

機関番号：24402

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21791408

研究課題名 (和文) 生体吸収性ポリマーを用いた siRNA 導入法の開発-骨再生への応用-

研究課題名 (英文) Local delivery of small interfering RNA using biodegradable polymer application to enhance bone morphogenetic protein-induced bone formation

研究代表者

鈴木 亨暢 (SUZUKI AKINOBU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：00445016

研究成果の概要 (和文) : 我々はポリマーを用いた siRNA 導入法を考案し、siRNA の導入効率及び有効性を検証した。蛍光標識された dsRNA と PLA-DX-PEG ポリマーをマウス背筋筋膜下に埋植したところ容量依存的な蛍光標識 dsRNA の導入を認めた。また rhBMP-2 とその antagonist である Noggin の siRNA を含有させたポリマーをマウス背筋筋膜下に埋植したところ、BMP 単独群と比較して、Noggin siRNA の混合により Noggin mRNA の発現が抑制され BMP 骨形成作用の増強が確認された。生体への siRNA 導入法として、生体吸収性ポリマーを用いた導入法は有効であり、Noggin の発現を抑制することにより BMP の骨形成作用を促進することが示された。

研究成果の概要 (英文) : In this study, we investigated the efficacy of a biodegradable hydrogel, poly-D,L-lactic acid-*p*-dioxanone-polyethylene glycol block co-polymer (PLA-DX-PEG), as a siRNA carrier. PLA-DX-PEG pellets with or without fluorescein-labeled dsRNA were implanted into mouse dosal muscle pouches. The cellular uptake of dsRNA surround the polymer was confirmed by fluorescent microscopy. The fluorescence intensity was dose dependent of the dsRNA, and exhibited a time-dependent decrease. To investigate its biological efficiency, noggin (antagonoist to BMPs) gene silencing with siRNA (siRNA/Noggin) was examined by the amount of suppression of BMP-2-induced noggin expression and the level of performance of BMP, indicated by ectopic bone formation. Noggin gene expression induced by BMP-2 was suppressed by addition of siRNA /Noggin to the implant, and the ectopic-bone formation induced by implants with both BMP-2 and siRNA/Noggin was significantly greater than those induced by implants with BMP-2 alone. These results indicate the efficacy of local delivery of siRNAs by PLA-DX-PEG polymer, which intensified bone-inducing effects of BMP and promoted new bone formation by suppressing gene expression of Noggin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：骨・軟骨代謝学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：siRNA、ポリマー、骨形成蛋白 (Bone morphogenetic protein; BMP)、Noggin、骨再生

1. 研究開始当初の背景

RNA interference (RNA 干渉) は 1998 年に報告され、特定の分子の発現を抑制する分子生物学的手法として近年注目を集めている。この方法では、siRNA (small interfering RNA) と呼ばれる短い RNA を用いることによって、翻訳された mRNA と結合して標的 mRNA の分解を促進することにより標的タンパク分子の発現抑制が可能である。この様に siRNA は特異的に分子機能を抑制できるため、ゲノム遺伝子には影響を与えずに遺伝子治療が可能であるが、この方法を骨再生医療に応用するための研究はまだ少ない。一方、骨再生には局所的骨新生誘導が必須であり、我々の研究室は骨形成タンパク (bone morphogenetic protein; BMP) を用いた骨再生促進をテーマとして研究してきた。その結果遺伝子組み換え体 BMP (rhBMP-2) とその担体 (drug delivery system, DDS) を用いて、種々の骨欠損を再現性よく修復できることを実験動物で確認し、臨床応用へ向けて研究を続行している。外国では既に BMP の実用化は難治性骨折や脊椎固定などで限定的に始まっているが、実際にはいくつかの問題点が残されている。そのひとつにヒトでは BMP に対する応答性が低いために、高用量の BMP が必要となり、その結果として費用が高価で汎用が困難となっている点が挙げられる。この問題を解決することを目的として本研究を企画した。研究企画の基礎として、BMP による生体内での骨形成誘発過程での、生体側からの BMP 活性抑制反応に注目した。すなわち BMP 応答細胞は BMP 受容体を介して細胞内にシグナル伝達され、骨芽細胞への分化が促進されるが、一方で応答細胞は BMP 作用に拮抗する分子 (Noggin, chordin, Smad6,7 など) を発現させることが知られている。もしこれらの分子の発現を抑制できれば BMP の骨誘導効果を大きく増強し、BMP に対する応答性を高め、低用量の BMP で骨形成を促進できる可能性が高い。そこで我々は、BMP のアンタゴニストの一つである Noggin に注目して、BMP タンパクと Noggin の siRNA の併用による骨形成促進効果について検討してきた。Noggin は細胞外において BMP と結合することによりその作用を減弱するが、BMP 応答性に発現が上昇

