

がん細胞への siRNA デリバリーとがん遺伝子治療への適用

高橋有己,* 西川元也, 高倉喜信

In vivo siRNA Delivery to Tumor Cells and Its Application to Cancer Gene Therapy

Yuki TAKAHASHI,* Makiya NISHIKAWA, and Yoshinobu TAKAKURA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshidashimoadachi-cho,
Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received June 14, 2007)

RNA interference (RNAi) is a posttranscriptional gene-silencing event in which short double-stranded RNA (siRNA) degrades target mRNA. Because of its potent and highly specific gene-silencing effect, RNAi is expected to be used in the treatment of various diseases. Cancer is one of the major targets of RNAi-based therapy, because silencing oncogenes or other genes contributing to tumor progression can be target genes for RNAi. The delivery of RNAi effector to target cells is one of the key factors determining therapeutic efficacy, because gene silencing is limited to cells reached by RNAi effectors. Tumor cell lines stably expressing reporter genes were confirmed to be effective in sensitively and quantitatively evaluating RNAi effects in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. Quantitative analyses of the gene-silencing effect revealed that short-hairpin RNA expressing plasmid DNA (pshRNA) has more durable effects than siRNA. Intratumoral injection of RNAi effectors was effective in suppressing target gene expression in tumor cells, and silencing of β -catenin or hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) significantly inhibited tumor growth. RNAi effectors were successfully delivered to tumor cells colonizing the liver through the vascular route. We found that tumor-bearing liver showed elevated HIF-1 α expression in the cells, and the silencing of the expression in normal liver cells is also effective in inhibiting metastatic tumor growth. These results indicate the possibility of RNAi-based cancer therapy.

Key words—RNA interference; short hairpin RNA; hydrodynamic delivery; electroporation; tumor growth

1. はじめに

RNA 干渉 (RNA interference) は二本鎖 RNA により配列特異的に mRNA が分解される現象である。¹⁾ 2001 年に Tuschl らにより, この現象が活性本体である 21-23 塩基対の 2 本鎖 RNA (siRNA) を用いることで哺乳動物にも適用可能であることが明らかとされ, それ以来, 合成された siRNA, あるいは細胞内でプロセッシングを受けることにより siRNA となるショートヘアピン型 RNA (shRNA) を用いることで RNA 干渉が誘導可能であることが *in vitro*・*in vivo* の実験系において証明されてきた。^{2,3)} RNA 干渉は, 標的遺伝子の発現を簡便かつ特異的に抑制可能であることから, 現在では特定遺伝子の機能を評価するための実験手技として幅広く

活用されている。また, がんやウイルス感染などに代表される病原タンパク質の発現亢進が原因となる疾患に対しては, その発現を特異的に抑制することによる分子標的治療法としての応用が期待されている。^{4,5)} その一方で, RNA 干渉による遺伝子発現抑制効果は siRNA が存在する細胞に限局されるため, RNA 干渉の治療手段としての適用には siRNA の標的細胞へのデリバリーが必要条件となる。⁶⁾ しかしながら十分に治療可能な siRNA のデリバリー方法はまだまだほとんど開発されておらず, より効率的なデリバリー方法の開発が必要である。そこで本稿ではわれわれの検討結果を中心に, siRNA をデリバリーすることで発がん遺伝子やがん細胞の増殖・転移等に関与した遺伝子の発現を抑制することによるがん治療の可能性について解説する。

2. *In vivo* におけるがん細胞への siRNA のデリバリー

RNA 干渉の誘導には, siRNA が標的細胞に活性を保持した状態で到達することが必要であるが,

京都大学大学院薬学研究科 (病態情報薬学分野)
(〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

*e-mail: Yuki@f01.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第 127 年会シンポジウム SD1 で発表したものを中心に記述したものである。

