

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20800066
 研究課題名（和文） 脳指向性 DDS における血液脳関門透過機構解明による新規プリオン病治療法の開発
 研究課題名（英文） Delivery of siRNA to central nervous system via blood-brain barrier transport: Therapy for prion disease
 研究代表者
 渡辺 拓也（WATANABE TAKUYA）
 福岡大学・薬学部・助教
 研究者番号：90509647

研究成果の概要(和文):作用特異性を有する siRNA と脳指向性を有する RVG-9R を組み合わせ、これらの複合体による有効なプリオン病治療法の開発を試みた。まず、プリオン mRNA を knock-down する siRNA を確立した。また、siRNA/RVG-9R 複合体は細胞へ移行することが認められた。しかし、この複合体をプリオン感染細胞に処置したが、異常型プリオン蛋白の減少は認められなかった。RVG-9R の構造最適化により、siRNA/RVG-9R 複合体の knock-down 効果改善が期待される。

研究成果の概要 (英文) : This study aimed to develop new therapy for prion disease without side effects, using a complex of siRNA and RVG-9R. The siRNA decreased expression of prion mRNA and prion protein of scrapie form (PrP^{Sc}). And siRNA/RVG-9R complex bound to cell. However, treatment of siRNA/RVG-9R complex did not affect PrP^{Sc} level in prion-infected cell culture. Sequence of RVG-9R needs to optimize for knock-down of prion.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：薬学、感染症

1. 研究開始当初の背景

(1) クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) に代表されるプリオン病は致死性神経変性疾患であり、中枢神経系に異常型プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) が蓄積し神経細胞死を惹起することにより発症する。プリオン病治療を目指す抗体医薬・新規化合物の探索あるいは遺伝子

治療法の開発が精力的に進められている。現在、国内で社会問題化している汚染硬膜移植による医原性プリオン病の早期治療や予防的治療法の確立は、特に緊急を要する重要課題である。

(2) 福岡大学薬学部では、福岡大学病院に

において実施されたクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) に対するキナクリン及びペントサン硫酸の臨床研究に参加・協力するなど、現在までにプリオン病治療において薬物動態学的側面より研究が展開されてきた。しかし、いずれの薬物についても治療効果をあげるまでには至っていない。この要因として各薬物の脳移行性や作用特異性の問題点が挙げられる。薬物を脳特異的に送達する技術が開発できれば、臨床研究において治療効果をあげることが可能となる。

2. 研究の目的

作用特異性を有し次世代型バイオ医薬品として期待される siRNA に着目し、脳特異的に siRNA を送達する方法を開発し、プリオン病の病因分子の核となるプリオン蛋白産生を抑制することを主眼とした実験的治療の可能性を追求することを企てた。

3. 研究の方法

(1) プリオン蛋白 (PrP) 発現量の検討
神経細胞株 Neuro2a, GT1-7 細胞とプリオン持続感染細胞株 GT/FK 細胞に、PrP mRNA を標的とした small interfering RNA (siRNA) を導入し、任意の時間で PrP mRNA と PrP を回収した。PrP mRNA 発現量は real-time PCR 法を用いて、PrP 発現量は western blot 法を用いて行った。PrP^{Sc} 発現量を解析する時は、Proteinase K 処理を行うことにより、PrP^C の分解を行った。

(2) RVG-9R, RVMAT-9R の合成

Fmoc 基で保護したアミノ酸を用いたペプチド固相合成法を用いて、ペプチドを合成した。合成したペプチドは HPLC を用いて分離精製し、MALDI-TOF-MS を用いて確認を行った。

(3) siRNA/RVG-9R 複合体形成の解析 (gel-shift assay)

siRNA と RVG-9R, RVMAT-9R を混合したものをアガロースゲル電気泳動し、複合体の形成を確認した。

(4) siRNA/RVG-9R 複合体の細胞移行の解析
蛍光標識した siRNA (siPrP-Alexa488) と RVG-9R, RVMAT-9R を混合したものを、細胞に処置し、一定時間後、蛍光顕微鏡で観察またはフローサイトメーターで解析した。