することが判明している。これまで *in vivo* でも、マウス異所性骨形成モデルや、ラット骨折修復モデルでの新生骨周囲、骨折部周囲における発現の報告があり、BMP に対する Negative feedback 機構が働いていると考えられている。そこで、Noggin の mRNA レベルでの遺伝子発現抑制が可能となる Noggin の siRNA を BMP と併用することで、より効果的な骨形成促進効果が得られると考えた。

我々はまず *in vitro* で、筋芽細胞株である C2C12 細胞に Noggin の siRNA をリポフェクション法により導入し、Noggin の mRNA の発現抑制と、それによりコンディショニング剤 rhBMP-4 投与による骨形成マーカーである Alkaline phosphatase (ALP) 活性の上昇をさらに増強できることを確認した。これらの結果から、Noggin の siRNA 遺伝子導入により *in vitro* では BMP の骨芽細胞系分化作用が促進されることが確認された。

これらの *in vitro* での結果を *in vivo* でも効果的に反映させることが出来れば、BMP の使用量を抑え、より有効な骨形成が可能になると考えられる。しかし RNA は生体内で分解されやすく生体内への導入法は未だ発展途上である。これまで生体における siRNA 導入効率をあげる方法としては、ウイルスベクターを用いたりやエレクトロポレーション法などが行われているが、白血病の発症やインターフェロン応答活性化による作用の減弱、組織障害などの副作用の危険性があり、臨床応用に向けては確固たる安全性の確立が必要である。そこで我々は徐放性ポリマーである分岐型ポリ乳酸-ポリエチレングリコール共重合体 (PLA-DX-PEG、以下ポリマー) による siRNA 導入を考案した。このポリマーは生体親和性、生体分解性に優れているため異物反応が生じにくく、また BMP の担体としても非常に優れている。さらにポリマーの分子量や配合比を変えることにより、その徐放期間を変化させることが出来る。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ポリマーを用いた siRNA の導入効率及び有効性を検証し、さらにポリマーを用いて Noggin の siRNA を細胞内に導入し、BMP の骨形成増強作用を確認することである。

3. 研究の方法

PLA-DX-PEG ポリマー(30mg)に蛍光標識された dsRNA (Fluorecent Oligo® (1mM)); 0, 10, 30nmol を混合し、マウス背筋筋膜下に埋植。2, 4, 7 日後に周囲の筋肉を取り出して組織学的に導入量を検討した。対照として蛍光標識された dsRNA (Fluorecent Oligo® (1mM)); 30nmol をエレクトロポレーション法(EP30)及び注射(Inj30)により導入し、比較検討した。

次に、実際の分子をターゲットとした場合の生体内での有効性を検討するために rhBMP-2 ; 2.5µg とその antagonist である Noggin の siRNA ; 1nmol を含有させたポリマーをマウス背筋筋膜下に埋植し、1, 2, 4, 7 日後に周囲筋肉組織を採取して RNA を抽出し、real-time RT-PCR にて Noggin mRNA の発現量を評価した。また、埋植 2 週後に異所性化骨を摘出して Soft X-ray を撮影、また dual-energy X-ray absorptiometry (DXA 法)により Bone mineral content (BMC) を計測し、Noggin siRNA により BMP の骨形成能が増強されるかどうかを検討した。

4. 研究成果

ポリマー周囲の筋肉組織での用量依存的な蛍光強度の増強を認めた。また、蛍光強度は 2 日をピークとして経時的な減衰を認めたが、蛍光強度はエレクトロポレーション法とほぼ同等で、注射のみよりも有意に強かった(図 1)。