siRNA は核酸であることから生体内における安定性が低い。したがって、化学的安定性の改善を目的とした化学修飾 siRNA の有効性も報告されている。⁷⁾ また、細胞での転写により shRNA を発現するベクターも有効であり、ウイルスベクター、非ウイルスベクターが利用可能である。^{8,9)} ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター投与による死亡事例やレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療における白血病の発症など、安全性の面で解決しなければならない課題が多い。¹⁰⁻¹²⁾ これに対し、プラスミド DNA (pDNA) に代表される非ウイルスベクターは、安全性・生産性の面で優れており、また問題とされてきた導入効率についても近年大幅に改善されてきている。ウイルスを使わない方法で RNA 干渉を誘導し疾患治療を実現するためには、siRNA あるいは shRNA 発現 pDNA (pshRNA) を標的細胞内へデリバリーすることが必須である。しかしながら、siRNA や pshRNA などは、水溶性高分子であるため細胞膜透過性が著しく低く、静脈内投与のような一般的な投与方法ではほとんど細胞内には到達しない。細胞内で作用するこれら化合物による疾患治療の実現には、これらの化合物を効率よく標的細胞内にデリバリーする技術の開発が必要である。膜透過性が制限される水溶性高分子化合物の細胞内デリバリーに関しては、これまでにアンチセンスオリゴヌクレオチドやリポザイム、pDNA などを対象に検討されてきた。¹³⁾ 中でも非ウイルスベクターによる遺伝子導入に関する検討においては、pDNA 単独の投与方法の最適化に始まり、電気パルスや超音波の利用、各種高分子・微粒子ベクターとの複合体化による遺伝子発現の増大など、多岐に渡る技術が集積されている。siRNA や shRNA 発現ベクターの利用に際しても、これまでに開発されてきた核酸デリバリー技術が応用可能である。siRNA あるいは pshRNA を生体レベルで標的細胞、すなわちがん細胞へデリバリーすることで標的遺伝子の発現を抑制することが可能となれば、新規分子標的がん治療法になり得るものと考えられる (Fig. 1)。

2-1. がん細胞における遺伝子発現抑制効果の定量的解析 がん細胞での RNA 干渉誘導の検討には、がん細胞内の遺伝子発現量を定量的に評価可能な実験系の利用が非常に有用である。われわれはマウス黒色細胞腫 B16 細胞をモデルのがん細胞と

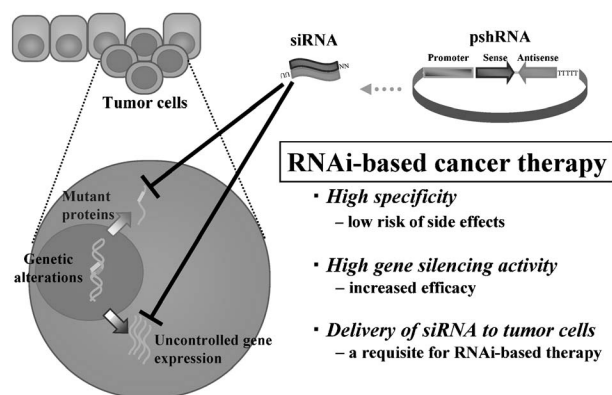


Fig. 1. Schematic Image of RNAi Pathway and Its Application to Cancer Therapy

Because of its highly potent and specific gene silencing effect, RNAi is expected to be applied to cancer therapy. To perform RNAi-based therapy, siRNA or pshRNA should be delivered to the target cells because the RNAi effect is limited in the cells that received RNAi effectors.

し、ホタル及びウミシイタケの2種類のルシフェラーゼを安定に発現する細胞株 B16/dual Luc を構築することによりがん細胞における遺伝子発現抑制効果について定量的に評価可能であることを報告した。¹⁴⁾

この系では、B16/dual Luc にホタルルシフェラーゼに対する siRNA をトランスフェクションし、一定時間後に測定した両ルシフェラーゼ活性の比を算出することで簡便かつ定量的に RNA 干渉効果を評価可能である。われわれの検討においては、種々の濃度の siRNA をトランスフェクションしたのちのルシフェラーゼ活性を経時的に評価し、遺伝子発現抑制効果が siRNA の濃度依存的であることが示されている (Fig. 2).¹⁵⁾ RNA 干渉による遺伝子発現抑制効果は、ある時点での最大抑制率を指標に評価されることが多いが、「効果」の観点からは抑制強度だけでなく抑制時間も重要である。われわれは薬物速度論解析において用いられるモーメント解析を、ルシフェラーゼ活性の経時変化データに当てはめることで、遺伝子発現抑制効果の強度及び持続時間の指標として、 AUC_{IE} 及び MRT_{IE} を RNA 干渉効果の新たな指標として提唱した (Table 1).¹⁵⁾ これにより初期濃度 (C_0) 1, 10, 100 nM の siRNA による遺伝子発現抑制効果について評価を行ったところ、その AUC_{IE} 及び MRT_{IE} と C_0 とは薬物用量-反応を表す式 C_0/AUC_{IE} or $C_0/MRT_{IE} = C_0/a + b/a$ (Eq. (1); a, b は定数) において線形関係であることを見出した (Fig. 3). また、siRNA 及び pshR-

