

令和元年6月12日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06970

研究課題名(和文) 眼特異的多機能型DDSによる革新的眼アミロイドーシス治療法の構築

研究課題名(英文) Therapeutic approach for ocular amyloidosis by ocular-targeted multi-functional drug delivery system

研究代表者

林 祐也 (Hayashi, Yuya)

熊本大学・医学部附属病院・特別研究員

研究者番号：50806429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、トランスサイレチン(TTR)型家族性アミロイドポリニューロパチー(TTR-FAP)における眼アミロイドーシスの新規治療法の構築を目的とし、眼特異的多機能型DDSの構築、TTR産生抑制効果、アミロイド線維形成抑制効果の評価を行った。種々の検討結果より、構築した眼特異的多機能型DDSは、標的である網膜色素上皮細胞選択的にsiRNAを送達し、TTR産生を抑制可能であることが明らかとなった。さらに、本キャリアはTTRアミロイド線維形成を抑制した。以上の結果より、本研究で構築した眼特異的多機能型DDSは、新規TTR-FAP眼アミロイドーシス治療法として有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにTTR-FAPにおける全身症状に対しては肝臓移植、内服薬、核酸医薬製剤が開発されたものの、眼アミロイドーシス症状に対する治療法は皆無であり、失明に陥ってしまう多くの患者がいる現状は何としてでも解決しなければならない。本研究で得られた眼特異的多機能型DDSにより眼におけるTTR産生およびアミロイド線維形成を抑制可能という成果は、眼アミロイドーシスの新たな治療法につながる重要な知見であると確信する。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we developed ocular-targeted multi-functional siRNA carrier for the therapeutic use of transthyretin (TTR)-related ocular amyloidosis, and evaluated the inhibitory effect of TTR expression and amyloid fibril formation. Ocular-targeted multi-functional carrier/TTR-siRNA complex elicited TTR silencing effects in vitro and in vivo. Furthermore, ocular-targeted multi-functional siRNA carrier showed potent inhibition of TTR amyloid fibril formation. In conclusion, the present study demonstrated the potentials of ocular-targeted multi-functional siRNA carrier as a novel TTR-related ocular amyloidosis therapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：眼アミロイドーシス ドラッグデリバリーシステム 核酸医薬 シクロデキストリン トランスサイレチン

1. 研究開始当初の背景

トランスサイレチン (TTR) 型家族性アミロイドポリニューロパチー (TTR-FAP) は、異型 TTR (ATTR) を原因タンパク質とする全身性アミロイドーシスであり、自然経過では約 10 年で死に至る難病である。本疾患は、臓器からの ATTR 産生およびアミロイド線維形成・沈着の二つの過程を経て発症する。この発症過程を標的とした TTR-FAP の全身症状に対する治療としては、ATTR の 90% 以上が肝臓で産生されることから、ATTR の産生抑制を企図した肝移植が実施され、症状進行抑制効果が示されてきた。また、近年、アミロイド線維形成の阻害を企図した薬剤 (ピンダケル®) が開発され、末梢神経障害の遅延などに効果を示している。しかし、肝移植では眼からの ATTR 産生を止められず、ピンダケル®は眼まで送達されないことから、いずれの治療法も全身症状に対する効果は認められるものの、眼症状 (緑内障、硝子体混濁など) の進行を抑制する手段となり得ず、失明を回避することはできない。ゆえに、現在、眼アミロイドーシスに対する臨床上有効な治療法はいまだ存在しない (図 1)。