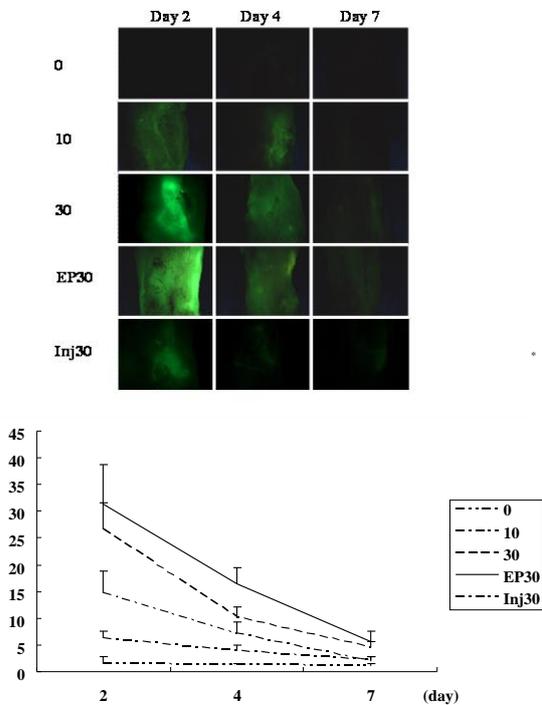
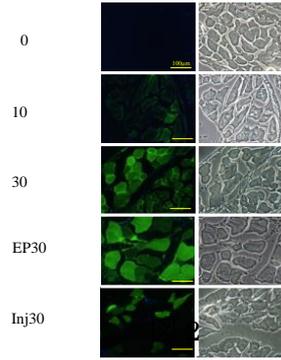


図 1

組織切片では細胞内に蛍光標識 dsRNA の導入が確認された(図 2)。



Real time RT-PCR の結果、BMP 単独では埋植周囲の筋肉組織に Noggin mRNA の発現上昇が見られたが、Noggin siRNA の混合により発現上昇がコントロールレベルまで抑制され、この発現抑制効果は 7 日目まで持続していた(図 3)。

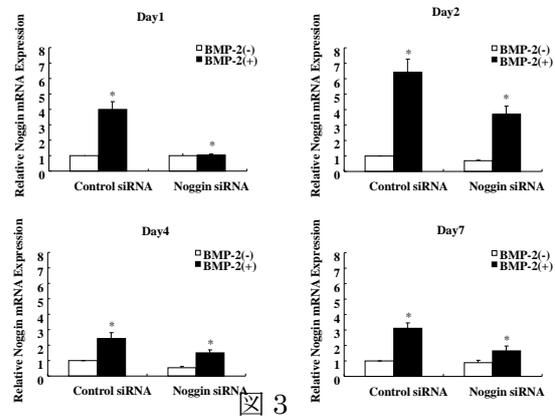
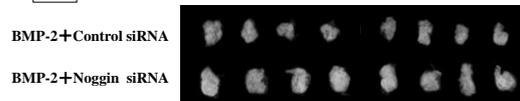


図 3

マウスの背筋筋膜下に新生した異所性骨は、BMP のみのコントロール群と比較して BMP と Noggin の siRNA を混合することにより XP にて異所性骨のサイズの増大を認め、DXA にて BMC は約 1.7 倍であった。(図 4)

XP



BMC

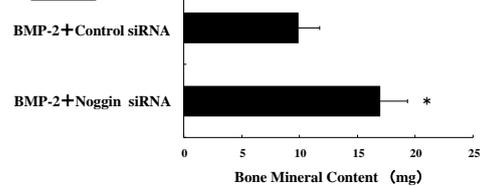


図 4

以上のことから、生体吸収性ポリマーを用いて siRNA の導入が可能であり、この導入法を用いた Noggin の siRNA 局所導入は

BMP による骨形成作用を増強することが確認できた。

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 13 件)

Ampo KI, Suzuki A, Konishi H, Kiyama H. Induction of pancreatitis-associated protein (PAP) family members in neurons following traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2009;26 (10):1683-93. 査読有

