

令和元年6月13日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20371

研究課題名(和文)スーパーカーボネートアパタイトを用いたケロイド・肥厚性癬痕の核酸外用薬治療の確立

研究課題名(英文) Development of novel siRNA treatment using super carbonate apatite for keloid/hypertrophic scar

研究代表者

青木 雅代 (Aoki, Masayo)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：40465282

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)：我々は、マウス肥厚性癬痕モデルで、新たなsiRNA治療の効果を検討した。TIMP-1(コラーゲンの過剰沈着に關与する因子)の発現を抑制するsiRNA (siTIMP1) を、ナノ粒子スーパーカーボネートアパタイト(sCA) に包埋し投与した。siControl(siCON)-sCAまたはsiTIMP1-sCAを局所注射した。siTIMP1のグループは、siCONのグループに対して、有意な癬痕サイズの縮小を認めた。また、siTIMP1の癬痕で、1型および3型コラーゲンの有意なタンパク減少を認めた。siTIMP1-sCAは、ケロイド・肥厚性癬痕の新たな治療戦略として有望である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ケロイド・肥厚性癬痕は、非常に治りにくく、罹患者数も多い。しかし、主に有色人種に発生すること、ヒトにのみ発生し動物モデルがないことなどから、未だ発生機序は不明である。現在でも特に有効な治療法がなく、治療に長期間を要するため、より有効な治療薬の開発が望まれている。今回我々は、特定の遺伝子発現のみをノックダウンするsiRNAを用いた新たな治療方法について検討した。ケロイダルコラーゲンと呼ばれる、ケロイド内の固い線維を1週間ほどで分解・消失させることに成功した。この治療法は、ケロイドの治療期間を大幅に短縮し、クオリティオブライフの向上が見込まれる。さらなる検討と臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of novel siRNA therapy using mouse hypertrophic scar model. siTIMP1 (siRNA that suppresses the expression of TIMP-1 (a factor involved in excessive collagen deposition)) was encapsulated in nanoparticles; super carbonate apatites (sCA) and injected. Local injection of siControl(siCON)-sCA or siTIMP1-sCA were performed. The scar sizes were significantly smaller in the scars treated with siTIMP1 than those treated with siCON. Inhibited protein expressions of collagen type 1 and 3 were observed in the scars treated with siTIMP1. siTIMP1-sCA is promising as a novel therapeutic strategy for keloids and hypertrophic scars.

研究分野：形成外科学

キーワード：ケロイド・肥厚性癬痕 siRNA TIMP-1 ナノ粒子 細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

- (1) スーパーカーボネートアパタイト(sCA)は、簡便、低コストで安全性が高く、線維性病変への核酸送達も可能である。
- (2) sCA が表皮バリアを通過する可能性は大いにあり、より高い効率が期待される。
- (3) ケロイド・肥厚性瘢痕は慢性炎症を伴う皮膚の線維性病変であり、未だ有効な治療がない。
- (4) ナノ粒子を用いた核酸送達による抗線維化治療は、ケロイド・肥厚性瘢痕に最適である。線維性病変内部へアプローチするためには、ナノ粒子による送達が有効であると思われる。TIMPは、線維化に關与する因子である。われわれは、TIMP-1 siRNA の導入によりケロイドのコラーゲン線維が効果的に分解されることをすでに報告した (Aoki et al. J Invest Dermatol. 2014)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、安全で低コストの経皮核酸送達法を確立し、ケロイド・肥厚性瘢痕の核酸外用薬による治療を実現することである。具体的には、

- (1) スーパーカーボネートアパタイト(sCA)の経皮導入の有効性を検討する。
- (2) TIMP-1 siRNA-sCA の効果をマウス肥厚性瘢痕モデルで検討する。
- (3) TIMP-1 siRNA-sCA の効果を ex vivo ケロイド組織培養で検討する。