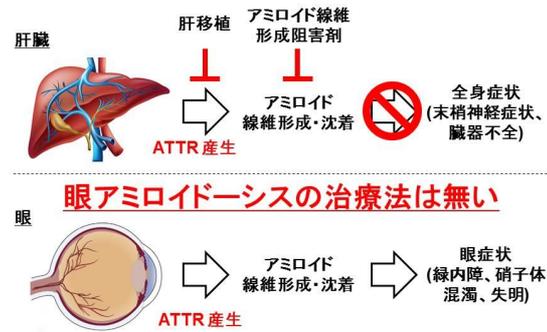


図 1. TTR-FAP におけるアミロイドーシス発症過程と現在の治療法

この現状を打破すべく、これまで我々は、眼アミロイドーシスの新規治療法開発研究の中で、TTR-FAP 眼アミロイドーシスを治療する為には、眼からの ATTR 産生抑制およびアミロイド線維形成抑制が重要であることを示す知見を得た。そこで本申請課題では、これら治療に必要な機能を兼ね備え、かつ眼アミロイドーシス治療に特化した眼特異的多機能型ドラッグデリバリーシステム (DDS) として葉酸修飾 dendrimer/シクロデキストリン結合体 (Fol-PαC) を創製し、TTR-FAP 眼アミロイドーシスの克服を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、新規 TTR-FAP 眼アミロイドーシス治療法の構築を最終目的とし、眼特異的多機能型ドラッグデリバリーシステム (DDS) の構築、TTR 産生抑制効果の評価、およびアミロイド線維形成抑制効果の評価を実施する。まず、眼特異的 siRNA キャリアとして Fol-PαC を合成後、Fol-PαC/siRNA 複合体を調製し、本複合体の眼特異的 siRNA キャリアとしての有用性および安全性を評価する。次に、本複合体による TTR 産生抑制効果およびアミロイド線維形成抑制効果の評価する。

3. 研究の方法

1) 眼特異的多機能型 DDS の構築

網膜色素上皮 (RPE) には葉酸受容体 (FR) が発現しており、受容体介在性エンドサイトーシスによる葉酸 (FA) の細胞内取り込みを担っている。そこで、FR に認識され、RPE 細胞に siRNA をデリバリー可能なキャリアとして葉酸修飾 dendrimer/シクロデキストリン結合体 (Fol-PαC) を合成する。Fol-PαC は、dendrimer にトシル化シクロデキストリンおよび FA 修飾ポリエチレングリコールを結合させることにより調製した。調製の確認は ¹H-NMR により行った。

2) FR 介在性細胞内導入能評価

Fol-PαC/siRNA 複合体の細胞内取り込みを検討するために、Fol-PαC/蛍光標識 siRNA 複合体を調製し、ヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19 細胞) へ適用後、フローサイトメーターを用いて細胞内取り込み効率を評価した。また、細胞内取り込みに FR が関与しているか否かを明らかにするために、葉酸受容体競合阻害剤として FA を添加後の細胞内取り込みについても同様に評価した。

3) キャリアの安全性評価

Fol-PαC/siRNA 複合体を細胞へ処理後の細胞障害性を WST-8 法によりマイクロプレートリーダーを用いて評価した。

4) アミロイド線形成抑制効果

TTR を酸性 pH 条件下でアミロイド線維を形成することが報告されている。本アミロイド線維形成条件化、Fol-PαC 処理後の TTR アミロイド線維形成について、チオフラビン T アッセイにより蛍光分光光度計を用いて評価した。なお、アミロイド線維形成に用いる TTR は、TTR-FAP 患者において最も多い変異体である ATTR Val30Met を用いた。

5) TTR 産生抑制効果

Fol-PαC/siRNA 複合体を ARPE-19 細胞に処理後の TTR 産生抑制効果をリアルタイム PCR により評価した。また、WT マウス (C57BL/6J マウス) および眼髄膜型症状を呈する ATTR を導入した TTR-FAP モデルマウス (ATTR Tyr114Cys Tg マウス) に Fol-PαC/siRNA 複合体を硝子体内投与後の TTR 産生抑制効果を評価した。siRNA は、米国 Alnylam 社から供与された臨床試験での使用実績のある TTR 標的 siRNA (siTTR) を用いた。

4. 研究成果

1) 眼特異的多機能型 DDS の構築

トシル化シクロデキストリンおよび dendrimer を DMSO に溶解し、窒素置換後、60 度で 24 時間反応させることにより dendrimer/シクロデキストリン結合体 (CDE) を得た。さらに、CDE および FA 修飾ポリエチレングリコールをほう酸緩衝液に溶解し、遮光条件下、室温で 48 時間反応させることで Fol-PαC を得た。¹H-NMR により、dendrimer にシクロデキストリンおよび FA 修飾ポリエチレングリコールが結合していることを確認した。

