

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 年度～2012 年度

課題番号：21390469

研究課題名（和文）

干渉 RNA の脈絡膜血管新生抑制の分子機構の解明と新規治療手段の開発

研究課題名（英文）

Molecular mechanism on anti-angiogenic effect of siRNA in choroidal neovascularization

小椋 祐一郎（OGURA YUICHIRO）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70191963

研究成果の概要（和文）：RNA 干渉は、新しい治療方法として注目を集めているが、一方で非特異的な作用や免疫応答の問題も報告されている。バイオマテリアルであるアテロコラーゲンは、siRNA と複合体化させて血中に投与しても、ほとんど免疫応答が観察されず、siRNA 導入の担体としての有効性が期待されている。今回我々は、マウス実験的レーザー脈絡膜新生血管(CNV)モデルを用いて、siRNA 導入へのアテロコラーゲンの有用性を確認し、アテロコラーゲンにより、Toll-like receptor (TLR3)の非特異的反応に関与せずに、有効に siRNA が細胞内に導入され、CNV 抑制されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Previous studies have shown that siRNAs could suppress angiogenesis via stimulation of toll-like receptor (TLR) -3. The purpose of this study was to determine the efficacy of atelocollagen to deliver siRNA without TLR3 stimulation in the laser-induced choroidal neovascularization (CNV) model. The mean CNV volumes were significantly smaller in the naked siRNA-*Luc*, naked siRNA-*Vegfa*, or siRNA-*Vegfa* /atelocollagen complex compared with PBS, atelocollagen, or siRNA-*Luc*/atelocollagen complex-injected mice ($p < 0.05$). These findings demonstrate that atelocollagen may deliver siRNA without non-specific TLR3 stimulation in the murine laser-CNV model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2012 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：加齢黄斑変性、脈絡膜新生血管、アテロコラーゲン、VEGF、RNA 干渉 (siRNA)

1. 研究開始当初の背景

(1) RNA 干渉は、新しい治療方法として注目を集めているが、非特異的な作用(Kleinman ME et al: Nature 2008, 452: 591-597, Cho WG et al: Proc Natl Acad Sci U S A 2009, 106: 7137-7142, Ashikari M et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 2010, 51: 3820-3824)や免疫応答の問題(Sledz CA et al: Nat Cell Biol 2003, 5: 834-839)も報告されており、実際の臨床使用にはまだ問題がある。Kleinmanらは、RNA 干渉による非特異的な抗血管新生作用には、Toll-like receptor 3 (TLR3)が関与していることも報告した(Kleinman ME et al: Nature 2008, 452: 591-597)。

(2) 加齢黄斑変性症 (AMD) をはじめとする CNV は、欧米では高齢者の失明原因の第一位であり、わが国でも高齢化と生活様式の欧米化に伴い、年々増加傾向にある。

CNV の発症に VEGF-A の関与が示唆されており(Frank RN et al: Am J Ophthalmol 1996, 122: 393-403)、RNA 干渉を用いた抗 VEGF 薬 (Bevasiranib, siRNA-027)(Reich SJ et al: Mol Vis 2003, 9: 210-216, Shen J et al: Gene Ther 2006, 13: 225-234)が AMD に対して臨床試験が行われているが、これらの siRNA は、化学修飾されておらず、眼内に直接投与することにより、非特異的な作用や免疫応答が引き起こされる恐れがある。

我々も、以前マウスレーザー脈絡膜新生血管 (CNV)誘導モデルを用いて、標的のない siRNA を化学修飾せずに硝子体内に投与すると非特異的に CNV が抑制されること、それには VEGF 抑制が関与していることを明らかにした(Ashikari M et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 2010, 51: 3820-3824)。

(3) 一方、アテロコラーゲンは、ウシ真皮の I 型コラーゲンを由来とするバイオマテリアルで、免疫原性が極めて低く、生体適合性が高いことが知られている。さらに、siRNA と複合体化させて血中に投与しても、ほとんど免疫応答が観察されず、siRNA 導入の担体としての有効性が期待されている (Takeshita F et al: Proc Natl Acad Sci U S A 2005, 102:12177-12182, Kinouchi N et al: Gene Ther 2008, 15:1126-1130, Inaba S et al: Mol Ther 2012, 20: 356-366)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスレーザーCNV モデルを用いて、siRNA 導入へのアテロコラーゲンの有用性について検討し、非特異的反応や免疫応答を引き起こさずに、CNV 抑制させることができるかを明らかにし、siRNA を用いた AMD に対す