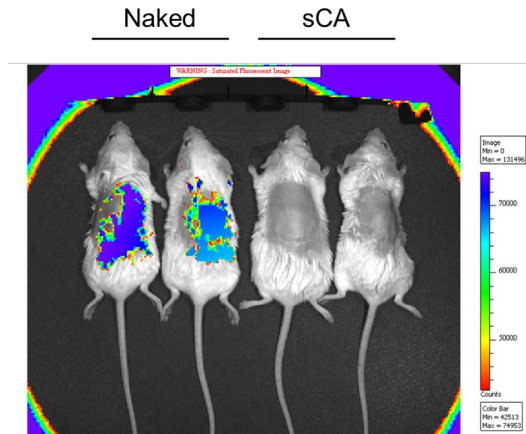
3. 研究の方法

- (1) マウスにおける sCA の表皮通過性の検討  
マウスを対照群 (Naked siRNA 群)、sCA 群 (siRNA-sCA 群) に無作為に分けた。Alexa Flour 710 でラベルした siRNA を用いた。100ug の siRNA を用いて sCA を作成し、約 250ml のワセリンベースの外用薬を作成した。イソフルラン全身麻酔下に、背部を除毛し 2×2cm マーキングをした。Naked siRNA または siRNA-sCA を、塗布した。In vivo imaging system (IVIS)にて蛍光を検出した。
- (2) マウス肥厚性瘢痕モデルにおける TIMP-1 siRNA 包埋 sCA の治療効果  
マウス肥厚性瘢痕モデルを作成し、TIMP-1 siRNA を、sCA を用いて導入した。sCA の表皮通過性が認められなかったため、局所注射にて行った。切開縫合後 6 日目より注射を開始した。1 日おきに 4 回行い、15 日目に瘢痕部をサンプルとして回収した。瘢痕のサイズを組織学的分析にて比較した。コラーゲンタイプ I および III のタンパク発現について、ウエスタンブロットにて検討した。
- (3) ex vivo ケロイド組織培養における TIMP-1 siRNA 包埋 sCA の治療効果  
手術により摘出され破棄されるケロイド組織の一部を提供していただき、ex vivo 組織培養を行った。1 日おきに 3 回、培養組織に注射を行い、7 日目にサンプルとして回収した。ケロイドの組織学的特徴であるケロイダル

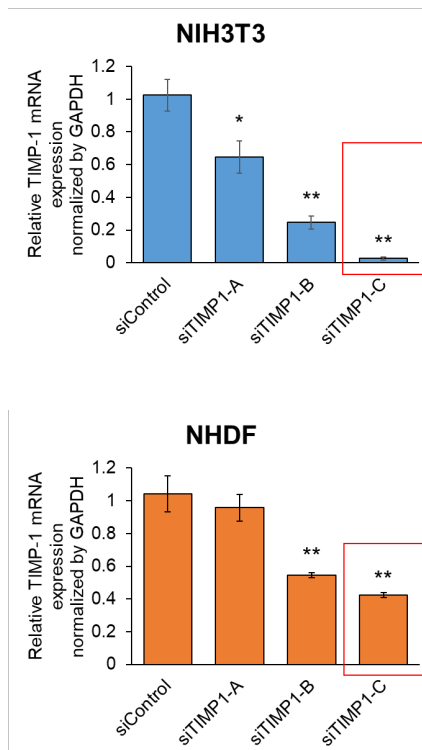
コラーゲンについて、HE 染色とマッソズトリクローム染色を用いて評価した。

4. 研究成果

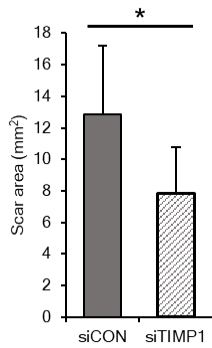
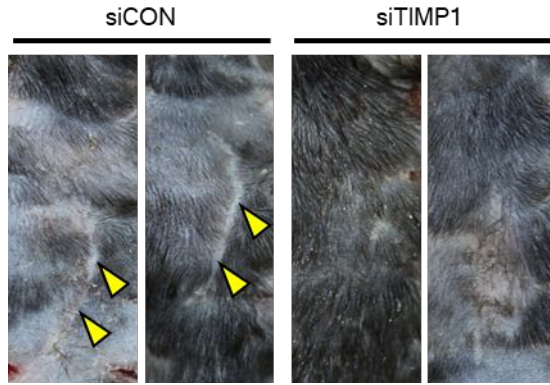
- (1) Naked siRNA を塗布したマウスは蛍光が検出されたが、sCA-siRNA を塗布したマウスでは検出されなかった。よって、sCA の表皮透過性は期待できないため、局所注射による投与方法へ切りかえた。



