

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791992

研究課題名(和文) siRNAによる緑内障モデルラットにおける視神経節保護効果の検討

研究課題名(英文) Neuro protective effect of siRNA at glaucoma model rats

研究代表者

石川 慎一郎 (Ishikawa, Shinichiro)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：00404129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：低分子二本鎖RNAであるsiRNA(small interfering RNA)は、特定の遺伝子発現を抑制する働きがあることが知られている。本研究では緑内障モデルラットの一つである虚血再灌流モデルラットに対して、siRNAの硝子体内導入を行い神経保護効果の検討を行い、caspase-3およびcaspase-9の硝子体内導入を行うことにより、虚血再灌流によって生じる、網膜視神経細胞の現象が有意に抑制されることを確認した。本研究の結果から将来的な、siRNAの原理を応用した、緑内障による視神経細胞の消失を抑制する、新薬の基礎原理となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：SiRNA(small interfering RNA) is a small molecule double-strand RNA and suppress specific gene expression. In this study, we investigated the effect of intra-vitreous injection of caspase-3 siRNA or caspase-9 siRNA against for retinal ganglion cell damage by transient ischemic injury, one of the rat's glaucoma models. In caspase-3 or caspase-9 injected eyes, loss of retinal ganglion cell was statistically smaller than the control group. Therefore caspase-3 siRNA and caspase-9 siRNA are expected for novel anti-glaucoma siRNA drug, prevent from retinal ganglion cell loss by glaucoma.

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 眼細胞生物学

キーワード：緑内障 神経保護 siRNA

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 緑内障は視神経節細胞に不可逆的な障害による視機能低下を示し、眼圧下降による視機能低下を遅らせる対症療法にとどまっており、根治的な治療法が無いことから、本邦における中途失明の原因として最多となっている。本邦における緑内障の特徴として、眼圧が正常値に保たれているにもかかわらず、視機能が障害される正常眼圧緑内障の割合が、諸外国と比較して多い事が報告されており、眼圧下降による治療効果が得られにくい、正常眼圧緑内障の治療法の開発が急務とされている。正常眼圧緑内障は、旧来から考えられていた機械的な圧迫による、神経の障害ではなく、神経の脆弱性を素因とする視神経節細胞のアポトーシスが病因と考えられており、根治的な治療法として、障害を受けた視神経節細胞を再生させる方法と、アポトーシスの阻害を抑制する方法が挙げられる。神経再生においては、Toll 様レセプターを介した、視神経節細胞の軸索伸張が確認されており、将来的な緑内障の治療に期待されているが、アポトーシスにより視神経節細胞が失われた状態では、視神経節細胞の移植が前提として必要である事や、長期間の緑内障罹患により、視覚に関する高次機能障害を来しており、視神経節細胞の再生のみでは、視機能の回復が得られない可能性が示唆されており、実際の治療法の開発には多くの困難が見込まれ、視神経節細胞の障害を抑制する方法がより現実的と考えられた。

緑内障は Bcl2 経路を介した caspase の活性を経た、アポトーシスの成立が知られており、caspase の活性を阻害する事による、アポトーシスの成立の阻害は、緑内障の進行を抑制につながると考えられる。一方で、アポトーシスは生体の維持に関わっていることから、全身的なアポトーシスの抑制により、生命維持が困難になると考えられる事から、局所的なアポトーシスの抑制が必要とされた。

(2) siRNA (small interfering RNA) はターゲットとする遺伝子を抑制する、有力な方法として注目されており、眼科領域においては加齢黄斑変性の治療薬に既に応用がされている。著者らは本研究の予備実験にて caspase3、caspase9 をターゲットとする siRNA を硝子体腔内導入した後に、眼圧上昇による視神経節細胞障害を引き起こした、緑内障モデルラットにおいて、siRNA による視神経節細胞の障害抑制効果を示唆する結果を得たことから、Bcl-2 経路を阻害することによる神経保護効果のエビデンスの確立が必要である背景があった。加えて、製剤として用いる際に、siRNA が生体内で速

やかに分解されることが問題となることが想定されたことから、眼内で毒性がない基剤の探索が必要であった。

## 2. 研究の目的

アポトーシスのカスケードの一つである Bcl-2 経路を構成する、caspase3、caspase9、の発現を caspase に対する siRNA を導入して行うことにより抑制し、アポトーシスの抑制による神経保護薬の確立を目的とした。また生体内で、siRNA を安定的に作用させる基剤としてアテロコラーゲンを

## 3. 研究の方法

**虚血再還流モデルラットにおける caspase3、caspase9 に対する siRNA の視神経節細胞保護の検討。**

(1) ラットの眼圧を、トノラボ接触眼圧測定機を使用して測定した後に、上丘にフルオロゴールドを導入し、3日後に4%パラホルムアルデヒド100mlを左心室より全身に循環させることにより、網膜の固定を行った後に眼球摘出を行う。摘出眼球から、網膜伸展標本を作成し、蛍光顕微鏡による観察を行い、網膜の神経節細胞数を計測することにより、正常群とした。

(2) 眼球摘出を行い、網膜のパラフィン切片を視神経付近から2標本、視神経から赤道部にかけての部位から2標本、赤道部から周辺部にかけての部位から2標本、作成して Hematoxylin-Eosin 染色および TUNEL 染色を行い、光学・蛍光顕微鏡にて観察を行い、網膜厚の計測とアポトーシスの発現がないことを確認した。

< 上記により、正常眼の評価を行った。 >

(3) ラットを高眼圧維持することを目的とした、前房挿入型のカニューラを30G針にて作成し、120分間の前房内での安定性について評価を行った。

(4) 作成したカニューラを前房内に挿入した後に、生理食塩水を眼球から120cmの位置に固定して、120分間の加圧を行い、経過中の安定性について評価を行った。

(5) 高眼圧時の眼底評価を行い、網膜動脈の虚血を確認した。

< 上記により、虚血再灌流モデルを確立した。 >

(6) 対照群として、non-silencing siRNA とトランスフェクションリガンドの混合物ま

たは生理食塩水を硝子体腔内に投与して、24 時間後に虚血再灌流を行った。

(7) 対照群の虚血再灌流後、2 日目、7 日目に眼球摘出を行い、網膜のパラフィン切片を視神経付近から 2 標本、視神経から赤道部にかけての部位から 2 標本、赤道部から周辺部にかけての部位から 2 標本、作成して Hematoxilin-Eosin 染色および TUNEL 染色を行い、光学・蛍光顕微鏡にて観察を行った。

(8) 眼球摘出の 3 日前に、ラットの上丘にフルオロゴールドを導入し、対照群の虚血再灌流後、2 日目、7 日目で 4 %パラホルムアルデヒド 100 ml を左心室より全身に循環させることにより、網膜の固定を行った後に眼球摘出を行った。摘出した眼球から網膜伸展標本を作成し、蛍光顕微鏡下で 1 mm × 1 mm の範囲で蛍光標識されている視神経節細胞数を、視神経付近から 4 カ所、視神経と赤道部の中心部から 4 カ所、赤道部付近から 4 カ所で計測した。

(9) 対照群の虚血再灌流後、2 日目に眼球摘出を行い、網膜を回収して Real-time rt-PCR を施行して caspase3 の mRNA 量の定量をおこなった。

< 上記により対照群の虚血再灌流による網膜視神経節細胞の障害の定量化と、アポトーシス発現、caspase3 の発現を確認した。 >

(10) 介入群として、caspase3 siRNA とトランスフェクションリガンドの混合物 (caspase3 群) または caspase9 siRNA とトランスフェクションリガンドの混合物 (caspase9 群) を硝子体腔内に投与して、24 時間後に虚血再灌流を行った。

(11) caspase3 群の虚血再灌流後、2 日目、7 日目、14 日目および caspase9 群の虚血再灌流後、2 日目、7 日目に眼球摘出を行い、網膜のパラフィン切片を視神経付近から 2 標本、視神経から赤道部にかけての部位から 2 標本、赤道部から周辺部にかけての部位から 2 標本、作成して Hematoxilin-Eosin 染色を行い、光学顕微鏡にて網膜厚の評価を行った。

(12) caspase3 群の虚血再灌流後、2 日目、7 日目に眼球摘出を行い、網膜のパラフィン切片を視神経付近から 2 標本、視神経から赤道部にかけての部位から 2 標本、赤道

部から周辺部にかけての部位から 2 標本、作成して TUNEL 染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

(13) 眼球摘出の 3 日前に、ラットの上丘にフルオロゴールドを導入し、caspase3 群の虚血再灌流後、2 日目、7 日目、14 日目および、caspase9 群の 2 日目、7 日目で 4 %パラホルムアルデヒド 100 ml を左心室より全身に循環させることにより、網膜の固定を行った後に眼球摘出を行った。摘出した眼球から網膜伸展標本を作成し、蛍光顕微鏡下で 1 mm × 1 mm の範囲で蛍光標識されている視神経節細胞数を、視神経付近から 4 カ所、視神経と赤道部の中心部から 4 カ所、赤道部付近から 4 カ所で計測した。

(14) 対照群の虚血再灌流後、2 日目に眼球摘出を行い、網膜を回収して Real-time rt-PCR を施行して caspase3 の mRNA 量の定量をおこなった。

#### **Non-silencing siRNA アテロコラーゲン複合体による網膜毒性と眼内安定性の検討。**

(15) non-silencing siRNA とアテロコラーゲン複合体を作成した。作成した複合体を硝子体腔内に注入。眼球摘出 3 日前にラットの上丘にフルオロゴールドを導入した。アテロコラーゲン複合体の硝子体腔内注入の 2 日後に 4 %パラホルムアルデヒドにて網膜を固定後、眼球摘出を行い、網膜伸展標本を作成し、蛍光顕微鏡下で 1 mm × 1 mm の範囲で蛍光標識されている視神経節細胞数を、視神経付近、視神経と赤道部、赤道部付近から 4 カ所で計測し、細胞の異型性、視神経節細胞数について観察を行った。

(16) non-silencing siRNA とアテロコラーゲン複合体を作成した。作成した複合体を硝子体腔内に注入。眼球摘出 3 日前にラットの上丘にフルオロゴールドを導入した。アテロコラーゲン複合体の硝子体腔内注入の 2 日後に 4 %パラホルムアルデヒドにて網膜を固定後、眼球摘出を行い、網膜のパラフィン切片を視神経付近から 2 標本、視神経から赤道部にかけての部位から 2 標本、赤道部から周辺部にかけての部位から 2 標本、作成して Hematoxilin-Eosin 染色を行い、光学顕微鏡にて観察を行い、網膜厚の評価を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 形状学的な評価項目である網膜厚の評価において、網膜内層が caspase3 群において、対照群と比較して、虚血再還流後 2 日目、7 日目で有意に網膜厚の減少が抑制されていた。(図 1)

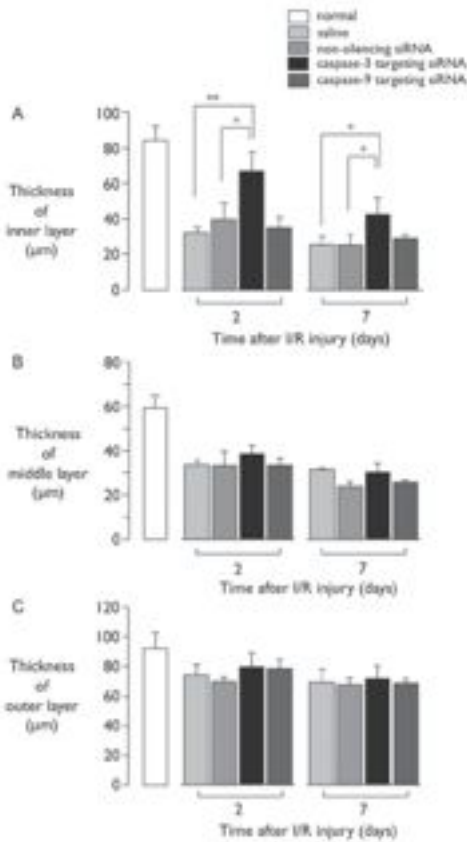


図 1：網膜各層の網膜厚

(2) もう一つの形態学的評価項目である、視神経節細胞数は caspase3 群、caspase9 群のいずれにおいても、虚血再灌流後 2 日目で対照群と比較して、有意な減少の抑制を認めた。以上の結果から、caspase3 群、caspase9 群のいずれにおいても、形態的に神経保護効果が確認された。(図 2)