- ① Shafaq N, Suzuki A, Terai H, Wakitani S, Nakamura H. Cellularity and Cartilage Matrix Increased in Hypertrophied Ligamentum Flavum: Histopathological Analysis Focusing on the Mechanical Stress and Bone Morphogenetic Protein Signaling. J Spinal Disord Tech. 2011. (in press) 査読有
- ② Tsujio T, Nakamura H, Terai H, Hoshino M, Namikawa T, Matsumura A, Kato M, Suzuki A, Takayama K, Fukushima W, Kondo K, Hirota Y, Takaoka K. Characteristic radiographic or magnetic resonance images of fresh osteoporotic vertebral fractures predicting potential risk for non-union: a prospective multicenter study. Spine. 2011 (in press) 査読有
- ③ Nishiguchi T, Mochizuki K, Ohsawa M, Inoue T, Kageyama K, Suzuki A, Takami T, Miki Y. AJR Am J Roentgenol. 2011;196(3): 644-50. Differentiating Benign Notochordal Cell Tumors From Chordomas: Radiographic Features on MRI, CT, and Tomography. 査読有
- ④ 鈴木亨暢, 上村 卓也, 中村博亮, Clinical Calcium2010;20(12):1820-27. 骨折治癒・骨再生における神経系の関与
- ⑤ 鈴木亨暢, 中村博亮, 骨粗鬆症治療 2010;9(3): 269-72. Vertebroplasty と kyphoplasty
- ⑥ Matsumura A, Namikawa T, Terai H, Tsujio T, Suzuki A, Dozono S, Yasuda H, Nakamura H. J Neurosurg Spine. 2010;13(6): 758-65. The influence of approach side on facet preservation in

microscopic bilateral decompression via a unilateral approach for degenerative lumbar scoliosis. 査読有

- ⑦ Suzuki A, Matsumura A, Konishi S, Terai H, Tsujio T, Dozono S, Nakamura H. Risk Factor Analysis for Motor Deficit and Delayed Recovery Associated With L4/5 Lumbar Disc Herniation. J Spinal Disord Tech. 2010. (in press) 査読有
- ⑧ Yamada K, Matsuda H, Nabeta M, Habunaga H, Suzuki A, Nakamura H. Clinical outcomes of microscopic decompression for degenerative lumbar foraminal stenosis: a comparison between patients with and without degenerative lumbar scoliosis. Eur Spine J. 2010. (in press) 査読有
- ⑨ Suzuki A, Misawa H, Simogata M, Tsutsumimoto T, Takaoka K, Nakamura H. Recovery process following cervical laminoplasty in patients with cervical compression myelopathy: prospective cohort study. Spine. 2009;34(26): 2874-9. 査読有
- ⑩ Takayama K, Suzuki A, Manaka T, Taguchi S, Hashimoto Y, Imai Y, Wakitani S, Takaoka K. RNA interference for noggin enhances the biological activity of bone morphogenetic proteins in vivo and in vitro. J Bone Miner Metab. 2009;27(4):402-11. 査読有
- ⑪ Hamagami K, Sakurai Y, Shintani N, Higuchi N, Ikeda K, Hashimoto H, Suzuki A, Kiyama H, Baba A. Over-expression of pancreatic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) aggravates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. J Pharmacol Sci. 2009;110(4):451-8. 査読有
- ⑫ Hoshino M, Nakamura H, Terai H, Tsujio T, Nabeta M, Namikawa T, Matsumura A, Suzuki A, Takayama K, Takaoka K. Factors affecting neurological deficits and intractable back pain in patients with insufficient bone union following osteoporotic vertebral fracture. Eur Spine J. 2009;18(9):1279-86. 査読有

- ⑬ Suzuki A, Misawa H, Simogata M, Tsutsumimoto T, Takaoka K, Nakamura H. Recovery process following cervical laminoplasty in patients with cervical compression myelopathy: prospective cohort study. Spine. 2009;34(26):2874-9. 査読有

[学会発表] (計 16 件)