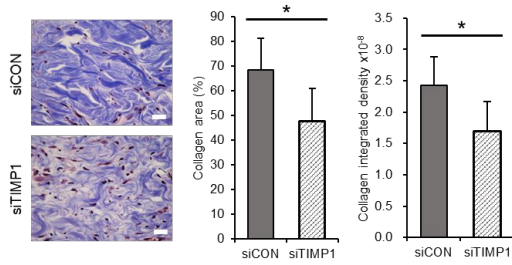
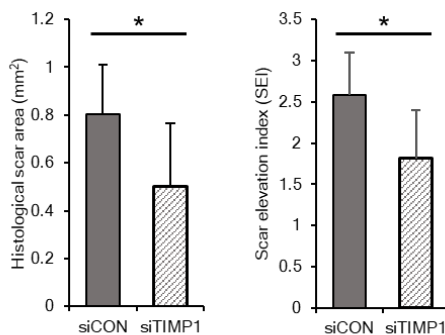
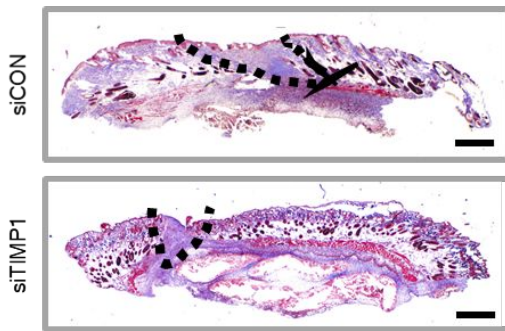
- (2) ヒトおよびマウスの両方にホモロジーを持つ siTIMP-1 を 3 種類 (siTIMP1-A,B,C) デザインし、in vitro のノックダウン効率を検討した。ヒト真皮由来線維芽細胞 (NHDF) およびマウス線維芽細胞株 (NIH3T3) を用いて、siRNA を sCA 法にて導入した。最もノックダウン効率の高いものは、siTIMP1-C で、NHDF で 57.6%、NIH3T3 で 97.4% のノックダウン効果を認めた。siTIMP1-C を用いて動物実験へと進むことにした。



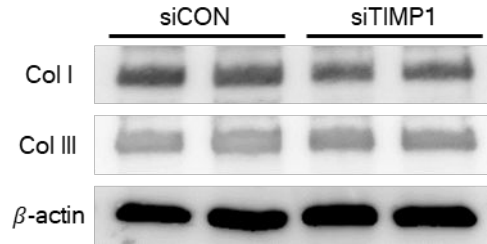
(3) /NJ を用いて、マウス肥厚性癬痕モデルを作成した。切開縫合後 6 日目より siControl (siCON)-sCA 対 siTIMP1-sCA の注射を開始した。1 日おきに 4 回投与し、15 日目でサンプリングを行った。癬痕のマッソントリクローム染色を行い、siTIMP1 のグループは、siCON のグループに対して、有意な癬痕サイズの縮小を認めた。



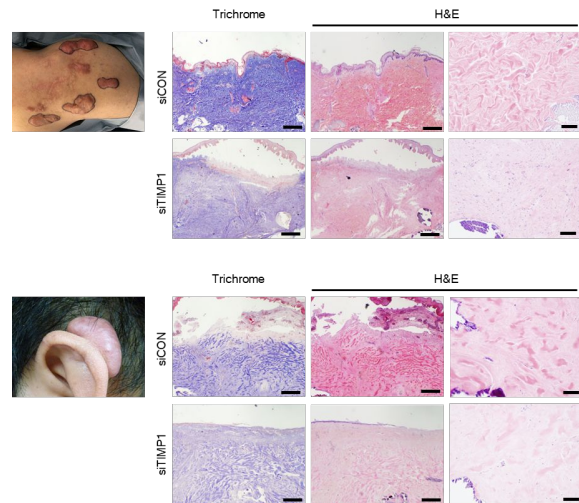
Masson's trichrome stain



また、ウエスタンブロットでは、siTIMP1 の癬痕で、コラーゲンタイプ 1 のシグナルの有意な減弱を認めた。



さらに、ex vivo ケロイド組織培養を行い、ケロイド組織に対して siCON-sCA 対 siTIMP1-sCA を注射した。1 日おきに 3 回投与し、培養 7 日目にサンプリング、組織学的に評価を行った。siTIMP1 のグループで、明らかなケロイダルコラーゲンの消失を認めた。



結果として、siTIMP1-sCA の局所注射は、ケロイド・肥厚性癬痕の新たな治療戦略として有望であると考えられた。

### 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)  
現在、論文投稿中である。

[学会発表](計 2 件)

1. Masayo Aoki, Noriko M Matsumoto, Azusa Honda, Yuri Okubo, Rei Ogawa, Hirofumi

Yamamoto, Kazuaki Takabe, and, Takashi Okada. Apatite Nanoparticle-encapsulated siRNA Targeting Tissue Inhibitor of Metalloprotease-1 for the Treatment of Hypertrophic Scars and Keloids. 日本遺伝子細胞治療学会, 2019

2. 青木雅代、土肥輝之、松本典子、本田梓、大久保ゆり、高部和明、小川令. ケロイド・肥厚性瘢痕におけるナノ粒子を用いたTIMP-1標的siRNA治療. 形成外科学会基礎学術集会, 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)  
現在、出願を検討中である。

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

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

青木 雅代 (AOKI, Masayo)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40465282

### (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

松本典子 (MATSUMOTO, M Noriko)

高部和明 (TAKABE, Kazuaki)

小川令 (OGAWA, Rei)