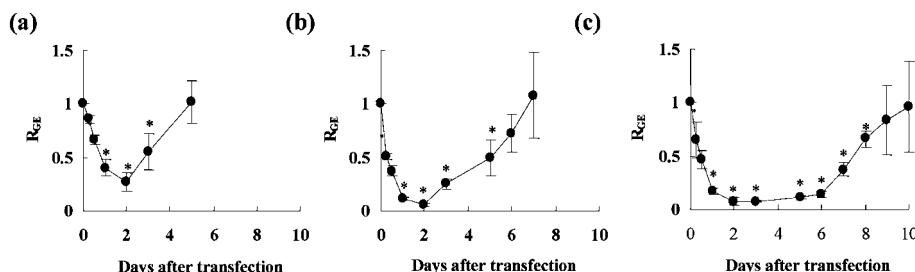


Fig. 2. Time-courses of Gene Expression (R_{GE}) following Transfection of siRNA

B16-BL6/dual Luc cells were transfected with siRNA targeting firefly luciferase at concentrations of 1 (A), 10 (B) and 100 nM (C). Luciferase activities were determined at the indicated times after transfection. The results are expressed as mean \pm S.D. ($n=3$). $*p<0.05$ for Student's t -test versus control group. Cited from Ref. 15).

Table 1. AUC_{IE} (day) and MRT_{IE} (day) versus siRNA Initial Concentrations (C_0 ; nM)

C_0	AUC_{IE}	MRT_{IE}
1	2.00	1.98
10	4.00	2.72
100	6.59	4.21

NAによる遺伝子発現抑制効果についての定量的比較を行う際にも B16/dual Luc 及びモーメント解析の方法論は有用であり、1分子当たりの遺伝子発現抑制効果は pshRNA の方が約 50 倍強力であることを示した。また、遺伝子発現抑制効果の持続について MRT_{IE} を用いて評価を行い、濃度により多少のばらつきは認められるものの pshRNA の方が 2-3 倍有利であることを明らかにしている。

B16/dual Luc は 2 種類のルシフェラーゼ遺伝子を安定に発現するため、ウミシイタケルシフェラーゼ活性に対するホタルルシフェラーゼの活性の比を取ることにより生体内のがん細胞数のばらつきを補正し、標的遺伝子の発現抑制効果について *in vivo* においてもがん細胞特異的に定量的に評価可能である。

2-2. 局所投与によるデリバリー 局所への遺伝子導入を目的としたベクターの投与に関しては既に種々の検討がなされている。腫瘍局所での RNA 干渉の誘導によるがん治療を試みる際には、これら既存の投与方法が利用可能と考えられる。しかしながら遺伝子発現強度が重要な遺伝子導入とは異なり、RNA 干渉の誘導によるがん治療の際には標的細胞群のどれぐらいの割合に siRNA を導入できたか、という標的(がん)細胞へのデリバリー効率が治療効果を左右する重要なパラメーターになるものと考えられる。

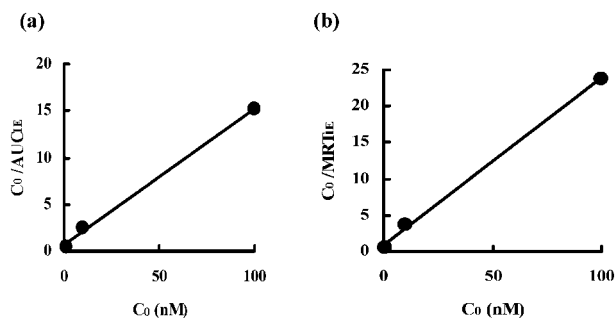


Fig. 3. Linear Plots of C_0/AUC_{IE} and C_0/MRT_{IE} versus C_0

(a) Linear plots of C_0/AUC_{IE} versus C_0 . Symbols represent C_0/AUC_{IE} calculated, with lines fitted using Eq. (1). a and b , are parameters described in Eq. (1), and were calculated to be 6.90 and 4.72, respectively. r , is the correlation coefficient of the linear plots, and was calculated to be 0.999. (b) Linear plots of C_0/MRT_{IE} versus C_0 . Symbols represent C_0/MRT_{IE} calculated, with lines fitted using Eq. (1). a and b , are parameters described in Eq. (1), and were calculated to be 4.35 and 3.47, respectively. r , is the correlation coefficient of linear plots, and was calculated to be 0.999. Cited from Ref. 15).

