

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15590

研究課題名(和文)核酸の全身投与による炎症性腸疾患の治療開発

研究課題名(英文)Systemic delivery of microRNA for therapy of IBD

研究代表者

山本 浩文(Yamamoto, Hiofumi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30322184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：この研究は、クローン病や潰瘍性大腸炎などの難治性の炎症性腸疾患に対して核酸という新しい治療法を開発することを目的として実施された。2%デキストラン硫酸ナトリウムはマウスに実験的な腸炎を引き起こす。スーパーアパタイトに搭載したmiR-29を静注することで腸管の炎症を阻止できた。これは、デリバリーシステムが重要な役割を演じており、炎症腸管の樹状細胞という免疫応答の司令塔に核酸を送達できるシステムが功を奏していることが明らかとなっている。すなわち、樹状細胞を起点とする初期免疫応答がmiR-29によって抑制され、それに続く炎症カスケードが遮断されることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Although anti-TNF antibodies and immunosuppressive agents can achieve remission, recurrence is common in inflammatory bowel disease (IBD). Accordingly, novel therapeutic strategies are needed. The aim of this study was to establish microRNA-based therapy in an IBD model. For this purpose, we used microRNA-29 (miR-29) and a super carbonate apatite (sCA) nanoparticle as a drug delivery system. Injection of sCA-miR-29a-3p or -29b-3p into the tail veins of mice markedly prevented inflammation due to dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis. We found that sCA-negative control miR predominantly accumulated in CD11c+ dendritic cells (DCs) in the inflamed epithelium. RNA sequencing and Ingenuity Pathway Analysis revealed that miR-29a or -29b could inhibit interferon signaling pathways. Injection of sCA-miR-29b efficiently targeted CD11c+DCs in the inflamed mucosa. The present study showed that systemic delivery of miR-29 prevented DSS-induced colitis.

研究分野：消化器疾患

キーワード：炎症性腸疾患 マイクロRNA 樹状細胞 スーパーアパタイト

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease: IBD) であるクローン病や潰瘍性大腸炎は本邦において患者数が右肩上がりに上昇の一途をたどっている。これらの疾患は、様々な炎症性メディエーター (TNF、IL6、IL12/23、IL10 など) が腸管壁を傷害して発症するのでサイトカインのシグナル経路が治療標的となり、抗 TNF 抗体であるレミケードを始めとする各種の抗サイトカイン療法やサリチル酸やステロイドなどの古典的な薬物治療によって一時的に緩解を得られる場合もあるが、一方で toxic megacolon や腸管穿孔、狭窄などによって外科治療の対象となる患者も後を絶たず、これらの難治性腸疾患には新たな治療法の開発が継続的に求められている。

2. 研究の目的

私達は、静注による全身投与で核酸を効果的に腫瘍に送達させるスーパーアパタイトナノ粒子法を開発し、胆癌動物において様々な siRNA や microRNA と静脈投与することでその治療効果を実証してきた^{1,2}。ある種の炎症性サイトカインの調節に microRNA が関与していることが明らかとなっており³⁻⁵、我々はこれらの microRNA や siRNA をスーパーアパタイトナノ粒子 (sCA) に搭載し、炎症組織への核酸デリバリーに応用して、制御不能な IBD に対して新たな治療法を開発することに挑戦すべく本研究を計画した。

3. 研究の方法

腸炎マウスモデルは 7 週齢 BALB/c マウスを用いて 2% デキストラン硫酸ナトリウムを自由給水により与えることで作成した (DSS マウス)。今回 sCA に搭載する microRNA としては、文献的に炎症性サイトカインを標的としてこれを抑制することが知られている miR-29a 及び miR-29b を選別した³⁻⁵。

(1) DSS の投与開始から 4 日後、6 日後の大腸における miR-29a 及び miR-29b の発現量を定量的 PCR によりコントロール群 (DSS 非投与群) と比較する。更に、sCA に搭載した miR-29a、miR-29b を尾静脈あるいは皮下に注入する。数時間後に、注入した microRNA の発現が DSS マウスの大腸で増加することを確認する。