- ① Akinobu Suzuki, Kentaro Yamada, Hideki Matsuda, Masaharu Nabeta, Hiroshi Habunaga, Hiroaki Nakamura. Clinical outcomes of microscopic decompression for degenerative lumbar foraminal stenosis: a comparison between patients with and without degenerative lumbar scoliosis. 2011 Global Spine Congress 2011年3月23日 スペイン バルセロナ
- ② Akinobu Suzuki, Tadao Tsujio, Masatoshi Hoshino, Hidetomi Terai, Hiromitsu Toyoda, Hiroaki Nakamura. Endoscopic Vertebroplasty without Instrumentation for Insufficient Bone Union with Neurological Deficit following Osteoporotic Vertebral Fracture. 2011 Global Spine Congress 2011年3月23日 スペイン バルセロナ
- ③ 鈴木亨暢, Shafaq Najibullah, 松村昭, 寺井秀富, 安田宏之, 中村博亮 腰椎変性側彎症患者における傍脊柱筋変性に関する検討 第116回中部日本整形外科災害外科学会 2010年10月8日 大阪府 大阪市
- ④ 鈴木亨暢, 辻尾唯雄, 星野雅俊, 寺井秀富, 豊田宏光, 中村博亮 神経障害を合併した骨粗鬆症性椎体骨折後偽関節に対する内視鏡下椎体形成術の治療成績 第6回椎体形成術研究会 2010年8月28日 京都市 京都市
- ⑤ 鈴木亨暢, 辻尾唯雄, 星野雅俊, 寺井秀富, 豊田宏光, 中村博亮 神経障害を合併した骨粗鬆症性椎体骨折後偽関節に対する内視鏡下椎体形成術の治療成績 第83回日本整形外科学会 2010年5月27日 東京都
- ⑥ 鈴木亨暢, 辻尾唯雄, 星野雅俊, 寺井秀富, 豊田宏光, 松本富哉, 中村博亮 遅発性神経麻痺を呈した骨粗鬆症性椎体骨折後偽関節に対する内視鏡下椎体形成術単独の治療成績 第39回日本脊椎脊髄病学会 2010年4月23日 高知県、高知市
- ⑦ Akinobu Suzuki, Tadao Tsujio, Masatoshi Hoshino, Hidetomi Terai, Hiromitsu Toyoda, Hiroaki Nakamura. Endoscopic Vertebroplasty without Instrumentation for Insufficient Bone Union with Neurological Deficit following Osteoporotic Vertebral Fracture. 2010年4月13日 2010 International society for study of the lumbar spine ニュージーランド、オークランド
- ⑧ Najibullah Shafaq, Akinobu Suzuki, Hidetomi Terai, Hiroaki Nakamura, Kunio Takaoka. Histopathological Analysis of Hypertrophic Ligamentum Flavum in Degenerative Lumbar Canal Stenosis: Focus on the Expression of BMP receptor. 2010年4月13日 2010 International society for study of the
- ⑨ 鈴木亨暢、辻尾唯雄、星野雅俊、寺井秀富、豊田宏光、中村博亮、神経障害を合併した骨粗鬆症性椎体骨折後偽関節に対する内視鏡下椎体形成術の治療成績 第13回日本内視鏡低侵襲脊椎外科学会 2009年11月27日 兵庫県、神戸市
- ⑩ 間中智哉、鈴木亨暢、高山和士、高岡邦夫、生体吸収性ポリマーを用いた siRNA 導入法の開発—骨再生への応用— 第24回日本整形外科学会基礎学術集会 2009年11月5日 神奈川県、横浜市
- ⑪ 鈴木亨暢 松村昭, 寺井秀富, 高橋真治, 前野考史, 中村博亮 頸髄症に対する頸椎椎弓形成術前後における QOL 評価 しびれ・疼痛が QOL に与える影響 第114回中部日本整形外科災害外科学会 2009年10月2日 兵庫県、神戸市
- ⑫ Akinobu Suzuki, Tadao Tsujio, Masatoshi Hoshino, Hidetomi Terai, Hiromitsu Toyoda, Hiroaki Nakamura. The 9th Pacific Asian Society of Minimum Invasive Spine Surgery (Osaka) Endoscopic Vertebroplasty without Instrumentation for Insufficient Bone Union with Neurological Deficit following Osteoporotic Vertebral Fracture. 2009年8月7日

- ⑬ 鈴木亨暢, 三澤弘道, 下形光彦, 堤本高宏, 高岡邦夫, 中村博亮, 頸髄症における頸椎椎弓形成術後の回復経過に関する前向き研究 第 82 回日本整形外科学会 2009 年 5 月 16 日 福岡県 福岡市
- ⑭ 鈴木亨暢, 松村昭, 中村博亮, 寺井秀富, 豊田宏光, 伊達優子, 前野考史, 高橋真治, 高岡邦夫, 頸髄症に対する頸椎椎弓形成術前後における QOL 評価 しびれ・疼痛が QOL に与える影響、第 38 回日本脊椎脊髄病学会 2009 年 4 月 24 日 兵庫県、神戸市
- ⑮ 鈴木亨暢, 三澤弘道, 下形光彦, 堤本高宏, 高岡邦夫, 中村博亮, 三種の評価方法を元とした頸髄症における頸椎椎弓形成術後の回復経過の前向き研究 第 38 回日本脊椎脊髄病学会 2009 年 4 月 24 日 兵庫県、神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 亨暢 (Suzuki Akinobu)
大阪市立大学・大学院医学研究科・病院
講師
研究者番号：00445016

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし