

令和元年6月27日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20267

研究課題名(和文) siRNA・アテロコラーゲン複合体を用いた全く新しい緑内障治療薬の開発

研究課題名(英文) Investigation for a novel glaucoma treatment drug with siRNA-atelocollagen complex.

研究代表者

石川 慎一郎 (Ishikawa, Shinichiro)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：00404129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障は慢性進行性の視神経節細胞のアポトーシスを原因とする疾患であり、本邦の中途失明の原因として最多である。以前の研究でアポトーシスの抑制に、Caspase3, 9に対するsiRNAを導入することで、実験的な緑内障モデルで視神経節細胞のアポトーシスが抑制されることが知られていた。一方でsiRNAは生体内で容易に分解されることから、薬剤として用いるためには、効果を維持させる方法の確立が必要であった。本研究では、siRNAを生体内で安定化させるアテロコラーゲンとの複合体を用いて、生体内で毒性がないこと、眼内で安定すること、アポトーシスの抑制が示唆されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は慢性疾患であり、70歳以上では10人に1人が罹患する疾患であり、今後の高齢化によりより多くの人が罹患すると考えられる。現在のところ、唯一エビデンスを有する緑内障治療は、眼圧を下降させることであるが、眼圧下降を行っても、なお視野障害が進行する症例が存在し、眼圧下降以外の治療法の開発が求められている。特に日本人の緑内障では眼圧が低いにも関わらず、視野障害が進行する正常眼圧緑内障が最多であり、あたらしい治療法の必要性が高い。本研究ではアテロコラーゲンとcaspaseに対するsiRNAが神経保護効果を示唆する成果が得られており、将来的な製剤開発の基礎となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Glaucoma is a disease caused by chronic progressive apoptosis of optic ganglion cells and is the most frequent cause of blindness in Japan. In previous studies, it was known that introducing siRNA against Caspase 3 and 9 suppresses apoptosis of optic ganglion cells in an experimental glaucoma model in suppressing apoptosis. On the other hand, since siRNA is easily degraded in vivo, it has been necessary to establish a method for maintaining the effect for use as a drug. In this study, we confirmed that there is no toxicity in vivo, stability in the eye, and suppression of apoptosis using a complex with atelocollagen that stabilizes the siRNA in vivo.

研究分野：緑内障

キーワード：神経保護 網膜 caspase

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

緑内障は慢性疾患であり、70歳以上では10人に1人が罹患する疾患であり、今後の高齢化によって、より多くの人々が罹患すると考えられる。現在のところ、唯一エビデンスを有する緑内障治療は、眼圧を下降させることであるが、眼圧下降を行っても、なお視野障害が進行する症例が存在し、眼圧下降以外の治療法の開発が求められている。特に日本人の緑内障では眼圧が低いにも関わらず、視野障害が進行する正常眼圧緑内障が最多であり、あたらしい治療法の必要性が求められていた。

### 2. 研究の目的

Caspase はアポトーシスに至る経路を担っており、これを阻害することでアポトーシスが抑制されることが知られている。Caspase の阻害の方法の一つとして、Caspase に対する siRNA を導入する方法が報告されていたが、siRNA は生体内で容易に分解されることから、製剤として用いるために安定した作用を生体内で保つ必要があった。本研究では siRNA とアテロコラーゲンの複合体を実験的な緑内障モデルに用いて、生体内で効果が維持されることを目的とした。

### 3. 研究の方法

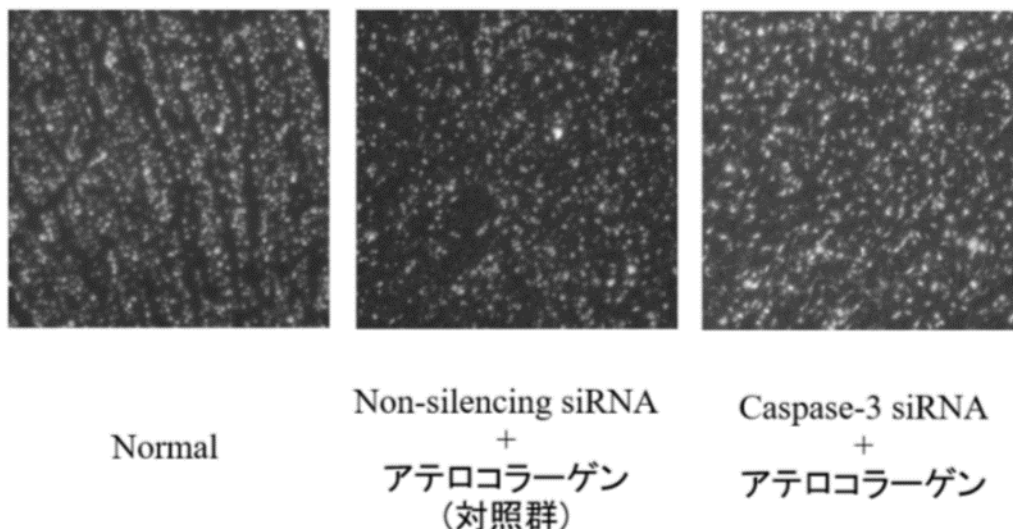
1) Wister ラットの眼内に、Caspase3 に対する siRNA を修飾したアテロコラーゲンの導入を行い、110mmHg の加圧を 60 分間行い、虚血再灌流モデルを作成した。視神経節細胞数はラットの上丘にフルオロゴールドを虚血再灌流直前に導入した。4%パラホルムアルデヒドにて網膜を固定後、眼球摘出を行い、網膜伸展標本を作成し、蛍光顕微鏡下で 1 mm × 1mm の範囲で蛍光標識されている視神経節細胞数を、視神経付近、視神経と赤道部、赤道部付近から 4 カ所で計測し、細胞の異型性、視神経節細胞数について観察を行うことにより、評価を行った。