(2) DSS 投与 miR-29a、miR-29b 投与群、DSS 投与 miR-NC (negative control) 投与群、DSS 投与単独群、DSS 非投与群を準備する。miRNA の投与群では DSS 投与後 1 日、2 日、3 日、5

日で、それぞれの miRNA を sCA に搭載して尾静脈あるいは皮下に注入する。9 日後に犠牲させ腸管を採取する。それぞれのマウスの体重や腸管長、腸管 HE (Hematoxylin-Eosin) 標本の組織学的解析による Histological score を測定する⁶ ことで、miR-29a や miR-29b の DSS 誘発性腸炎に対する予防効果を評価する。

(3) 蛍光色素 (Alexa647) で標識した miR-29b を sCA に内包し、DSS を 7 日間投与したマウスの尾静脈に投与する。4 時間後に腸管内の miR-29b の局在を観察し、miR-29b が腸管の細胞に取り込まれていることを確認する。更に、蛍光免疫染色により miR-29b を取り込んだ細胞を決定する。AutoMACS Pro により決定した細胞を回収し、その細胞において、miR-29b の発現量が上昇していることを定量的 PCR により確認する。

(4) (3) で決定した細胞において、sCA に内包した miR-29b の DSS マウスへの投与が、miR-29b により発現調節されている IL-23³ や腸管内のナイーブ T 細胞の Th17 への分化を誘導する IL-6 や TGF- β の発現に及ぼす影響を定量的 PCR により解析する。

(5) (3) で明らかとなった局在が miR-29b に特異的なものであるか否かを調べる。Alexa647 標識 miR-NC (negative control) を sCA に搭載し尾静脈に注入する。注入後 4 時間で、miR-NC の局在を蛍光免疫法及び定量的 PCR により解析する。更に DSS 誘発性腸炎がこの miR-NC の局在に及ぼす影響について調べる。

(6) DSS 投与 miR-29a、miR-29b 投与群、DSS 投与 miR-NC 投与群、DSS 非投与群の間で発現量の変化が認められる mRNA を Illumina HiSeq 2500 システムを用いて同定する。更に IPA (Ingenuity Pathway Analysis) により、DSS マウスで変化するシグナル経路を解析し、sCA-miR-29a や sCA-miR-29b の投与がこれらのシグナル経路に及ぼす影響について調べる。

4. 研究成果

(1) DSS マウスの腸管における miR-29b の発現量を調べたところ、DSS 投与後 4 日、6 日でコントロール群と比べて減少していることが明らかとなった。更にこの減少は sCA-miR-29b の尾静脈投与により回復することが解った。これらの結果から、DSS マウスの腸管では miR-29b の発現が低下しており、sCA-miR-29b の投与により回復することが分かった。

(2) 次に sCA-miR-29a や sCA-miR-29b の尾静脈への投与が DSS 誘発性の腸炎に及ぼす影響について調べた。DSS 投与 miR-NC 投与群、DSS

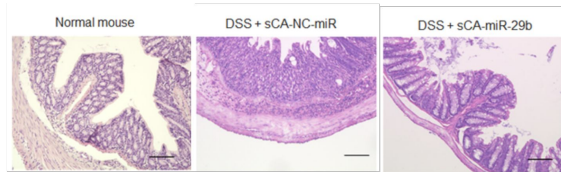


図1) 未処理 (左)、DSS投与 sCA-miR-NC (中央)、DSS投与 sCA-miR-29b (右) マウスの腸管をHE染色した。

投与単独群では体重の減少や腸管長の収縮が認められたが、sCA-miR-29a や sCA-miR-29b によりこれらの減少が緩和された。更に組織学的評価において Histological score の有意な低下が認められた (図 1, 2)。同様の結果は sCA-miR29a や sCA-miR29b の皮下注射でも認められた。これらの結果から、sCA-miR-29a や sCA-miR-29b は DSS 誘発性腸炎に予防効果を示すことが明らかとなった。