局所投与された pDNA のデリバリー効率を改善する手法として各種物理的刺激の適用が試みられてきた。代表的なものとしては、電気パルス投与部位に加えるエレクトロポレーションが挙げられる。一般にエレクトロポレーションを行うことにより遺伝子発現が増大することが報告されているが、われわれはこのときの発現の増加は導入細胞数の増大も伴うものであることを観察している。¹⁶⁾

われわれはマウス皮下に B16/dual Luc を移植することにより作製した原発性腫瘍モデルにおいて、ホタルルシフェラーゼを標的とする siRNA 又は pshRNA 水溶液を腫瘍組織内に注入したのちエレクトロポレーションを行うことで投与 24 時間後のルシフェラーゼ活性は対照群の約 30% にまで抑制可能であることを報告している。¹⁴⁾ 培養条件下での遺伝子発現抑制が約 90% 程度であることを考慮すると、本投与方法を用いることで腫瘍組織中の少なくとも 70% 以上のがん細胞において RNA 干渉を

誘導可能であることが推察できる (Fig. 4).¹⁴⁾

2-3. 経血管投与によるデリバリー siRNA 又は pshRNA の経血管投与は血流を介してこれら化合物が分布することから、投与された化合物の分布が投与部位近傍に限局される局所投与と比較して、より多くの細胞へと siRNA・pshRNA を導入可能な投与方法である。これら化合物を血管より投与した検討としては、2002年7月の Kay らのグループの報告がある。¹⁷⁾ 彼らは大容量のプラスミド DNA 水溶液を急速に血管内投与することにより、種々の臓器、特に肝臓において高い遺伝子発現が得られる方法 (ハイドロダイナミクス法) を用いた検討を行い、ルシフェラーゼを発現するプラスミド DNA をマウスに投与し、同時投与した siRNA による RNA 干渉効果をルシフェラーゼ活性を指標に評価した。その結果、ルシフェラーゼ遺伝子に相補的な配列を持つ siRNA を投与することにより、約 80% の遺伝子発現抑制を得ている。また、siRNA に加え、pshRNA を投与した場合も siRNA と同等の抑制効果が得られることも報告している。

がん治療を目的としたハイドロダイナミクス法による RNA 干渉の *in vivo* への適用には、標的細胞へのデリバリー効率も効果を左右する重要な因子となる。siRNA と pshRNA とでは、分子サイズに大きな違いが存在するため、デリバリー効率に影響を与える可能性が考えられる。われわれは、分子サイズがハイドロダイナミクス法による遺伝子導入効率に及ぼす影響を明らかにするために、PCR を利用することでサイズの異なる遺伝子導入ベクターを用いた検討を行った。¹⁸⁾ しかしながら、4.8 kbp の GFP 発現プラスミド DNA、あるいは発現に必要な部分のみ (1.7 kbp) を PCR で増幅した DNA 断片をハイドロダイナミクス法でマウスに遺伝子導入したときの肝臓では、ほぼ同数の細胞で遺伝子発現が認められた (Fig. 5).¹⁸⁾ したがって、少なくともハイドロダイナミクス法による肝臓へのデリバリーに関しては分子サイズの影響はあまり認められないものと考えられる。一方、分子量 4000 の PEG を用いた検討では、十分な肝臓での集積がみられなかったことから、デリバリーの観点からはサイズが小さいことがかならずしも有利とは限らないことも推察される。¹⁹⁾

既述の通りハイドロダイナミクス法によるデリバ

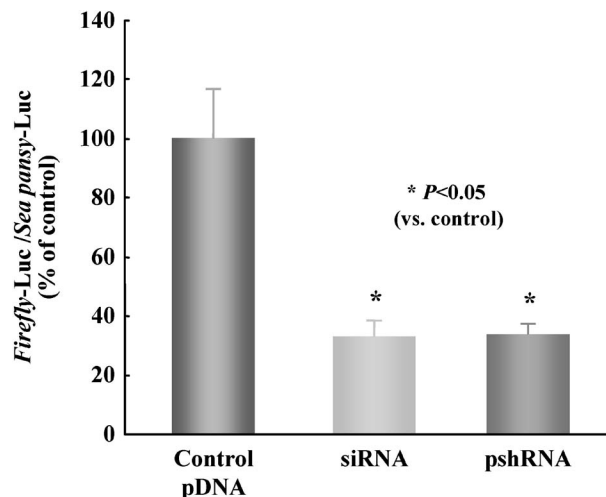


Fig. 4. RNAi in Subcutaneous B16-BL6/dual Luc following Intratumoral Injection of RNAi Inducer Followed by Electroporation

Mice received an intratumoral injection of control pDNA, siRNA targeting firefly luciferase (10 μ g) or pshRNA targeting firefly luciferase (30 μ g) followed by electroporation at a field strength 1000 V/cm 19 days after subcutaneous B16-BL6/dual Luc inoculation. Luciferase activities in the tumor tissue were determined 24 h after injection. The results are expressed as the mean \pm S.E. ($n=8$). * $p < 0.05$ for Dunnett's test versus control group. Cited from Ref. 14).