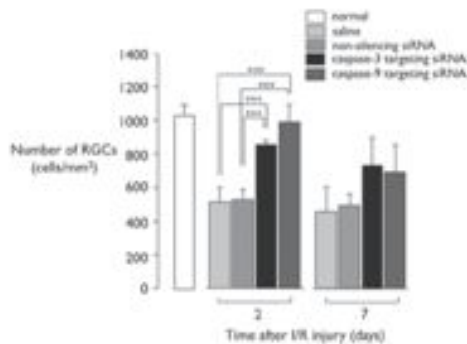


図 2：視神経節細胞数

(3) TUNEL 染色による TUNEL 陽性細胞数に

ついては、caspase3 群の虚血再還流 2 日目において、対照群と比較して有意に少なかったことから、対照群と比較して caspase3 群で有意に、アポトーシスが抑制されていることが確認された。(図 3)

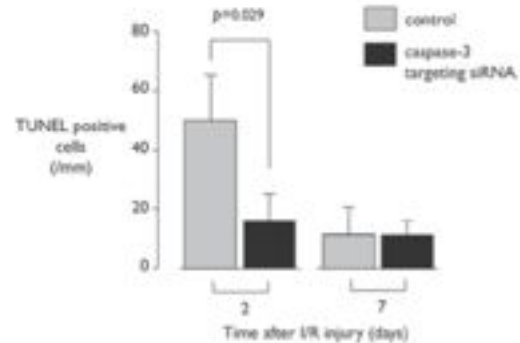


図 3：TUNEL 陽性細胞数

(4) Real-time rt-PCR による caspase3 mRNA は caspase3 群の虚血再還流後 2 日目において、対照群と比較して有意に発現が抑制されていた。

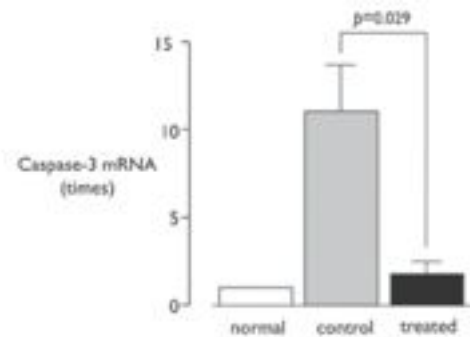


図 4：Real time rt-PCR

(5) (1)~(4)より、caspase3 に対する siRNA を硝子体注入することにより、虚血再還流モデルにおいて、caspase3 の発現が抑制され神経保護効果が得られることが確認された。

(6) Non-silencing siRNA とアテロコラーゲンの複合体は注入後 2 日目において、網膜上に付着をしており、眼内での安定性が確認された。アテロコラーゲン付着部位を含めて、網膜厚および視神経節細胞数は正常群と比較して、有意差を認めなかったことから、アテロコラーゲンは網膜毒性を持つ可能性が低く、硝子体注入における基剤として有用であることが確認された

#### 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)

Neuroprotective effect of small

interfering RNA targeted to caspase-3 on rat retinal ganglion cell loss induced by ischemia and reperfusion injury. Ishikawa S, Hirata A, Nakabayashi J, Iwakiri R, Okinami S. *Curr Eye Res.* 2012 Oct;37(10):907-13. doi: 10.3109/02713683.2012.688161. Epub 2012 May 29. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

Neuroprotective effects of siRNA, targeted caspase3, on rat retinal damage induced by different time course of transient ischemic injury. Ishikawa S, Hirata A, Nakabayashi J, Iwakiri R, Okinami S. 2013年5月8日 シアトル 米国

caspase3に対するsiRNAの網膜視神経節細胞保護効果の虚血時間による検討、石川慎一郎・平田憲・中林條・岩切亮・沖波聡 第117回日本眼科学会 2013年4月4日 東京

Neuroprotective effects of siRNA, targeted caspase9, and atelocollagen complex on rat retinal damage induced by transient ischemic injury. Ishikawa S, Hirata A, Nakabayashi J, Iwakiri R, Okinami S. 2012年5月10日 フロリダ 米国  
アテロコラーゲンと caspase9 に対する siRNA 複合体による神経保護効果、石川慎一郎・平田憲・中林條・岩切亮・沖波聡 第116回日本眼科学会 2012年4月6日 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 慎一郎 (ISHIKAWA, Shinichiro)

佐賀大学 医学部 助教

研究者番号：00404129