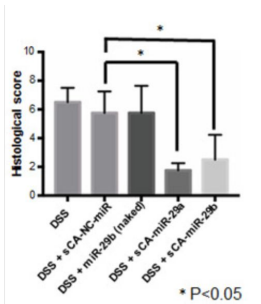


図2) DSS投与、DSS投与 sCA-miR-NC、DSS投与 miR-29b、DSS投与 sCA-miR-29a、DSS投与 sCA-miR-29b マウスの腸管の Histological scoreを示す。 *P<0.05

(3) マウスに投与した miR-29b が腸管の細胞に取り込まれているか、更に取り込まれている場合はどの細胞に取り込まれているかを調べるために、sCA に内包した Alexa647 標識 miR-29b (Alexa647-miR-29b) を DSS マウスの尾静脈に投与し、4 時間後に腸管内の Alexa647-miR-29b の局在を観察した。その結果、Alexa647-miR-29b が腸管の細胞に取り込まれていることが解った。更に

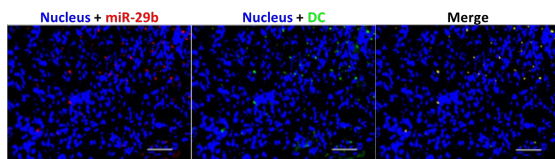


図3) DSSマウスにsCA-Alexa647-miR-29bを皮下注射し4時間後の腸管におけるCD11c (+) 細胞 (DC: 緑) とAlexa647-miR-29b (赤) の局在を観察した。

Alexa647-miR-29b を取り込んだ細胞を CD11c 抗体を用いた蛍光免疫染色で調べると、腸管に存在する樹状細胞 (DCs: Dendritic cells) に局在していることが明らかになった (図 3)。AutoMACS Pro により分取分離した CD11c 陽性の腸管 DCs を用いて miR-29b の定量 PCR を行うと、sCA-miR-29b の投与により CD11c 陽性の DCs で特に増加することが明らかと

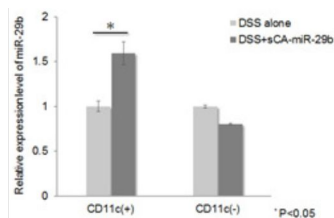


図4) CD11c (+) 細胞とCD11c (-) 細胞を分取しmiR-29bの発現量を定量的PCRにより解析した。

なった (図 4)。これらの結果から、sCA-miR-29b は炎症腸管の DCs に効率よく miR-29b を輸送することが分かった。

(4) miR-29a 又は miR-29b が腸管 DCs の炎症性サイトカインの発現に及ぼす影響を調べるために、DSS 投与単独群、DSS 投与 miR-29a

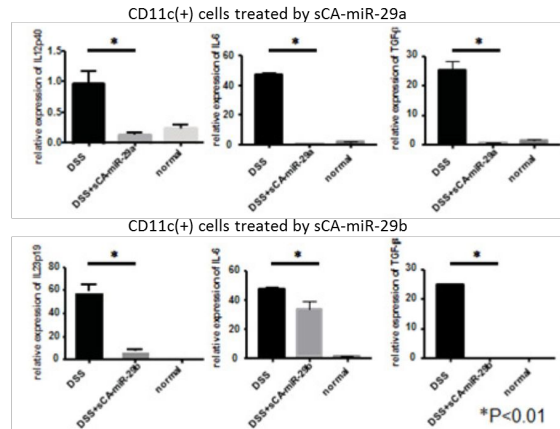


図5) DSSのみ投与群、DSS投与miR-29a (上図) 又はmiR-29b投与群 (下図)、DSS非投与群の腸管DCsにおける、IL-6、IL12p40 (上図)、IL23p19 (下図)、TGF-βのmRNA量を定量的PCRにより解析した。