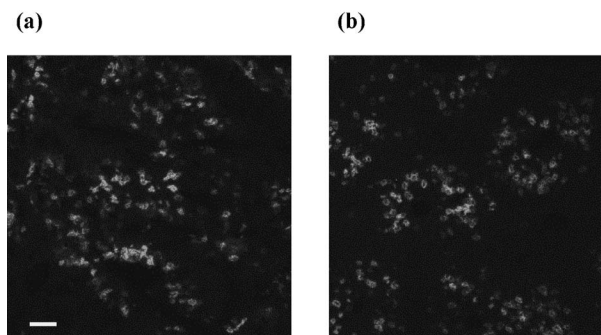


Fig. 5. Confocal Microscopic Images of the Liver Sections following Intravenous Injection of pEGFP-F or EGFPF-mini in Mice by the Hydrodynamics-based Procedure

Mice were euthanized at 6 h after injection and the liver sections were made. The images shown are typical of those observed in several visual fields of three mice per group. (a): EGFP-F-expressing pDNA (25 μ g or 8.4 pmol/mouse), (b): PCR-amplified EGFPF-expressing cassette (8.9 μ g or 8.4 pmol/mouse). Cited from Ref. 18).

リーは血流を介して行われることから、肝臓構成細胞のみならず血管に沿って分納する細胞がそのデリバリーの対象となると考えられる。われわれはハイドロダイナミクス法を利用することにより肝臓構成細胞のみならず、肝臓に転移したがん細胞にも血流を介して siRNA・pshRNA をデリバリー可能ではないかと考え、ルシフェラーゼ遺伝子で標識した B16-BL6 細胞を門脈内に移植することで作成した実験的肝転移モデルマウスを用いた検討を行っ

た。¹⁴⁾ その結果 siRNA 又は pshRNA のハイドロダイナミクス法による投与により肝臓中がん細胞での標的遺伝子発現を有意に対照群の 40-50%程度にまで抑制可能であることを見出ししている (Fig. 6).¹⁴⁾ ハイドロダイナミクス法による遺伝子導入細胞数は肝臓の約 40%であることが報告されており、それより高い導入効率を得ることができたがこれは転移したがん細胞は血管に沿って分布することを反映した結果と推察される。しかしながら、その遺伝子発現抑制効果は、局所投与の場合と比較して低く、複数回投与による遺伝子発現抑制効率の改善はほとんど認められなかったため、より効率的な遺伝子発現抑制を実現するためにはほかのアプローチの併用等も検討する必要があると考えられる。

3. RNA 干渉を利用したがん遺伝子治療法の開発

前述の通り、生体内のがん細胞に対して siRNA 又は pshRNA をデリバリーすることができれば、がん細胞における遺伝子発現を抑制することが可能であり、その遺伝子発現抑制効果を利用したがん治療の試みについても報告されている。既に報告されているものとしては、がん細胞の増殖・生存・転移・血管新生・免疫回避といった性質に関係した遺伝子を標的とした RNA 干渉による検討が報告されている。

3-1. 局所投与によるがん細胞増殖抑制

局所に作製した腫瘍に対して siRNA 又は pshRNA の腫瘍内投与とエレクトロポレーションを併用することでがん細胞の遺伝子発現を効率よく抑制可能である

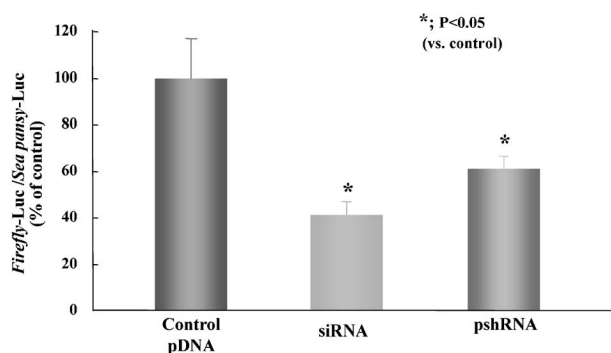


Fig. 6. RNAi in Metastatic Tumors in the Liver following Injection of siGL3 or pU6-siGL3 by the Hydrodynamics-based Procedure

