

Anti-CD 47 siRNA の標的注入と全身照射併用療法による抗腫瘍効果

原田 聡¹、江原 茂¹、世良耕一郎²、後藤祥子³

¹岩手医科大学医学部放射線医学講座
020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

²岩手医科大学サイクロtronセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

³日本アイソトープ協会仁科記念サイクロtronセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

1 はじめに

腫瘍細胞膜表面の CD-47 抗原は、免疫細胞から貪食を逃れるシグナル (don't eat me signal) をつかさどる抗原として知られており、抗 CD47 抗体は、免疫細胞が腫瘍細胞を貪食し易くする作用がある¹。一方、低線量全身照射は、免疫細胞を活性化して、免疫細胞の腫瘍細胞細胞貪食を促進することが知られている²。もし、抗 CD47 抗原を鎮静化し、腫瘍細胞を免疫細胞から貪食し易くし、さらに全身照射を施し、免疫細胞を活性化すれば、腫瘍細胞の免疫による抗腫瘍効果が高まることが考えられる。

現在まで我々は、溶液中で負に帯電したヒアルロン酸と正に帯電したプロタミンを静電的に結合させ、ヒアルロン酸-プロタミン Particle を作成し、それが放射線により particle に付着させた物質を放出させることを研究してきた^{3,4}。今回、我々は、ヒアルロン酸-プロタミンパーティクルに、CD47 signal を抑制する、anti-CD 47 siRNA を取り込ませ、腫瘍細胞表面に皮下注後、放射線を照射、パーティクルから anti-CD47 siRNA を腫瘍に放出させることで、腫瘍の免疫細胞 (CD8+ T-cell) から貪食を逃れる信号を抑制し、続いて、マウスに低線量全身照射を加え、免疫細胞 (CD8+ T-cell) を活性化することで、抗腫瘍効果増強を試みた。また、anti-CD47 のパーティクル化により、副作用が軽減するかを検討した。

2 材料と方法

2.1 ヒアルロン酸-プロタミンパーティクル生成 : 2.0 mg プロタミン、1.6 mg ヒアルロン酸を 0.1 mmol/l-Tris buffer 10 ml に溶解し、0.5 μmol/l の anti-CD 47 siRNA, 1 mg carboplatin (Pt 含有抗がん剤) を添加後、室温にて 30 分間静置し、パーティクルを生成した。生成したパーティクルは 0.8 μm 孔のセルロースフィルターでろ過し、セルロース膜に付着したパーティクルを 0.1 mmol/l-Tris buffer 1 ml に再浮遊してパーティクルを作成した。

2.2 動物モデル作成 : C3He/N マウス (6 週令♂) の左下腿に、乳がん細胞 (MM48) 百万個を左下腿に移植し、径 8 mm 大になった時点で実験に使用した。

2.3 マウスへの処置 : 2.1 で作成したパーティクル 1×10^8 個をマウス左下腿の腫瘍周囲に皮下注射した。続いて、140-keV 軟 X 線を 0.301 Gy/l min の線量率で、左下腿に対して 10 Gy を照射した。左下腿への照

射 24 時間後に、同軟 X 線を 0.3 Gy 全身照射に 0.3 Gy を 24 時間おきに、5 回照射した。

2.4 PIXE 用ターゲット調製：放射線照射後、直ちに腫瘍組織を剖出、 -20°C で冷凍保存した。冷凍保存 5 日以内に腫瘍を硝酸灰化法により腫瘍を完全に消化した。その後、定量用内部標準として、In を腫瘍 1 mg に対し 1000 μg を混入し、マイラー膜上に滴下、室温で乾燥後ターゲットとした。

2.5 PIXE 分析：PIXE 分析は、岩手医科大学サイクロトロンセンター/日本アイソトープセンター仁科記念サイクロトロンセンターにて施行した。ターゲットを 2.9 MeV プロトンビームで照射、発生した特性 X 線を Si-Li 検出器で検出後、マルチチャンネルアナライザーで分析した。定量は、内部標準として添加した In の含有量を基に、定量解析用ソフトウェア“SAPIX”を用いて定量した。