又は miR-29b 投与群、DSS 非投与群の腸管から DCs を分離し、IL-6、IL12p40、IL23p19、TGF-β の発現量を解析すると、DSS 投与単独群においてこれらのサイトカインの増加が認められるが、DSS 投与 miR-29a 又は miR-29b 投与群では DSS 非投与群程度までこれらのサイトカインの発現が減少していることが明らかとなった (図 5)。これらの結果から miR-29a や miR-29b は DSS 誘発性腸炎の DCs で IL-6、IL12p40、IL23p19、TGF-β の発現を抑制することが分かった。

(5) Alexa647-miR-29b は DSS マウスの腸管の DCs に局在していた。この現象が miR-29b に特異的なものかを miRNA 全般に共通で sCA のデリバリー性能によるものかを調べるために、マウスには存在しない miR-NC を Alexa647 標識し、その局在を蛍光免疫染色と定量的 PCR により解析した。その結果、Alexa647-miR-NC は DSS マウスの腸管 DCs に局在することが解った。更に DSS 誘発性の炎症が Alexa647-miR-NC の局在に及ぼす影響を調べたところ、Alexa647-miR-NC の DCs への局在は DSS 誘発性の炎症により増加することが明らかとなった。

(6) DSS 投与 miR-29a、miR-29b 投与群、DSS 投与 miR-NC 投与群、DSS 非投与群の間で発現量の変化が認められる mRNA を調べたところ、DSS 投与 miR-NC 投与群では DSS 非投与群に比べて Stat1 や Stat2、IRF7、IRF9、IFIT1 を含む I 型と II 型インターフェロンが誘導するシグナル経路に関わる因子の上昇が認められた。更に、これらの因子の多くは miR-29a、miR-29b の投与により減少した。これらの結果より、miR-29a や miR-29b は I 型及び II 型インターフェロンが誘導するシグ

ナル経路に関わる因子の発現を抑制することで、DSS 誘発性腸炎に対する予防効果を示すことを示唆するものであった。

以上の結果をまとめると、sCA に内包した miR-29a, miR-29b を尾静脈又は皮下へ投与することで、DSS 誘発性の腸炎を予防することができた。更に sCA が炎症腸管内の DCs へ miRNA を効率よく送達し、複数の炎症性サイトカインや I 型及び II 型インターフェロンのシグナル経路に関わる因子の発現を抑えることで、この予防効果を示すことが示唆された。これらの結果は sCA-miR-29a や sCA-mi-R29b は全身投与することで IBD の予防薬として機能することを示すものであった。

<引用文献>

1. Wu X, Yamamoto H, et al. Innovative Delivery of siRNA to Solid Tumors by Super Carbonate Apatite. PLoS One 2015;10:e0116022.
2. Ogawa H, Wu X, et al. MicroRNAs Induce Epigenetic Reprogramming and Suppress Malignant Phenotypes of Human Colon Cancer Cells. PLoS One 2015;10:e0127119.
3. Brain O, Owens BM, et al. The intracellular sensor NOD2 induces microRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release. Immunity. 2013;39(3):521-36.
4. Montgomery RL, Yu G, et al. MicroRNA mimicry blocks pulmonary fibrosis. EMBO Mol Med. 2014;6(10):1347-56
5. Nijhuis A, Biancheri P, et al. In Crohn's disease fibrosis-reduced expression of the miR-29 family enhances collagen expression in intestinal fibroblasts. Clin Sci (Lond). 2014;127(5):341-50.
6. Tomita T, Tsuchiya T, et al. MyD88-dependent pathway in T cells directly modulates the expansion of colitogenic CD4+ T cells in chronic colitis. J Immunol 2008;180:5291-9.

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 0 件)

投稿中

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：炎症性腸疾患の予防又は治療
発明者：山本浩文、他
権利者：同上
種類：特許
番号：2017-085318 号
出願年月日：2017 年 4 月 24 日
国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 浩文 (YAMAMOTO, HIROHUMI)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号： 30322184

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()