Mice received an intravenous injection of control pDNA, siRNA targeting firefly luciferase or pshRNA targeting firefly luciferase (50 μ g) 13 days after tumor inoculation via the portal vein. The luciferases activities in the liver were measured 24 h after the injection. The results are expressed as the mean \pm S.E. ($n \geq 4$). * $p < 0.05$ for Dunnett's test versus control group. Cited from Ref. 14).

が、われわれはこの方法を用いてがん細胞の増殖等に関与した遺伝子である β -catenin, hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) の発現を抑制することでがん細胞の増殖が抑制可能であることを報告している。²⁰⁾ pshRNA の腫瘍内注射とエレクトロポレーションにより各内因性の標的遺伝子の mRNA 発現レベルを対照群の 25-35%程度に抑制可能であり、これらががんの増殖や転移に関与する遺伝子の発現を抑制することで有意ながん増殖の抑制が得られることを明らかとしている。このとき、一部マウスではがんのほぼ完全な退縮が認められた (Fig. 7). こうした pshRNA のデリバリーによる腫瘍増殖の抑制効果は腫瘍サイズ依存的であり、腫瘍サイズの増大とともに抑制効果が減弱することも示されている。これは、腫瘍の増大に伴い pshRNA がデリバリーされるがん細胞数の割合が減少することによるものと考えられる。したがって、大きな腫瘍を標的とする場合にはデリバリー効率を改善することが重要と考えられる。

局所投与により RNA 干渉を誘導する方法としては、エレクトロポレーションの利用のほかにカチオン性物質/siRNA コンプレックスの腫瘍内投与が報告されている。Kim らは VEGF を標的とする siRNA を、マウス皮下に作製した腫瘍組織内に Cholesteryl oligo-D-arginine (Chol-R9)/siRNA コンプレックスの形で単回投与することにより、がん細胞の増殖を対照群と比較して有意に抑制可能であることを報告している。²¹⁾ また、sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) を標的とする siRNA とカチオン性リポソームのコンプレックスをマウス皮下に作製した腫瘍組織内に 3 日毎に注入することで腫瘍組織の増殖を有意に抑制可能であることが Chae らにより報告されている。²²⁾ しかしながら、われわれの検討も含めたいずれの報告においても完全な腫瘍の拒絶には至っておらず、更なる効率の改善又はほかの方法を併用することによる治療効果の増強が必要であると考えられる。

3-2. 経血管投与を利用したがん細胞増殖抑制

経血管投与は導入細胞数の増大という観点から有用な方法であると考えられ、がん細胞が散在する転移性腫瘍に対してはその適用が特に望ましいと考えられる。ハイドロダイナミクス法を用いることで肝転移性腫瘍に対して RNA 干渉を誘導可能であるの

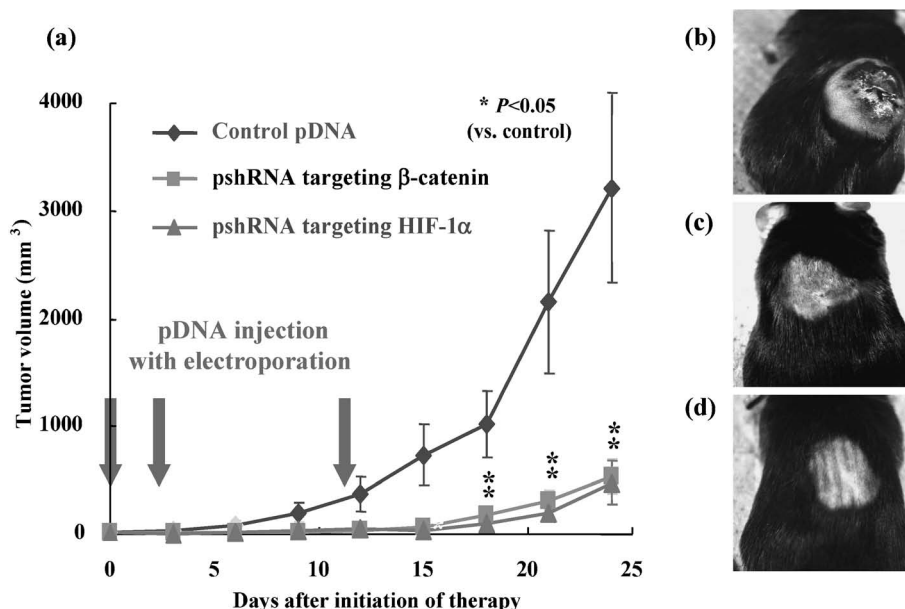


Fig. 7. Effects of Intratumoral Delivery of pshRNAs on the Growth of Primary Tumor Tissue