る安全な眼局所治療法確立をめざすものである。

3. 研究の方法

(1) レーザー誘導実験的 CNV 作成

C57BL/6 マウスに、レーザー照射を行い、実験的脈絡膜新生血管を作成、7日目に眼球を摘出、4%パラホルムアルデヒドで固定し、網膜色素上皮-脈絡膜-強膜フラットマウントを作成、FITC で標識されたレクチンで免疫染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡を用いて、脈絡膜新生血管の容積を測定した。

(2) 硝子体内投与

レーザー直後、マウス硝子体腔内に、33G シリンジを用いて、レーザー網膜光凝固直後に下記薬剤を投与した。

PBS、標的のない si-Luc(Luciferase に対する siRNA)、標的のなる siRNA として si-Vegfa(マウス VEGF-A に対する siRNA)。siRNA は、単独投与あるいは、事前にアテロコラーゲンと作用させ複合体を形成させてから投与した。また細胞内の TLR3 を阻害するために、クロロキンをを用いた。

(3) ELISA

レーザー網膜光凝固後に si-Vegfa あるいは si-Vegfa とアテロコラーゲン複合体を硝子体内に投与し3日後に眼球を摘出し、網膜色素上皮 (RPE)/脈絡膜における IFN- γ の発現について ELISA で定量した。

4. 研究成果

(1) CNV 容積は si-Luc 単独投与群で有意に抑制されたが(p<0.001)、si-Luc/アテロコラーゲン投与群では、抑制はみられなかった。

(図 1)

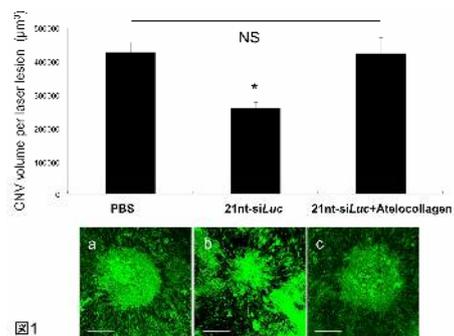


図 1 si-LucによるCNV抑制

si-LucによりPBSと比較して有意なCNV抑制がみられるが、si-Luc/アテロコラーゲンではCNVの抑制はみられない。(*p<0.001, Bar= 100 μ m)

(2) *si-Vegfa* 単独投与群も、*si-Vegfa*/アテロコラーゲン投与群でも、PBS 投与群に比較して、CNV は有意に抑制されていた ($p < 0.05$)。 (図 2)

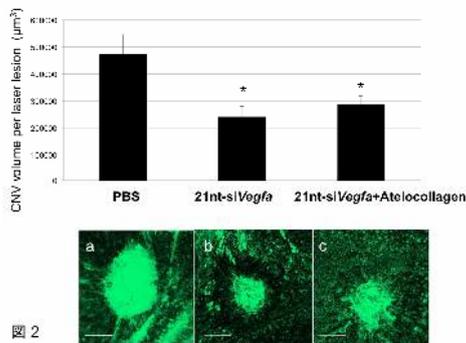


図 2

図 2 *si-Vegfa* による CNV 抑制

si-Vegfa でも、*si-Vegfa*/アテロコラーゲンでも、PBS と比較して有意な CNV 抑制がみられる。 (* $p < 0.05$, Bar = 100 μm)

(3) クロロキシンと同時投与し、細胞内の TLR3 を阻害しても、*si-Vegfa*/アテロコラーゲン投与で CNV は有意に抑制された ($p < 0.001$)。 (図 3)

