0.5 \mu\text{L}/\text{min}$ 、 $2.5 \mu\text{L}/\text{min}$  の投与速度である程度の拡散が観察されたが、 $5 \mu\text{L}/\text{min}$  ではカテーテルに沿った薬剤の逆流が観察された (Figure 3)。

・ブタの脳に対する gadolinium 包埋 MGMT-siRNA/LipoTrust 複合体の CED による投与

MRI 画像では 2 か所の強い信号を認める集積部位と、その周囲の淡い信号を認める領域が観察された (Figure 4A)。前者はカテーテルの先端とカテーテルの段差の部位に一致していた。後者はある程度の分布を見せたが白質解剖には一致していなかった。組織学的検査では、脳組織に明らかな異常は認めず (Figure 4B)、肝臓、腎臓、脾臓にも異常を認めなかった。

## 【考察】

siRNA 治療のような遺伝子治療に際しては、off-target 効果と免疫応答がしばしば重大な問題となる。

off-target 効果を回避するため、我々は過去に 3 種類の siRNA を使用し、その効果が同一であることを示した。厳密に off-target 効果を否定することは困難であるが、少なくとも今回のブタとラットの実験では全身状態や血液検査、組織学的検査で重大な有害事象は観察されなかった。

我々はベクターとして LipoTrust EX Oligo を用いたが、一般に合成 liposome はウイルスベクターと比較し免疫応答を引き起こしにくい。また過去の研究においても、このリポソームはマウスの肝臓や肺癌モデルへの投与で有害事象を引き起こさなかったことが報告されている。今回の実験でも、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、2-5-OAS1 の上昇は観察されず、組織学的にも変性や炎症細胞の浸潤などは観察されず、MGMT-siRNA/LipoTrust 複合体の投与がサイトカイン応答を惹起しないことが示された。

我々は今回の薬剤の投与方法として CED を選択した。blood-brain barrier (BBB) は有害物質を排出するポンプ作用を有するため、薬剤の脳への到達は阻害される。遺伝子治療の分野では脳への直接注入や、カテーテル留置による反復投与などが研究されてきたが、これらの方法では作用時間が短かったり、注入による機械的な組織破壊

を生じたりするなど不都合が多かった。CED は留置したカテーテルから薬剤を少量持続的に注入することにより、組織間流による拡散を利用して薬剤を広範に均一に届ける方法である。本研究では、ブタに注入した gadolinium 包埋 LipoTrust がカテーテルの先端と段差の部位に集積して観察された。これは注入した gadolinium 包埋 LipoTrust が拡散せずカテーテルに沿って逆流したことを示しており、LipoTrust は CED で十分に拡散しないことを示している。拡散を妨げる要因として LipoTrust が cationic liposomes であることが考えられる。細胞の表面は負に帯電しているため、注入部の周囲で早期に LipoTrust が吸着され、投与速度を増しても拡散が得られず逆流が発生したと考えられる。

我々が LipoTrust EX Oligo を使用したのは、過去の研究で高い遺伝子導入効果を示し、安全性に優れ、また臨床応用可能な品質で商業的に入手可能であったからである。細胞膜に素早く到達する性質は遺伝子の導入には有利であるが、薬剤を広範に届ける点では不利に働く。現在では世界中でベクターの研究が行われ、脂質膜の表面に様々な特性を付加した nanoparticle も開発されている。これらの技術が近い将来、広範な拡散と高い導入効率、安全性のバランスの取れたベクターの開発を可能にするであろう。

#### **【結語】**

我々の MGMT-siRNA/LipoTrust 複合体は、ラット及びブタの実験においてその安全性が示された一方で、CED による広範な拡散は得られなかった。しかし依然として MGMT-siRNA は GBM に対する治療成績を改善する大きな可能性を秘めており、新規ベクターでの挑戦を含め臨床応用に向けた更なる研究を続けていきたい。