2.6 抗腫瘍効果、副作用：上記 PIXE 実験と並行して、治療後のマウス左下腿の腫瘍径を毎日計測することで、抗腫瘍効果を評価した。治療による副作用は、マウスの体重減少、毛羽立ち、死亡の 3 つの観点から評価した。

2.7 統計計算：統計計算は ANOVA (analysis of variance)を用い、 $P < 0.05$ をもって、有意差ありと判定した。

3 結果

3.1 Particle の形態：生成された Particle (放射線照射前)の光学顕微鏡像を図 1-A に示す。Particle はほぼ円形であり、Particle の直径は、 $0.743 \pm 0.034 \mu\text{m}$ であった。放射線照射後の Particle を図 1-B に示す。放射線照射後、Particle は不整形化、微細化し、放射線による Particle の破裂が示唆された。

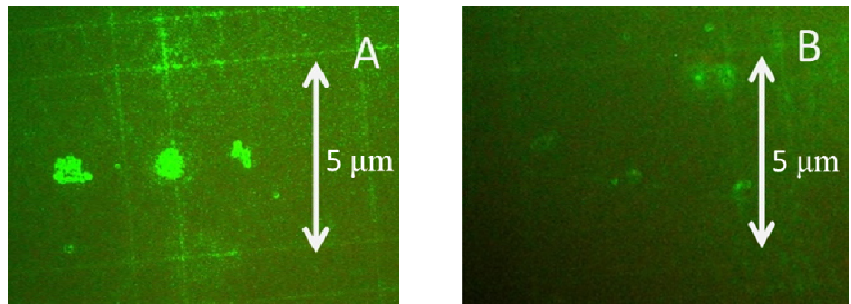


図 1：生成された Particle (光学的顕微鏡下 400 倍)
A：照射前、B：照射後

3.2 Particle からの内容放出率：放射線による内容放出率を計測するために加えた、カルボプラチンに含まれる Pt を検出、定量することにより、内容放出率を算した。放出率は 95.6 ± 4.0 と高い放出率が観測された (図 2)。

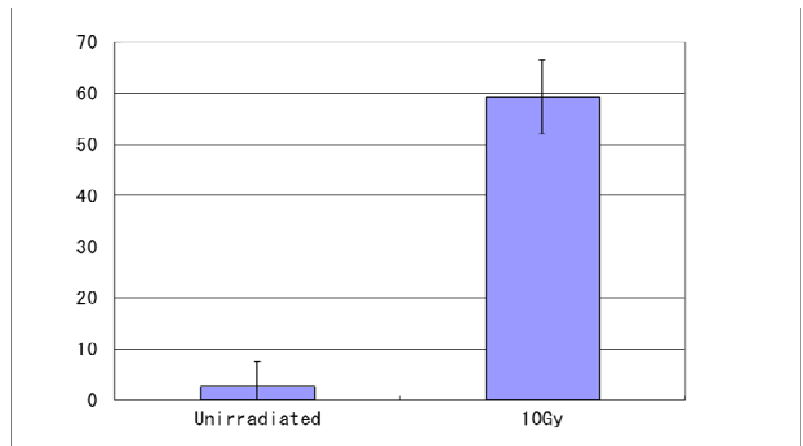


図 2：Particle からの内容放出率。Particle 中に混入した Pt (カルボプラチン) の放出率を PIXE にて計測。

3.3 Anti-CD47 の鎮静化：Western blott 法による CD-47 signal 活性化を図 3 に示す。Anti-CD47 siRNA により、貪食から逃れる信号 (don't eat me signal) は鎮静化された。