(a) Mice received an intratumoral injection of 30 μ g control pDNA or pshRNAs followed by electroporation. pDNAs were administered at day 0, 3 and 12 after the initiation of the therapeutic treatment. The results are expressed as the mean \pm S.E. ($n=4$). $*p<0.05$ for Student's t -test versus control group. (b-d) Photographic image of tumor tissue of mice who received an intratumoral injection of control pDNA (b), pshRNA targeting β -catenin (c) or pshRNA targeting HIF1 α (d) at 18 days after initiation of therapeutic treatment. Cited from Ref. 20).

で、その遺伝子発現抑制効果を利用したがん治療の可能性について評価した。すなわち局所腫瘍モデルと同様に、マウス結腸がん細胞株 Colon26 細胞を門脈より移植することで作製した肝転移腫瘍モデルにおける β -catenin 又は HIF-1 α を標的とする pshRNA のがん細胞増殖抑制効果について調べた。培養 Colon26 細胞を用いた *in vitro* の系においては β -catenin を標的とする pshRNA の方が HIF-1 α を標的とする pshRNA より強力ながん細胞増殖抑制効果を示している。両 pshRNA の物性はほぼ同じであるため肝臓中のがん細胞へのデリバリー効率は同程度であると考えられることから、 β -catenin を標的とする pshRNA の方が肝転移性腫瘍モデルにおけるがん細胞増殖抑制効果は高いと考えられる。しかしながら β -catenin を標的とする pshRNA の投与ではがん細胞増殖抑制効果はほとんど認められなかった一方で、HIF-1 α を標的とする pshRNA を投与したところがん細胞の増殖を効率よく抑制可能であった。このことから、肝臓中のがん細胞内の遺伝子発現抑制以外の要因が肝臓における RNA 干渉の誘導によるがん細胞増殖抑制効果に関与していると推察される。その一因として、ハイドロダイナミクス法を用いることで肝臓中のがん細胞にデリバリー可能ではあるが、投与された pshRNA は肝臓

中の正常細胞へもデリバリーされることから、がん細胞のみならず正常細胞における遺伝子発現の抑制ががん細胞の増殖抑制につながったのではないかという仮定が考えられる。詳細については現在検討中である。

全身投与によりがん細胞において RNA 干渉を誘導することによりがん細胞の増殖抑制を試みた検討としては、siRNA 単独投与又はカチオン性物質/siRNA コンプレックスの投与によるものが報告されている。Mook らは、large subunit of RNA polymerase II を標的とする naked siRNA を尾静脈より投与することで、マウス皮下に作製した腫瘍の増殖を有意に抑制可能であることを報告している。²³⁾ また、EphA2 を標的とする naked siRNA を用いた同様の検討結果も報告されている。²⁴⁾ Pal らは Raf を標的とする siRNA をカチオン性リポソーム/siRNA コンプレックスの形で静脈内投与することにより、マウス皮下に移植したがん細胞における Raf の遺伝子発現及び腫瘍組織の増殖を抑制可能であることを報告している。²⁵⁾

また、がん細胞以外の細胞も RNA 干渉の標的細胞とした検討が Santel らにより報告されている。²⁶⁾ 彼らは、腫瘍組織内の血管内皮細胞における CD31 の発現をカチオン性リポソーム/siRNA を用いて抑

制することにより、腫瘍組織における血管新生並びに腫瘍組織の増殖を抑制可能であることを示している。一般にがん細胞は遺伝子の変異が起こり易いため、RNA 干渉による遺伝子発現抑制に対する耐性を獲得する可能性が考えられるが、それと比較して血管内皮細胞のような正常細胞は遺伝子発現の変異は起こり難いため、彼らの結果は正常細胞を標的とすることによる耐性を生じ難い新しい治療法の可能性を示すと考えられる。