4. 研究成果

(1) 有効な siRNA を確立するため、導入剤に lipofectamine を用いて PrP の knock-down 効果が予測される 5 種類の配列の siRNA を検討した。Neuro2a 細胞 (非感染細胞) の正常型 PrP の western blot 法を用いた解析では、2 つの siRNA において PrP の knock-down 効果

が認められたが、そのうち 1 つは off-target 効果が認められた。off-target 効果がなく、PrP の knock-down 効果が認められた siRNA (siPrP) を今後用いることとした。siRNA は mRNA を標的としているため、実際に PrP mRNA が減少しているか、real-time PCR 法を用いて、siPrP の効果を検討した。無処置のものと比較して、siPrP/lipofectamine は 90% 近く PrP mRNA を減少させた。siPrP が異常型 PrP を減少させるか検討するため、感染細胞 (GT/FK) を用いて、異常型 PrP の発現量を western blot 法で解析した結果、siPrP/lipofectamine は異常型 PrP の発現量を減少させた (図 1)。

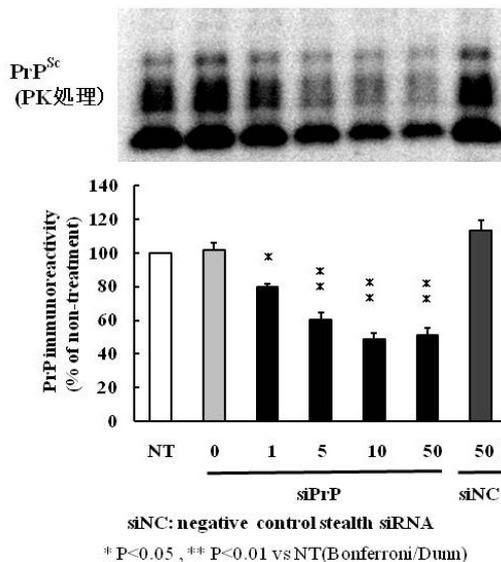


図1 siRNA (siPrP) による PrP の knock-down 効果

(2) RVG-9R と siPrP の結合能を gel-shift assay を用いて検討した。この際、9R の立体異性体の違い (d, l) による siPrP との結合能も確認したところ、d 体は l 体よりも結合能がわずかに高く、siPrP:RVG-9R=1:50 で結

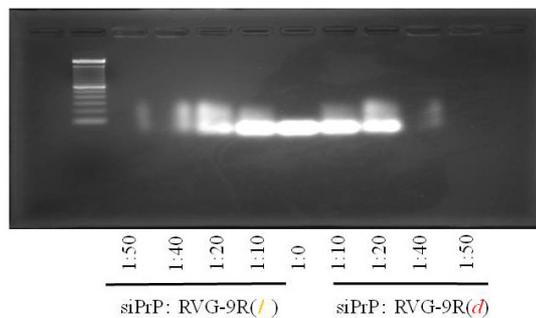


図2 RVG-9R の siPrP との結合能

合した (図2)。

(3) siPrP/RVG-9R 複合体による PrP knock-down 効果を検討するため、siRNA と RVG-9R を 1:50 の割合で混合した siRNA/RVG-9R 複合体を GT/FK 細胞に処置した。しかし、PrP mRNA 量 (処置後 24 時間)・PrPSc 発現量 (48, 72 時間) は減少しなかった (図3)。RVG-9R 濃度増加は細胞死を誘発するため、siRNA と RVG-9R の混合比を変え 1:20 の割合で検討したが、PrPSc 発現量に影響しなかった。また、9R の立体異性体 (d, 1) の RVG-9R(1) を検討したが、PrPSc 発現量に影響しなかった。