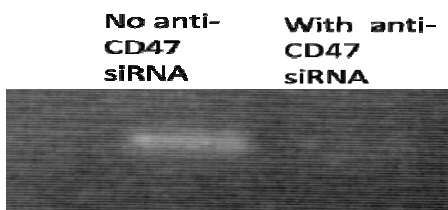


図 3：anti-C47 siRNA による CD 47 (don't eat me signal)の鎮静化

3.4 抗腫瘍効果：治療開始を0日とした経時的腫瘍径の変化を図4に示す。放射線照射のみに対し(■)、放射線と anti-CD47 siRNA 併用群では有意に強い抗腫瘍効果が認められた(▲、×)。最も高い抗腫瘍効果を示したのは、放射線照射と particle に封入した、anti-siRNA の併用群であった(×)。

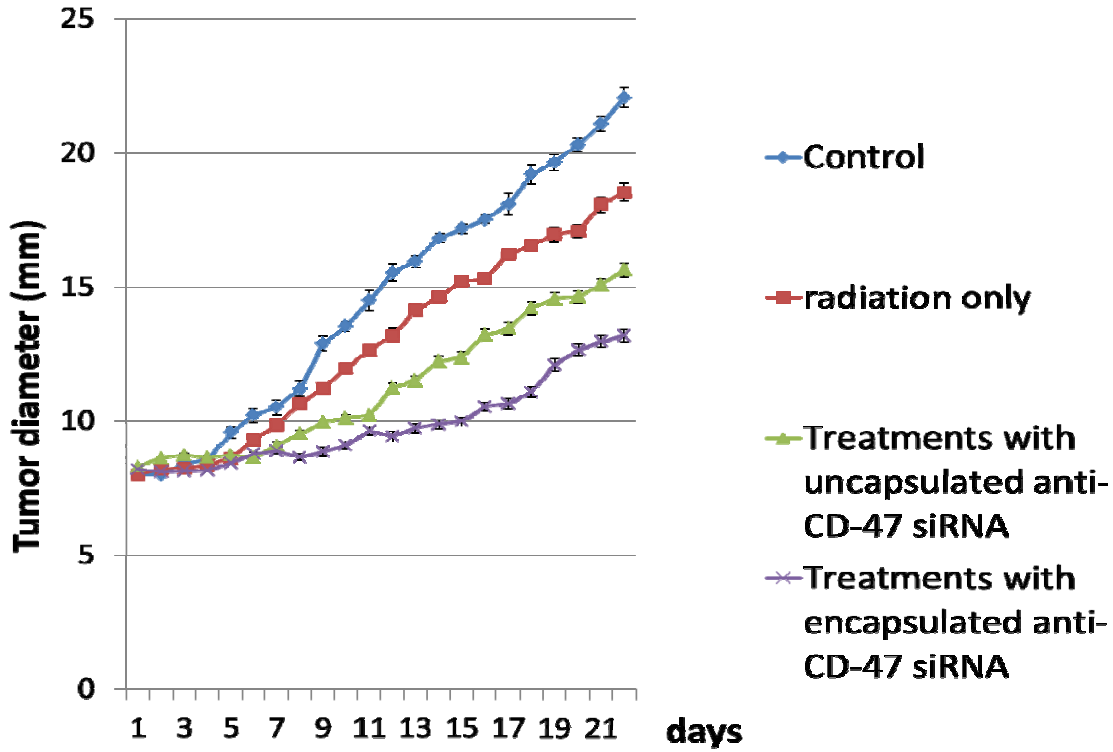


図4 抗腫瘍効果：マウス8匹の腫瘍径の経時的変化

3.5 副作用軽減：副作用の強さを、マウスの毛羽立ち、20%以上の体重減少、死亡の3つの観点から観察し、マウス8匹中見られた、それら個体数を表1に示す。パーティクル化によって、副作用は著明に軽減し、特にパーティクル化した anti-CD48 siRNA 投与群では、死亡が0匹に低下した。

表1：副作用の軽減作用。使用したマウス8匹の副作用を示した個体数を示す。

		Body weight Loss	Fuzzy hair	Dead
Targeted Immunotherapy	10 Gy	2	4	0
	20 Gy	2	5	0
Untargeted immunotherapy	10 Gy	8	8	3
	20 Gy	8	8	6