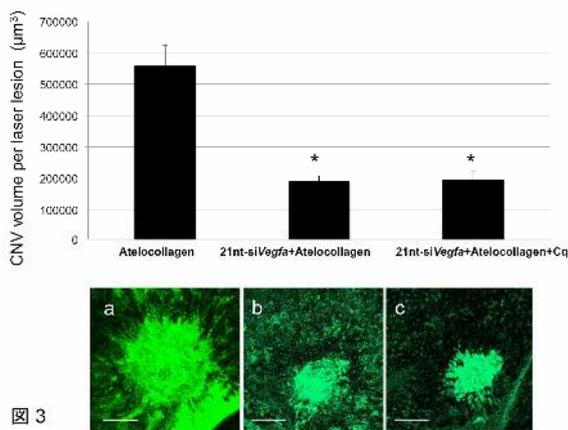


図 3

図 3 クロロキシンと同時投与における

クロロキシン(Cq)と同時投与しても、*si-Vegfa*/アテロコラーゲン投与により有意に CNV は抑制されている。 ($p < 0.001$, Bar = 100 μm)

(4) レーザー照射後、*si-Vegfa* 単独投与群では、PBS 投与群に比較して、有意に IFN- γ が網膜色素上皮(RPE)/脈絡膜に発現していたが ($p < 0.001$)、*si-Vegfa*/アテロコラーゲンでは IFN- γ の増加は認められず、*si-Vegfa* 単独投与群に比べて、有意に IFN- γ 濃度は低かった ($p < 0.01$)。 (図 4)

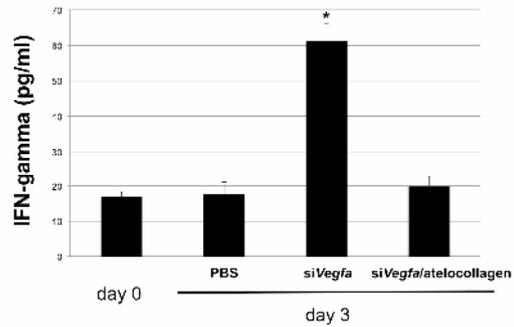


図 4

図 4 RPE/脈絡膜における IFN- γ 発現

PBS 投与群と比較して、*si-Vegfa* 単独投与群では、PBS 投与群に比較して、有意に IFN- γ が網膜色素上皮(RPE)/脈絡膜に発現している (* $p < 0.001$)。しかし、アテロコラーゲンの同時投与では IFN- γ の増加は認められなかった。

(5) 以上の結果から、アテロコラーゲンを siRNA 硝子体内投与の担体として用いることにより、非特異的な TLR3 を介した反応を経ずに、CNV が抑制できること、さらにアテロコラーゲンを担体として用いることにより、IFN- γ の有意な上昇も抑制できることが明らかとなった。アテロコラーゲン自体は、眼科的に前眼部疾患ですでにヒトに用いられており (Watanabe R et al: Tissue Eng Part A 2011, 17: 2213-2219) 安全性は高く、動物実験でも、硝子体内に投与しても網膜への毒性がないことが報告されている (Ishikawa S et al: ARVO Meeting Abstracts 2010, 51: 3303)。今回の結果からアテロコラーゲンを担体として安全に siRNA を硝子体内に導入する AMD 治療の可能性が考えられた。

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 1 件)

- ① Ashikari M, Tokoro M, Itaya M, Nozaki M, Ogura Y: Non-targeted siRNA suppresses laser-induced choroidal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci, 査読有, 51 巻, 2010, 3820-3824.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Yuya Ito, Miho Nozaki, Kazuhiko Sugitani, Masayuki Ashikari, Yoshio Hirano, Yuichiro Ogura: The Efficient Delivery of siRNA by Atelocollagen on Laser-induced Choroidal Neovascularization Model in Mice. ARVO 2011 年 5 月, フォートローダーデール (アメリカ)

- ② Masayuki Ashikari, Miho Nozaki, Takeshi Mizutani, Yuichiro Ogura: Anti-angiogenic effect of IFN- γ and IL-12 on laser-induced choroidal neovascularization model in mice. ARVO 2011, 2011年5月フオートローダーデール(アメリカ)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小椋 祐一郎 (OGURA YUICHIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号:70191963

(2)研究分担者

安川 力 (YASUKAWA TSUTOMU)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 00324632
野崎 実穂(NOZAKI MIHO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号:00295601
松原 明久 (AKIHISA MATSUBARA)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号:80336685