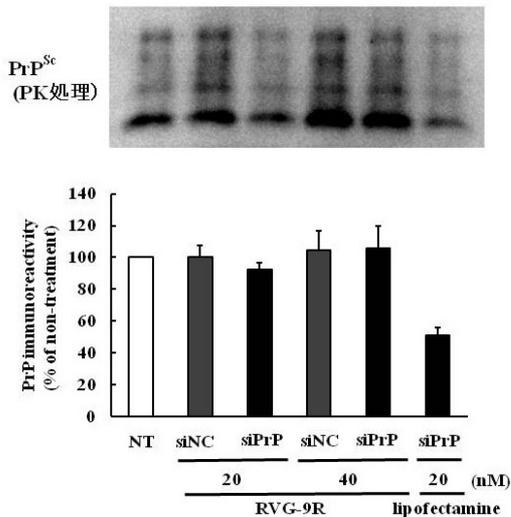


図3 PrP に対する siPrP/RVG-9R の効果の検討

標的分子の違いによる影響を検討するため、GAPDH を標的とした siRNA を用いて RVG-9R/siRNA 複合体の knock-down 効果を解析した。Lipofectamine による導入は GAPDH mRNA 量を減少したが、RVG-9R による導入は GAPDH mRNA 量に影響しなかった。

(4) siPrP/RVG-9R 複合体による knock-down 効果が認められないため、実際にこの複合体が細胞に移行しているか、蛍光顕微鏡とフローサイトメーターを用いて解析を行った。蛍光標識 siPrP と RVG-9R を用いてフローサイトメトリーを行った結果、蛍光標識 siPrP は細胞に移行していた (図4)。また、コントロールペプチドである RVMAT-9R では細胞移行は認められなかった (図5)。

本研究では、当初の目標であった脳指向性 siPrP/RVG-9R 複合体による新規プリオン病治療法の開発には至らなかった。本研究においては、siPrP/RVG-9R 複合体は細胞に移行するが、knock-down 効果が認められないことから、RVG-9R は siRNA のキャリアーとしては不

十分であった。今後、RVG-9R の構造を最適化することにより、キャリアーとしての作用改善ならびに血液脳関門透過機構解析に用いられることが期待される。

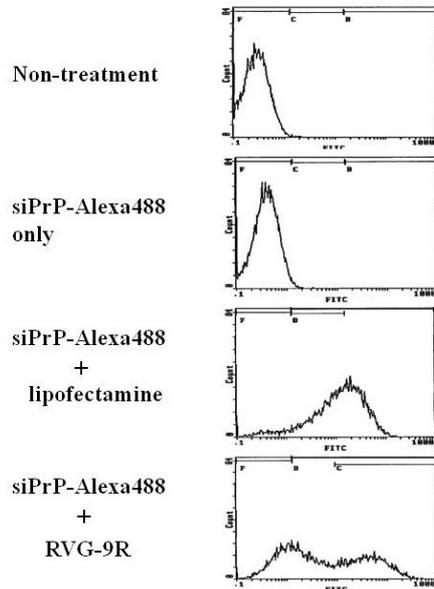


図4 siPrP/RVG-9R複合体の細胞への結合

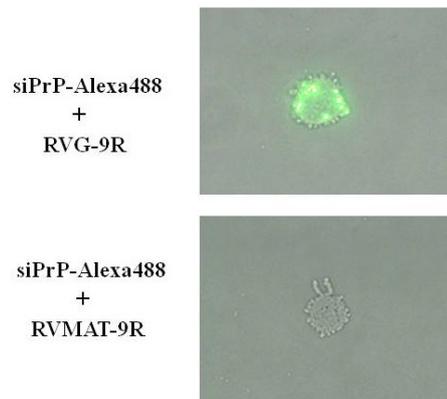


図5 siPrP複合体の細胞への結合 (RVG-9R vs RVMAT-9R)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計1件)

- ① Sumi N, Nishioku T, Takata F, Matsumoto J, Watanabe T, Shuto H, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y. Lipopolysaccharide-activated microglia induce dysfunction of the blood-brain barrier in rat microvascular endothelial cells co-cultured with

microglia. Cell Mol Neurobiol. 査読有,
vol.30, No.2, 2010, 247-253

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 拓也 (WATANABE TAKUYA)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：90509647

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：