4 考察

Anti-CD-47 siRNA は、癌細胞における、免疫細胞からの貪食を逃れる機構を鎮静化させることにより、癌細胞が免疫細胞からの貪食を受けやすくすることで、抗癌作用を発揮する¹。CD-47 は免疫細胞からの貪食を逃れる機構として、癌細胞体内の細胞中に幅広く分布しているため、Anti-CD 47 siRNA を全身投与すると、正常組織の CD-47 も鎮静化し、結果、正常組織が免疫細胞により貪食されることとなる¹。この欠点を補うには、Anti-CD47 siRNA を癌組織のみに作用させ、癌組織のみを免疫細胞から貪食されやすくする必要はある。

我々は、ヒアルロン酸とプロタミンが静電的に結合し、Particle を生成、放射線照射によりヒアルロン酸がアセチルグルコサミンに分解することから²、Particle に anti-CD 47 siRNA を含有させた場合、放射線に反応して anti-CD 47 が放出されると考えた。結果、ヒアルロン酸とプロタミンは $0.743 \pm 0.034 \mu\text{m}$ 径のパーティクルを形成し、10 Gy の放射線症によって、 95.6 ± 4.0 の anti-CD 47 siRNA が放出された。

放出された anti-CD 47 siRNA は CD-47signal を抑制し、腫瘍は免疫細胞から貪食を受けやすくなり、抗腫瘍効果の増強が観測された。Particle に封入された anti-CD47 siRNA は封入されていない anti-CD 47 siRNA よりも抗腫瘍効果が高かったが、これは、Particle から持続的に anti-CD 47 siRNA が徐々に放出されているためと推測された。Particle により限局化された siRNA は、限局化されていない (封入されていない anti-CD 47 siRNA) よりも副作用が減弱化されたが、これは Particle に封入された anti-CD 47 siRNA が腫瘍細胞のみに作用させているためと考えられた。

5 課題

現在、放出率のデータが 10 Gy のみであるため、今後、それ以外の照射線量における放出率を測定する必要性が考えられた。また、臨床における放射線の 1 回線量が 2 Gy であるため、放出率が 2 Gy でも 80~90% となるよう、Particle の改良が必要と考えられた。

参考文献

1. D Kim, J Wang, SB Willingham et. al. Leukemia (2012) 26, 2538
2. Lindsay K. Ward-Kavanagh, Junjia Zhu, Timothy K. Cooper, et. al. Cancer Immunology Research (2014) DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0164.
3. S. Harada, S. Ehara et.al. Biomedicine & Pharmacotherapy 70 (2015) 196.
4. S. Harada, S. Ehara et.al. IJ PIXE 24, Nos. 3 & 4 (2014) 137.

Antitumor effect by combined therapy of Anti-CD 47 siRNA particles and low dose whole radiation

S. Harada¹, S. Ehara¹, K. Sera² and S. Goto³

¹School of Medicine, Department of Radiology, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka, Iwate, 020-8505 Japan.

²Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

³Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

Abstract

The particles consisted from hyaluronic acid (HA) and Protamine (P), which release anti-CD siRNA with response to radiation, were generated, and their ability to increase antitumor effect and to reduce adverse effect was tested IN VIVO in C3He/N mice. Hyaluronic acid and Protamine were mixed into the solution, containing anti-siRNA and carboplatin, and placed in room temperature for 30 minutes. In this way, particles for tumor treatment were generated. Those particles were subcutaneously injected around the MM 48 tumor in the left hind leg of C3He/N mice. Subsequently, a single doses of 10 Gy 140 keV soft X-rays was given. 24 hours after local radiation to tumours, mice were exposed to 3 cGy of whole-body 140 KeV soft X-ray radiation, at 24 h intervals for 5 days. The particles, which were placed around the tumor, released anti-CD 47 siRNA with response to radiation. Released anti-CD 47 siRNA silenced the CD-47 signal (don't eat me signal), which made tumors easily phagocytosed by immunogenic cells. The whole body irradiation activated the immune-systems of mice, and attacked tumors whose "don't eat me signal" was sliced. Those treatments increased antitumor effect and reduced adverse effect of anti-CD siRNA.