4. おわりに

がん細胞特異的に発現している特定の分子を標的とした分子標的治療の実現が望まれており、特定の mRNA を特異的に分解する RNA 干渉は最も有望視される方法の 1 つである。しかしながら、その実現には siRNA あるいは shRNA 発現ベクターを標的細胞（主にがん細胞）に効率よくデリバリーする方法論の開発が不可欠である。一般にがん治療を目的とした場合にはがん細胞に対する RNA 干渉誘導効率が治療効果を左右する大きな要因となることが多いため、研究開発が進むにつれて、RNA 干渉によるがん治療の可能性だけでなく、その限界も明らかとなってきた。標的細胞群の一部において RNA 干渉を誘導することで治療効果が得られる場合、RNA 干渉を利用するシステムは非常に優れた治療法になる可能性がある。今後は治療遺伝子の投与や、DNA ワクチンによる抗原デリバリーなどと組み合わせることで、RNA 干渉により治療効果が増大できるものと期待する。

REFERENCES

- 1) Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., *Nature*, **391**, 806–811 (1998).
- 2) Zamore P. D., Tuschl T., Sharp P. A., Bartel D. P., *Cell*, **101**, 25–33 (2000).
- 3) Tuschl T., Zamore P. D., Lehmann R., Bartel D. P., Sharp P. A., *Genes Dev.*, **13**, 3191–3197 (1999).
- 4) Gong H., Liu C. M., Liu D. P., Liang C. C., *Med. Res. Rev.*, **25**, 361–381 (2005).
- 5) Rye P. D., Stigbrand T., *Tumour Biol.*, **25**, 329–336 (2004).
- 6) Zeng Y., Cullen B. R., *RNA*, **8**, 855–860 (2002).
- 7) Braasch D. A., Liu Y., Corey D. R., *Biochemistry*, **42**, 7967–7975 (2003).
- 8) Xia H., Mao Q., Paulson H. L., Davidson B. L., *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1006–1010 (2002).
- 9) Miyagishi M., Taira K., *Nat. Biotechnol.*, **20**, 497–500 (2002).
- 10) Marshall E., *Science*, **287**, 565–567 (2000).
- 11) Marshall E., *Science*, **286**, 2224–2245 (1999).
- 12) Marshall E., *Science*, **298**, 34–35 (2002).
- 13) Nishikawa M., Huang L., *Hum. Gene Ther.*, **12**, 861–870 (2001).
- 14) Takahashi Y., Nishikawa M., Kobayashi N., Takakura Y., *J. Control. Release*, **105**, 332–343 (2005).
- 15) Takahashi Y., Yamaoka K., Nishikawa M., Takakura Y., *Biotechnol. Bioeng.*, **93**, 816–819 (2006).
- 16) Sakai M., Nishikawa M., Thanaketpaisarn O., Yamashita F., Hashida M., *Gene Ther.*, **12**, 607–616 (2005).
- 17) McCaffrey A. P., Meuse L., Pham T.-T. T., Conklin D. S., Hannon G. J., Kay M. A., *Nature*, **418**, 38–39 (2002).
- 18) Hirata K., Nishikawa M., Kobayashi N., Takahashi Y., Takakura Y., *J. Pharm. Sci.*, **96**, 2251–2261 (2007).
- 19) Kobayashi N., Kuramoto T., Yamaoka K., Hashida M., Takakura Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **297**, 853–860 (2001).
- 20) Takahashi Y., Nishikawa M., Takakura Y., *J. Control. Release*, **116**, 90–95 (2006).
- 21) Kim W. J., Christensen L. V., Jo S., Yockman J. W., Jeong J. H., Kim Y.-H., Kim S. W., *Mol. Ther.*, **14**, 343–350 (2006).
- 22) Chae S. S., Paik J. H., Furneaux H., Hla T., *J. Clin. Invest.*, **114**, 1082–1089 (2004).
- 23) Mook O. R., Baas F., Wissel M. B., Fluiters K., *Mol. Cancer Ther.*, **6**, 833–843 (2007).
- 24) Duxbury M. S., Ito H., Zinner M. J., Ashley S. W., Whang E. E., *Oncogene*, **23**, 1448–1456 (2004).
- 25) Pal A., Ahmad A., Khan S., Sakabe I., Zhang C., Kasid U. N., Ahmad I., *Int. J. Oncol.*, **26**, 1087–1091 (2005).
- 26) Santel A., Aleku M., Keil O., Endruschat J., Esche V., Durieux B., Löffler K., Fechtner M., Röhl T., Fisch G., Dames S., Arnold W., Giese K., Klippel A., Kaufmann J., *Gene Ther.*, **13**, 1360–1370 (2006).