

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5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790807

研究課題名（和文） RNA干渉法による二次性副甲状腺機能亢進症進展に関する病態の解析

研究課題名（英文） Suppression of parathyroid hormone production in secondary hyperparathyroidism by RNA interference

研究代表者

金井 巖太 (KANAI GENTA)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：00535221

研究成果の概要（和文）：

カルシウム代謝の重要臓器である副甲状腺の病的腫瘍化をモデル動物に誘導し、RNA干渉によるホルモン抑制が組織に与える影響について検討した。2HPTモデルラットを作成し血中に分泌される副甲状腺ホルモン（PTH）量を測定した。頸部切開を加えて直視下において副甲状腺局所へ、抗PTH siRNA投与を行った。この結果、およそ4週間でPTHが高値となり持続した。モデル動物における試薬投与後のPTH濃度は投与前値に比して約60%の抑制を示した。投与による抑制効果は限定的ではあったが持続していた。本実験においては非ウイルス性ドラッグデリバリーシステムであるアテロコラーゲンを利用しており効果の持続を助長させた可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Secondary hyperparathyroidism (2HPT) is one of the most important complications of chronic kidney disease. Vitamin D3 receptor levels are decreased in the parathyroid glands of dialysis patients and animal models of renal failure. Recent research has shown that the functionality protein can be adjusted with the gene transfer to the parathyroid. We examined the parathyroid hormone (PTH) suppression by the RNA interference using rat 2HPT model. Serum PTH increased to a high level at the posterior when four weeks passed. Afterwards, high density anti-PTH siRNA was injected to rat's parathyroid glands. It was shown that serum PTH concentration was suppressed up to about 60%. The suppression effect was shown the peak on 1-2 weeks, and, then, maintained limitedly. In the present study, it was suggested that using the atelocollagen that was non-viruses drug delivery system contribute to the extension of effectiveness.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：人工透析学

1. 研究開始当初の背景

本邦の透析患者は 27 万人を超え増加し続けている。長期透析患者の合併症が顕在化して、特に二次性副甲状腺機能亢進症 (2HPT) が大きな問題になっている。2HPT は骨の問題のみならず、異所性石灰化による心血管疾患の進行に関与し生命予後や QOL を左右する重大な因子であることから、CKD 骨ミネラル代謝異常 (CKD-MBD) の概念が確立された。

2HPT は活性型ビタミン D3 (VitD3) により広く治療されているが、副甲状腺の腫大化により次第に VitD3 への治療抵抗性を示すようになることが知られている。また、カルシウム感知受容体作動薬 (calcimimetics) もまた進行した 2HPT ではカルシウム感知受容体 (CaSR) の発現減少が問題である。ついには治療抵抗性となり PTH がコントロールできなくなった時、副甲状腺エタノール注入療法 (PEIT) や副甲状腺摘出術 (PTx) などの外科的療法が行われているが、それですら術後の PTH コントロールが難しく、自家移植組織や残存腺による 2HPT の再発も問題となっている。

2HPT の活性型 VitD3 への抵抗性の発生の原因としては副甲状腺細胞の発現する VitD3 受容体 (VDR) の減少が重要であることは透析患者 (Korkor, *N Engl J Med* 316:1573-1577, (1987)) や腎不全ラット (Merke et al, *Kidney Int* 32:350-353(1987), Fukagawa et al, *Kidney Int* 52(Suppl 62):S60-S64(1997)等) の副甲状腺で明らかにされている。カルシウム感知受容体 (CaSR) の発現減少についても報告があり (Kifor et al, *J Clin Endocrinol Metab* 81:1598-1606(1996), Gogusev et al, *Kidney Int* 51:328-336(1997))、進行した 2HPT の副甲状腺細胞においては、各種の受容体遺伝子の発現低下によって活性型 VitD3 や calcimimetics の作用が阻害されていると考えられている。

近年いろいろな医療分野で応用され始めた RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) は細胞自身の持つ mRNA の分解メカニズムであり、短い二本鎖 RNA に相補的な塩基配列を持つ標的 mRNA を特異的に分解することが可能である (Fire et al, *Nature* 391:806-811(1998))。2HPT における PTH の過剰分泌は PTH 遺伝子の発現状態の変化ではなく、その mRNA の turn-over が阻害され、細胞内に蓄積することが主要な原因であることが報告されており (Yalcindag et al, *J Am Soc Nephrol* 10:2562-2568(1999))、mRNA を直接の標的とする RNA 干渉法が有効であると考えられるのである。この仮説を裏付けるこれまでの研究成果について簡単

