

## 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24年 6月21日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592260

研究課題名（和文） siRNAによるCaspase抑制を用いた新たな緑内障治療薬の開発

研究課題名（英文）

A novel glaucoma treatment drug research through caspase siRNA.

研究代表者

沖波 聡（OKINAMI SATOSHI）

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：70089100

研究成果の概要（和文）：

緑内障モデルの一つである、虚血再灌流モデルにおいて、caspase3に対するsiRNAと、siRNAの徐放作用を有するアテロコラーゲンの混合物の、硝子体腔内への導入により、視神経節細胞における神経保護効果を確認した。

研究成果の概要（英文）：

Intra-vitreous injection of atelocollagen and caspase-3 siRNA complex may protect the retinal ganglion cell damage induced by transient ischemic injury (a glaucoma animal model).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科臨床医学

キーワード：遺伝子、細胞・組織、蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障は視神経節細胞の不可逆的な障害により生じる疾患で、本邦における中途失明の原因として最も頻度が高い。緑内障は眼球内の圧力（眼圧）の上昇が視神経乳頭に圧迫を与え、眼球から脳への情報伝達の働きを担う視神経節細胞の軸索輸送障害を引き起こすことと、視神経周辺変性や修復異常により、視神経に直接的障害あるいは、循環障害を惹起し発症すると考える機械的圧迫説や循環障害

説が古くより知られている。これらの病因に対し、眼圧を下げて機械的な圧迫を除去し、視神経節細胞の障害を減ずることが、現在の唯一のエビデンスを有する緑内障治療である。一方で眼圧が正常に保たれているにもかかわらず視機能が悪化し、従来の眼圧を下げる治療に抵抗する特徴を有する緑内障が「正常眼圧緑内障」として近年知られ、アルツハイマー病と類似した、視神経節細胞の異常なアポ

トーシスが病因であると認知されつつある。本邦で特に、正常眼圧緑内障が多いことが大規模コホート研究を通じて、明らかになったことから、臨床上的大きな問題となっており、従来の眼圧下降療法以外の、アポトーシス抑制を通じた緑内障進行の抑制を行う等の、直接的に神経を保護する方法の開発が強く求められている。

眼球は中枢神経の一部をなす網膜を中心とした組織であり、多くの視力障害の原因として、網膜や視神経の障害が関与している。網膜は眼球の内壁を裏打ちする組織であり、眼球内腔（硝子体腔）に露出している構造をもつ。この神経が露出する特異性を利用し、近年では眼球内に直接的に薬剤を投与することにより、炎症抑制や血管新生の抑制を全身に影響を与えることなく行う治療が開発されている。一方で眼球では低分子の物質の代謝が全身と比較して早いことと、眼球内にあるゲル状の硝子体が薬物をトラップすることにより、作用部位である網膜に有効に到達しない問題が以前から指摘されており、眼内におけるドラッグデリバリーについての新たな方法の開発が求められている。

## 2. 研究の目的

Caspase3に対する、siRNAを眼内に導入することにより、眼内でのCaspase3の発現を阻害し、視神経節細胞のアポトーシスを抑制することが、当施設の予備実験において明らかとなったが、caspase3に対するsiRNAの単回投与ではその効果は短期間に限定することも同時に示唆された。一方でCaspase3は生体機構の維持に必要なアポトーシスも担っていることが考えられ、眼内はもとより、全身や周辺組織への移行により腫瘍の形成などの副作用を有することが想定されることから、siRNAにより組換えが起こる、最低限の薬剤量で一定期間留まっ

た後に代謝される性質を付加することが必須である。加えて、siRNAは生体内で不安定であり、RNaseによる分解をされやすいことから、安定したsiRNAの効果発現を得る必要があり、相反する性質を持ったドラッグデリバリーの方法が必要とされている。この問題に対して、生体内でsiRNAの働きを延長する方法として、コラーゲンの一種であるアテロコラーゲンとsiRNAを混合することにより、生体内での徐放性の確保とRNaseによるsiRNAの分解抑制が得られることが報告されている。これまでに眼内にアテロコラーゲンとsiRNAの混合物を導入して、その効用を延長する報告はないことから、本研究では以下の方法について検討し、単剤投与と比較して神経保護効果、副作用について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

6週齢のオス、ウィスターラットを用いて実験を行った。視神経節細胞数のカウントにあたっては、網膜回収の3日前に上丘上にフルオゴールドを浸透させたゲルを置き、逆向性に網膜視神経節細胞の染色を行い、4%パラホルムアルデヒドによる、還流固定を行った後に回収した網膜から、網膜伸展標本を作製して蛍光顕微鏡にて観察をすることにより、評価を行った。

(1) 眼球の前房内に30G針をもちいて、生理食塩水にて加圧を行い120分間の眼圧上昇維持の後に、正常眼圧に戻すことにより虚血再灌流を行い、網膜にアポトーシスを引き起こす網膜虚血再灌流モデルを用いた。なお眼圧上昇がなされているかの確認についてはTonoLabo接触式眼圧計による、眼圧測定を行い、虚血・再灌流の確認のために、眼底検査による網膜循環の状態を確認した。虚血再灌流モデルに対して、caspase3に対するsiRNAおよび、対照群として生理食塩水または、non

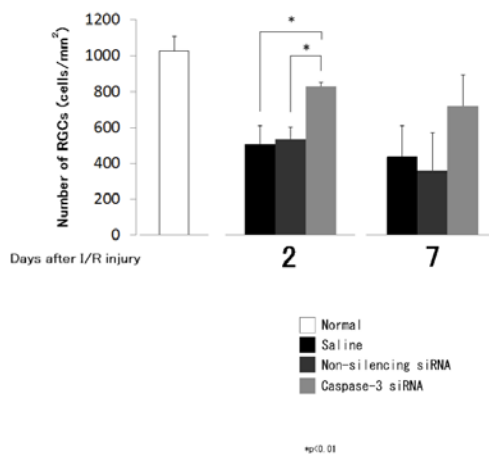
silencing siRNAを虚血再灌流の24時間前に33G針を用いて、硝子体腔内に導入を行った。虚血再灌流後2日、7日時点で網膜の回収を行い、視神経節細胞数、網膜厚、qt-rtPCR法、TUNEL染色法等を用いて、神経保護効果を確認する。

(2)生体内でsiRNAの徐放作用を有するアテロコラーゲンを導入して7・14日後に網膜伸展標本を作成して、眼内でのアテロコラーゲンの保持状況について、確認を行う。アテロコラーゲン投与後の網膜への毒性について、網膜上にアテロコラーゲンが存在している部位における、網膜神経節細胞数および、網膜断面標本を評価することにより、確認をする。

(3)アテロコラーゲンとsiRNAの混合物を用いて、(1)の方法により虚血再灌流モデルにおける神経保護効果について確認をおこなう。

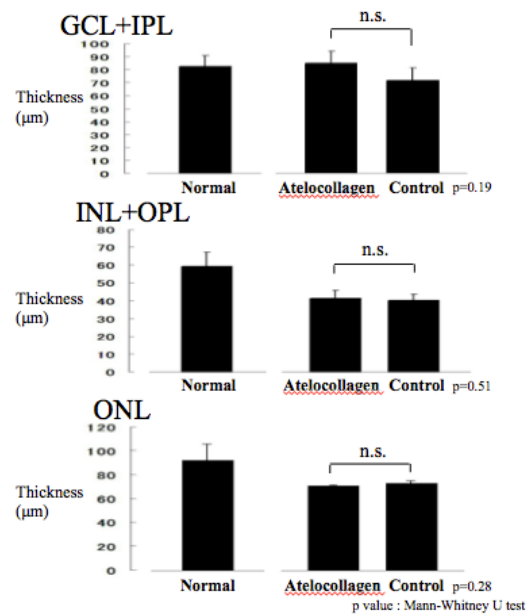
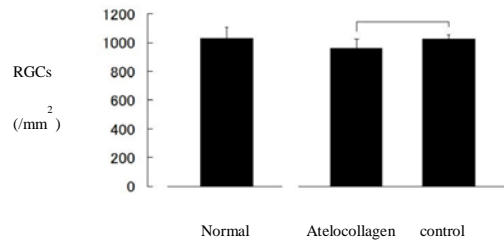
#### 4. 研究成果

(1)caspase3 に対する siRNA を硝子体腔内に導入し、24 時間後に虚血再灌流を行った。虚血再灌流後 2 日時点で網膜を回収した群において、対照群と比較して、視神経節細胞の減少が抑制されていたことを確認され、統計的有意差を認めた。

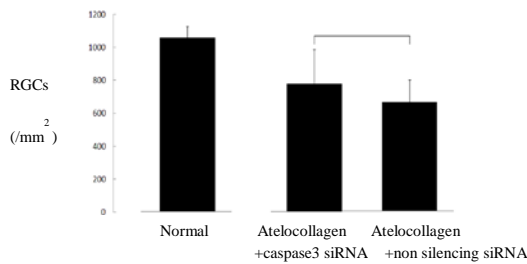


(2)アテロコラーゲンの毒性について形態的評価を行った。網膜神経節細胞数の計測を

行い、アテロコラーゲン投与群と対照群で有意差を認めなかった。また、網膜厚の測定を行い、同様にアテロコラーゲン投与群と対照群で有意差がないことが確認された。以上より、硝子体腔内にアテロコラーゲンを導入することによる、網膜神経節細胞に対する毒性がないことを確認した。



(3)アテロコラーゲンおよび caspase3 の混合物を硝子体腔内に導入し、24 時間後に虚血再灌流を行った。虚血再灌流後 2 日時点で網膜を回収した群において、対照群と比較して、視神経節細胞の減少が抑制されていたことを確認され、統計的有意差を認めた。



## 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)

[学会発表] (計 4 件)

①アテロコラーゲンと caspase3 に対する siRNA の混合物による神経保護効果の検討  
日本眼科学会 2011

石川慎一郎、平田憲、沖波聡

② Neuroprotective effects of siRNA, targeted caspase-3, and atelocollagen complex on rat retinal damage induced by transient ischemic injury.

ARVO 2011

Shinichiro Ishikawa, Ken Hirata, Satoshi Okinami

③アテロコラーゲンによる網膜毒性の検討  
日本眼科学会 2010

石川慎一郎、平田憲、沖波聡

④網膜虚血再灌流モデルラットにおける Diablo に対する siRNA による神経保護効果の検討  
日本緑内障学会 2009

石川慎一郎、平田憲、沖波聡

[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

沖波 聡 (OKINAMI SATOSHI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号 : 70089100

(2) 研究分担者

平田 憲 (HIRATA AKIRA)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号 : 60295144

石川 慎一郎 (ISHIKAWA SHINICHIRO)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号 : 00404129

(3) 連携研究者

なし