

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461252

研究課題名(和文) 腹膜線維症に対する治療用遺伝子デリバリー技術の開発

研究課題名(英文) The development of in vivo gene delivery systems to peritoneum to inhibit peritoneal fibrosis

研究代表者

森下 義幸 (Morishita, Yoshiyuki)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：30570494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：1. 脂質2重膜成分で構成されるnanoparticleにTGF- β 1-siRNAを内包するデリバリーシステムによる腹膜線維症(PF)治療法を開発した。

2. PFモデル腹膜で変化するmicroRNA(miRNA)をマイクロアレイ法で網羅的解析し、miRNA-21-5pをPF抑制標的miRNAとして選出した。miRNA-21-5p抑制用スモールRNAを人工核酸(LNA)で作成しそのPF改善効果を明らかにした。また腹膜透析(PD)患者で血清miRNA-21-5p, -221-5p, -327とPD排液中miRNA-221-3p, -34a-5pがPFのバイオマーカーとなる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：1. We developed an in vivo siRNA delivery system with liposome based nanoparticles (NPs) to peritoneum to inhibit peritoneal fibrosis. TGF- β 1-siRNAs encapsulated in NPs (TGF- β 1-siRNAs-NPs) dissolved in peritoneal dialysis (PD) fluid were intraperitoneally injected into the peritoneal fibrosis (PF) mice. They significantly knocked down TGF- β 1 expression in peritoneum and inhibited peritoneal thickness with fibrous change.

2. We identified microRNA(miRNA)-21-5p inhibition by anti-miRNA-21-5p-LNA is effective for the prevention of PF. We also identified that several microRNAs (miRNA-21-5p, miRNA-221-3p, miRNA-34a-5p and miRNA-327) may be useful as novel diagnostic biomarkers for PF.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：腹膜線維症 遺伝子治療 ドラッグデリバリー スモールRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦の慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) 患者数は1,330 万人に達し、新たな「国民病」として注目されている。大部分のCKDでは特異的治療法がないため、末期腎不全に進行し腎代替療法が必要となるCKD患者は増加の一途をたどっている。腎代替療法は腎移植と透析療法(血液透析、腹膜透析)に大別される。本邦ではドナー腎の不足から大部分の末期腎不全患者は透析による腎代替療法を選択せざるを得ない。透析療法には血液透析と腹膜透析がある。腹膜透析は血液透析が短時間で急激に透析をおこなうのに対して、長時間で少しずつ透析を行うマイルドな透析であることから、残存腎機能保持に優れること、医療機関へ通う必要性が少ない(月1回程度)ためこれまでと同様の生活が送れることなどの大きな利点がある。このような利点にもかかわらず、本邦では腹膜透析患者は全透析患者の4%以下に留まっている。その理由として腹膜透析は透析を継続しているうちに腹膜が劣化し十分な透析量を確保できなくなり10年以内に血液透析に移行しなければならないことが挙げられる。腹膜劣化の主要な病態変化は腹膜の経時的な線維化である腹膜線維症である。現在まで腹膜線維症を予防または治療する確実な方法はなく、その確立は長期間安全な腹膜透析を可能にし、腎不全患者の予後・生活の質向上などに極めて重要である。

(2) 治療法開発において遺伝子治療は塩基配列さえ分かれば理論上はあらゆる分子を標的にすることが可能である。このためリガンド結合部位を欠いていたたり、蛋白の三次元構造が他の分子と似ているなどの問題で、従来の小分子阻害薬や抗体を用いた治療では標的にできなかった分子を治療標的とすることができ、治療標的の選択肢を増やすことが可能である。

(3) 遺伝子治療に用いられている原理の中にRNA干渉(RNA interference; RNAi)がある。RNAiは20~25塩基の短鎖干渉RNA(siRNA)やmicroRNA(miRNA)などのスモールRNAにより誘導される遺伝子発現抑制のメカニズムである。siRNAとmiRNAの違いはsiRNAが単一のmRNA配列に特異的、完全相補的に結合しmRNAの発現を抑制するのに対して、miRNAは21-25塩基のうち6-8塩基が相補的であればmRNAに結合し発現を抑制することである。そのため通常1つのmiRNAは数多くの(100以上)のmRNAと結合しその発現を抑制している。

(4) RNAiによる遺伝子抑制のメカニズムを利

用した生体内での遺伝子治療では人工的に化学合成したスモールRNA(siRNAまたはmiRNA)を用いる方法がウイルスベクターを必要としないため、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療に付随する、発癌性、免疫源性の問題を回避できるため安全性、簡便性、法規制等の点から最も臨床応用が期待されている。しかし、スモールRNAは生体内に単独投与された場合、組織標的性がない、血清RNasesによる分解を受ける、水溶性高分子であるための細胞膜透過が非常に低い等の問題があり標的細胞内への到達は非常に困難である。したがって生体内でスモールRNAを用いたRNAiによる遺伝子抑制を治療に応用するために超えなければならない最大の壁は標的細胞への高効率で特異性の高いデリバリー技術の開発である。腹膜線維症を予防、治療するため腹膜にスモールRNAをデリバリーする方法は未だ開発されていない。

2. 研究の目的

(1) 腹膜への非ウイルスキャリアーによる治療用遺伝子(スモールRNA: siRNA, microRNA)デリバリー技術の開発をおこない腹膜線維症治療に応用する。

3. 研究の方法

1. TFG- β -siRNA-NPsによる腹膜線維化抑制

TFG- β は腹膜線維化においても主要なpro-fibroticシグナル経路であることからTFG- β -siRNAを治療用遺伝子として選択した。キャリアーとして脂質2重膜の構成成分であるリン脂質(phosphatidylcholineとdipalmitoylphosphatidylethanolamine)とコレステロールから構成される直径100-150nmのliposome-nanoparticles(NPs)を使用した。凍結乾燥したNPs(LipoTrusustTM EX oligo in vivo, 北海道システムサイエンス社)(500nmol)を50 μ MのTFG- β -siRNA水溶液100 μ lで再水和し、TFG- β -NPsを作製した。糖分解産物であるメチルグリオキサール(methylglyoxal: MGO)30mMを腹膜透析液に混注し連日腹腔投与し腹膜線維症(Peritoneal fibrosis mice: PF)モデルマウスを作製した。PFマウスに腹膜透析液にTFG- β -siRNA-NPs(siRNA 5nmol)を混注し(3回/週, 合計8回)投与し(PF+TFG- β -siRNA-NPs群)腹膜線維化抑制効果について検討した。未処置腹膜線維症マウス(PF群)、PFマウスにnon-targeted siRNA(control-siRNA)とNPs複合体(control-siRNA-NPs)を同様の方法で投与した群(PF+control-siRNA-NPs)、TGF- β -siRNAを単独投与した群(PF+TFG- β -siRNA)をコントロール群とした。

2. Anti-miRNA-21-LNA による腹膜線維化抑制

MGO 腹腔投与で誘導した腹膜線維症モデルラットから抽出した腹膜細胞で変化する miRNA をマイクロアレイ法で網羅的に解析した。その結果から miRNA-21-5p を腹膜線維症抑制の標的 miRNA として選出した。miRNA-21-5p 抑制のためのスモール RNA を人工核酸 (locked nucleic acid: LNA) で作成した (anti-miRNA-21-LNA, ジーンデザイン社外注)。Anti-miRNA-21-LNA (5nmol) を腹膜透析液に混注し MGO で誘導した PF マウスに 3 回 / 週 (合計 8 回) 投与 (PF+ anti-miRNA-21-LNA 群) し腹膜線維化抑制効果について検討した。未処置腹膜線維症マウス (PF 群)、腹膜線維症マウスに control-LNA を同様の方法で投与した群 (PF+ control-LNA 群) をコントロール群とした。

またマイクロアレイ法で同定した腹膜線維症モデルで上昇する miRNA の血中、腹膜透析排液中の発現を腹膜透析患者で qRT-PCR 法で測定し、腹膜平衡試験 (D/Pcr, D/Do glucose)、腹膜透析液排液中の腹膜劣化マーカー (CA125, MMP-2) および炎症マーカー (IL-6, FDP) との相関を解析し、miRNA の腹膜線維症のバイオマーカーとして有効性について検討した。

4. 研究成果

1. TFG- β_1 -siRNA-NPs による腹膜線維化抑制

PF+TFG- β_1 -siRNA-NPs 群ではコントロール群に比べて腹膜での TFG- β_1 陽性細胞増殖が有意に抑制されていた。また腹膜透析液排液中の TFG- β_1 濃度も有意に抑制されていた。組織学的検討で PF+ TFG- β_1 -siRNA-NPs 群で腹膜の線維性肥厚が有意に抑制され、 α -SMT 陽性の線維芽細胞増殖抑制が認められた。また腹膜平衡試験で腹膜機能の有意な改善傾向が認められた。以上の結果から NPs は TFG- β_1 -siRNA を腹膜にデリバリーし、TFG- β_1 を有意に抑制することにより腹膜線維化を抑制することが明らかになった。

2. miRNA-21-inhibitor BLA による腹膜線維化抑制

PF+anti-miRNA-21-LNA ではコントロール群に比べて腹膜での miRNA-21 の発現が有意に抑制されていた。組織学的検討で PF+anti-miRNA-21-LNA 群で腹膜の線維性肥厚が有意に抑制され、 α -SMT 陽性の線維芽細胞増殖抑制が認められた。さらに PF+anti-miRNA-21-LNA 群で miRNA-21 の標的遺伝子であり腹膜線維症の進展に関与することが報告されている PPAR- γ が過剰発現されていた。以上の結果から anti-miRNA-21-LNA の腹膜へのデリバリーで、

腹膜線維化が抑制可能なことが明らかになった。

miRNA のマイクロアレイ法の結果から 6 つの miRNA (miRNA-142-3p, miRNA-21-5p, miRNA-221-3p, miRNA-223-3p, miRNA-34a-5p, miRNA-327) が PF モデルの腹膜で 2 倍以上上昇していた。これらの miRNA の発現を PD 患者 33 名を対象に血清、腹膜透析液排液中で測定し腹膜平衡試験 (D/P-Cr, D/D0-glu)、腹膜透析液排液中の腹膜劣化マーカー (CA125, MMP-2) および炎症マーカー (IL-6, FDP) との相関を解析したところ血清 miRNA-21-5p, miRNA-221-3p, miRNA-327 と PD 排液中 miRNA-221-3p, miRNA-34a-5p の発現レベルと腹膜平衡試験 (D/P-Cr, D/D0-glu)、PD 排液中の腹膜劣化マーカー (FDP, MMP-2) が有意に相関していた。CA125, IL-6 との相関は認めなかった。以上の結果より miRNA が腹膜線維症のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

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 3 件)

1. Morishita Y, Yoshizawa H, Watanabe M, Imai R, Imai T, Hirahara I, Akimoto T, Ookawara S, Muto S, Nagata D. MicroRNA expression profiling in peritoneal fibrosis. *Transl Res.* 2016; 169: 47-66. (査読あり)
2. Yoshizawa H, Morishita Y, Watanabe M, Ishibashi K, Muto S, Kusano E, Nagata D. TGF- β_1 -siRNA delivery with nanoparticles inhibits peritoneal fibrosis. *Gene Ther.* 2015; 22: 333-340. (査読あり)
3. 森下義幸. スモール RNA デリバリーによる腎・腹膜線維化抑制. *腎と透析* 2016; 80: 415-422 (査読なし)

[学会発表] (計 5 件)

1. 森下義幸. 腹膜線維症を調節する microRNA の解析-治療ターゲットおよび新規バイオマーカーとしての可能性-第 59 回日本腎臓学会学術総会 2016.6.17-6.19, 横浜
2. Morishita Y, Nagata D. MicroRNA Expression Profiling in Peritoneal Fibrosis ASN Kidney Week 2015 2015.11.3-11.8 San Diego, CA, USA
3. Yoshizawa H, Morishita Y, Onishi A, Muto S, Kusano E. The Development Of In Vivo Small Interfering RNA Delivery System with

Nanoparticles to Peritoneum for the
Treatment Of Peritoneal Fibrosis ASN
Kidney Week 2013 2013.11.5-11.10
Atlanta, GA, USA

4. 吉澤寛道、森下義幸. Nanoperticle を担体
とした siRNA デリバリーシステムによる
腹膜線維症 第 57 回日本腎臓学会学術
総会 2014.7.4-7.6, 横浜
5. Morishita Y, Yoshizawa H, Watanabe M,
Onishi A, Muto S, Kusano E. Nanoparticles
Delivery of Anti-fibrotic siRNA to
Peritoneum Prevents The Pogression of
Peritoneal Fibrosis ISPD 2012.9.9-9.12
Kuala Lumpur Malaysia.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森下義幸 (MORISHITA YOSHIYUKI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：30570494