にまとめる。

◎ヒト副甲状腺細胞の単層培養系を用いて PTH mRNA に対する *in vitro* RNAi を行った。PTH mRNA の一部と相補的な塩基配列を持つ二本鎖の siRNA (small interfering RNA) を導入試薬を用いて細胞に取り込ませ、細胞内の PTH mRNA の量および培地中に分泌される PTH の量を測定したところ、共に顕著な減少が認められた。有効濃度はおよそ 50nM で、この時 80%以上の PTH 産生が抑制された。同濃度の陰性対照 siRNA の導入ではこのような効果は得られなかった。

◎ヒト副甲状腺細胞の単層培養系は混入する繊維芽細胞の増殖のため長期間の維持が難しく、20 日間ほどで PTH の分泌が検出できなくなる。そこでヒト副甲状腺細胞の凝集塊 (スフェロイド) 培養により約 150 日間の PTH 分泌が可能である系を開発し、この培養系を用いて siRNA による抑制効果がどれほどの期間維持されるのかを確かめたところ、80%以上の抑制が培養直後から約 30 日間続き、その後しだいに PTH 分泌が回復するも、培養約 50 日目に至ってまだ約 50%の抑制効果が維持されていた。PTH 分泌が元のレベルまで回復するのは培養約 80~100 日後であった。

◎ヒト副甲状腺細胞をヌードマウスの肝臓へ移植して、血中にヒト PTH が高濃度に分泌されるようになった個体に対し、ハイドロダイナミック法で siRNA を静脈より注入して *in vivo* RNAi を行った。個体当たり 120 μ g の siRNA を導入した場合、約 1 週間後に血中ヒト PTH 濃度が最大 80%抑制され、その後も 60%程度の抑制効果が 1 ヶ月以上に渡り持続した。

以上の結果は、進行した 2HPT の副甲状腺細胞においても RNA 干渉のメカニズムは十分機能していることを示している。特に、通常報告されている siRNA の効果に比べ、非常に長期間の抑制効果が維持されていることについては、増殖能と RNA 分解活性が低いという副甲状腺細胞の特徴が寄与していると考えられ、副甲状腺細胞の RNA 干渉法への適合性が確認されると共に、RNA 干渉法を応用した PTH 産生の制御法が有用性を持つことが示された。

2. 研究の目的

本研究は、(1)腎不全ラットに 2HPT を誘導し、RNAi により持続的に PTH をコントロールする。(2)副甲状腺における機能的 mRNA のノックダウンによる長期的な影響を検証するものである。

近年の 2HPT 治療は、経口ビタミン D 製剤、ビタミン D アナログ静注製剤、calcimimetics、リン吸着剤などの開発によりめざましい進

歩を遂げているにもかかわらず、病態の進行に伴う副甲状腺細胞の変化（受容体発現の減少など）による、これらの治療に対する耐性の発生は避けがたい状況にある。RNA 干渉法による PTH 産生のコントロールは副甲状腺細胞の変化に左右されることがない。また尿毒症モデル動物における RNAi による持続的な PTH の制御方法の開発は、単なる治療としての側面だけでなく後述する実験の基礎的技術の確立を目的としている。

RNAi による副甲状腺細胞における機能的 mRNA のノックダウン技術の開発により、細胞増殖または翻訳転写後の分泌プロセスに関わる重要な因子を検証することが可能となる。さらに副甲状腺過形成進展においては変異までに長期的な外的環境を要するその特異な性質によって、従来のモデル実験では十分な検証を得ることが困難である。本申請によって行われる実験ではより実際的な副甲状腺過形成の特徴を再現し、メカニズムの解明につながることを期待される。

3. 研究の方法

RNAi は副甲状腺細胞にてその機構を保持しており、in vivo での siRNA による PTH mRNA のコントロールが可能であることから、従来の治療法である PEIT に類似した投与方法により効率的に局所への siRNA 投与が可能になると思われ、さらに効果的に PTH をコントロールすることが可能になると考えられる。

(1) 腎不全モデル動物の作出と 2HPT の誘導

5/6 腎摘腎不全ラットに高リン食を 8 週間投与することにより 2HPT モデル動物が作出される。このモデル動物を用いて、PTH 上昇を確認するために、血中に分泌される PTH 量を ELISA キット (SCANTIBODIES Laboratory Inc.、PTH, Total Intact, Rat, ELISA Kit) にて定量する。2HPT の病態が把握されたモデル動物よりその副甲状腺組織を摘出し重量を測定する。摘出された副甲状腺は組織切片を作成し、抗 PTH 抗体 (Bachem Americans, Inc、Anti-PTH(1-34), Rat) を購入し抗体染色により PTH 産生を測定する。同様に、細胞分裂頻度および細胞死頻度を確認するために酵素抗体法および in situ ハイブリダイゼーションによって評価する。血中 PTH 濃度と組織変化の相関を調査する。得られた結果をヒトの 2HPT の病態と比較してモデル動物としての適性を判断する。