2) Wister ラットの眼内に、アテロコラーゲンを硝子体に導入した。その後、網膜 4%パラホルムアルデヒドにて網膜を固定後、眼球摘出を行い、網膜伸展標本を作成し、蛍光顕微鏡下で 1 mm × 1mm の範囲で蛍光標識されている視神経節細胞数、アテロコラーゲン被覆部分と非被覆部分で 4 カ所計測し、細胞の異型性、視神経節細胞数について観察を行うことにより、評価を行った。

### 4. 研究成果

1) Caspase3 に対する siRNA とアテロコラーゲンの複合物を用いた群では、虚血再灌流による視神経節細胞数の減少が Caspase に対する抑制効果を有しない、non-silencing siRNA 群と比較して、減少する傾向を認めた(図1)。この結果から、Caspase3 とアテロコラーゲンの複合体は、Caspase3 に対する siRNA の神経保護効果を維持することが示唆され、Caspase3 に対する siRNA 単体使用と比較して、製剤として使用する場合に負担となる、投与回数的大幅な減少を達成することが可能であることが示された。

図1



2) アテロコラーゲン複合体の眼内への導入は、30G の針を用いて容易に可能であり、刺入部の縫合処置などは必要でなく、導入後の創部に炎症所見は認めなかった。導入後の観察において、アテロコラーゲンは網膜上に安定した性状で保持されており(図2)、アテロコラーゲン被覆部分と非被覆部分で、視神経節細胞数に有意差は認めなかった。細胞の異形成についての検証においても、被覆部分と非被覆部分において際は認められなかった(図3)。これらの性質から今回検討した、Caspase3 に対する siRNA のみにとどまらず、広範な siRNA においても同様に網膜に障害を与えずに、効果を発現することが期待されることから、今後の製剤開発にあたって広く有用な手段であることが示された。

図2 アテロコラーゲン投与後の性状評価

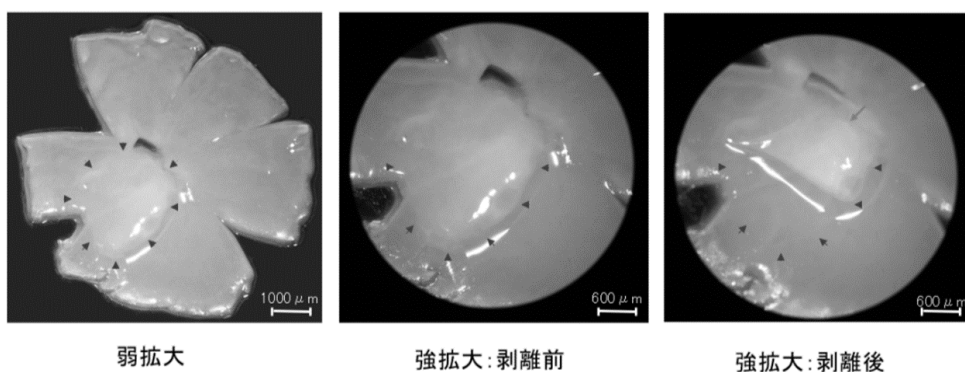
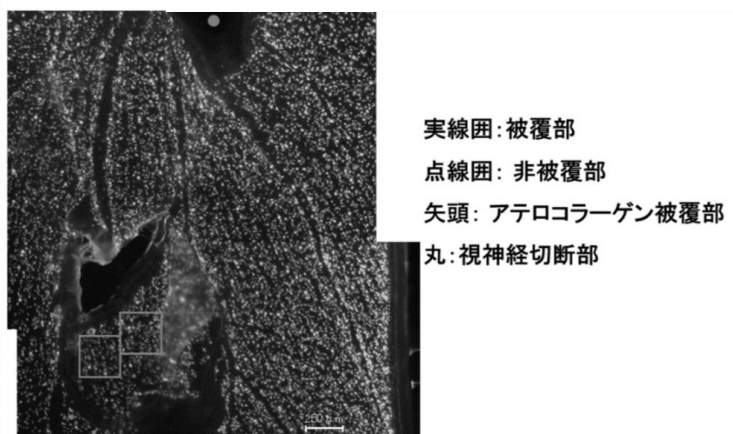


図3 アテロコラーゲン被覆、非被覆部の性状評価



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Ishikawa Shinichiro, Development and evaluation of the novel fundus oximetry. ARVO 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。