(2) 安定的かつ持続的な siRNA 導入法の開発

2HPT モデルラット麻酔下に頸部切開を加えて、直視下において 31G 針を用いて副甲状腺局所への抗 PTH-siRNA 投与を行う。調整した合成 siRNA (Invitrogen, Stealth RNAi, J Biol Chem. 284(35):23793-805.) を用いる。

(3) 2HPT 動物モデルでの RNA 干渉法による PTH 制御法の確立

実際に 2HPT でみられる多様な病態進行状況に対応した制御技術を確立する。種々の進行程度の 2HPT モデル動物に対し、siRNA を副甲状腺へ局所投与した後、血中 PTH 濃度よりその効果をモニターしながら適当な間隔において siRNA 投与を追加し、一定レベルの PTH 分泌を維持するように努める。さらに siRNA の徐放性効果をもたらすその作用を持続させ細胞内への取り込みを助けるバイオマテリアルであるアテロコラーゲン (Takei et al, Cancer Res 64:3365(2004)) を用いることで効果延長をはかる。

4. 研究成果

2HPT モデルラット副甲状腺への直接 siRNA 投与の PTH 抑制効果

5/6 腎摘をうけたラットに高リン食を投与し 2HPT ラットを作成した。施術より 12 週後、対照群に比して血中ラット PTH 上昇を確認した。ラット PTH mRNA に対する siRNA (Anti-PTH siRNA; 80 μ M) を、直接副甲状腺内へ投与した後、適時、血中のラット PTH 濃度を測定した。上図には代表的なデータを示す。PTH 濃度の変化は siRNA 導入直前 (Day 0) の値に対するパーセンテージで示されている。対照群に比し siRNA 投与後より 14 日以降も PTH 抑制効果が認められた。20 日目においては 0 日目の PTH に比して最大約 60% の抑制を認め、25 日まで 40% 程度の抑制効果の持続が確認された。(図 A)

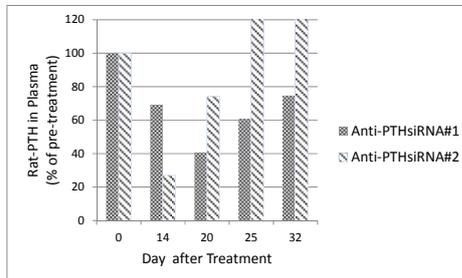


図 A

モデル動物へ麻酔下で頸部切開を加えて、直視下において 31G 針を用いて副甲状腺局所へホルモン遺伝子抑制のための siRNA 投与を行った。投与群 9 匹、対照群 2 匹の血清を手術前 3 ヶ月より 1 週間おきに採取した。この結果、高リン食を与えたモデル動物ではおよそ 4 週間で副甲状腺ホルモンが高値となり持続した。モデル動物における試薬投与後の副甲状腺ホルモン濃度の平均値は 458 \pm 262 pg/ml であり投与前値に比して約 82% を示した。投与による抑制効果は限定的ではあったが持続していた。効果が限定的である理由には疾患レベルの個体差および腎不全病態の進行に伴う副甲状腺ホルモン基礎分泌の増加が考えられた。また、生体への siRNA 投与は速やかな分解によって失活するが、本実験においては非ウイルス性ドラッグデリバリーシ

ステムであるアテロコラーゲンを利用しており効果の持続を助長させた可能性が示された。

目的とする siRNA 配列の選定および副甲状腺細胞への遺伝子導入試薬の選定など、一定の効果が得られるまでの条件を見出しており、本来想定される siRNA ならではのオフターゲット効果や持続時間の短さといった問題点は siRNA への蛋白修飾による安定化や非ウイルス性ドラッグデリバリーシステムの導入などによって治療モデルとして有効であった。モデル作成における腎不全状態や個体差が本実験の障害となっている。

本研究では腎不全モデルラット過形成副甲状腺への PTH 遺伝子配列特異的な siRNA 直接注入が血清 PTH を低下させることを明らかにした。siRNA が分解されるまでの 1 週間は著明な効果の持続が見込めたが、副甲状腺直接注入における薬液からの siRNA の放出、細胞膜通過の効率、さらに浸透範囲、siRNA 分解因子の影響を考慮する必要がある。ドラッグデリバリーの観点から副甲状腺への直接注入は効果的であると思われるが上記の問題を解決するために、薬液投与量および濃度の厳密な調整や専用針の開発などの検討を今後進めていきたい。

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)

Kanai G, Fukagawa M. Gene therapy for secondary hyperparathyroidism. Clinical Calcium. 20, 1052-1059, 2010. 査読無

[学会発表] (計 1 件)

金井 巖太、角田隆俊、澤田佳一郎、深川雅史 : RNA 干渉による二次性副甲状腺機能亢進症治療法の開発. 第 56 回日本透析医学会, 2011 年 6 月 18 日, 神奈川.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 巖太 (KANAI GENTA)

東海大学・医学部・助教

研究者番号 : 00535221