2) FR 介在性細胞内導入能評価

Fol-PαC/siRNA 複合体が FR を発現する RPE へ効率よく取り込まれるか否かを検討するため、FR 発現細胞である ARPE-19 (FR (+)) 細胞および FR 低発現細胞であるヒト肺がん上皮由来 (A549 細胞 (FR (-))) を用いて、Fol-PαC/蛍光標識 siRNA 複合体の細胞内取り込みをフローサイトメーターを用いて評価した。ARPE-19 細胞において、Fol-PαC/siRNA 複合体の細胞内取り込みは、市販の siRNA 導入試薬である Lipofectamine RNAiMAX と同等の高い値を示した。一方、A549 細胞において、Fol-PαC/siRNA 複合体の細胞内取り込みは、Lipofectamine RNAiMAX と比較して有意に低い値を示した。さらに、ARPE-19 細胞において、細胞内取り込みに及ぼす FR 競合阻害剤の影響を検討したところ、Fol-PαC/siRNA 複合体の細胞内取り込みは、FR 競合阻害剤である FA 添加濃度依存的に低下した (図 2)。このことから、Fol-PαC/siRNA 複合体は、標的とする RPE へ FR を介して効率よく取り込まれることが示唆された。

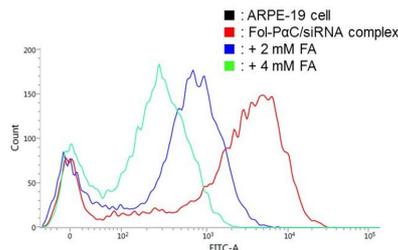


図 2. ARPE-19 細胞における Fol-PαC/siRNA 複合体の細胞内取り込みに及ぼす葉酸天下の影響

3) キャリアの安全性評価

本キャリアの安全性を検討するために、Fol-PαC/siRNA 複合体を ARPE-19 細胞へ処理後の細胞障害性を WST-8 法により評価した。トランスフェクション条件下、Fol-PαC/siRNA 複合体は細胞障害性を示さなかったことから、安全性を有する可能性が示唆された。

4) アミロイド線形成抑制効果

Fol-PαC が TTR-FAP 発症の一因である TTR アミロイド線維形成を抑制可能か否かを検討するために、アミロイド線維形成に及ぼす Fol-PαC 添加の影響をチオフラビン T アッセイにより評価した。その結果、TTR アミロイドに由来する蛍光は、Fol-PαC 添加により有意に低下した。このことから、Fol-PαC は TTR によるアミロイド線維形成を抑制可能であることが示唆された。

5) TTR 産生抑制効果

Fol-PαC/siRNA 複合体による TTR 産生抑制効果を明らかにするために、ARPE-19 細胞へ Fol-PαC/siTTR 複合体をトランスフェクション後の TTR 発現をリアルタイム PCR により評価した。その結果、Fol-PαC/siTTR 複合体は、Lipofectamine RNAiMAX と同様、有意に TTR 発現を抑制した。

これまでの検討より、Fol-P α C/siRNA 複合体は安全かつ FR を発現する RPE 選択的に TTR 産生を抑制し、TTR によるアミロイド線維形成も抑制可能である可能性が示唆された。そこで、Fol-P α C/siTTR 複合体をマウス硝子体内投与後の眼における TTR 発現をリアルタイム PCR により評価した。その結果、硝子体内投与 48 時間、siTTR 単独投与群では効果は見られないものの、Fol-P α C/siTTR 複合体投与群では、siCont 群と比較して有意に TTR 発現を抑制した (図 3)。さらに、Fol-P α C/siTTR 複合体は、ATTR Tyr114Cys Tg マウスにおいても同様に眼における TTR 産生を抑制した。このことから、Fol-P α C/siTTR 複合体は RPE からの TTR 産生を抑制可能であることが示唆された。

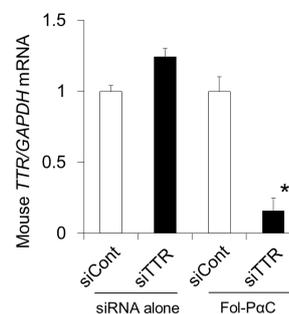


図 3. マウスへ硝子体内投与後の TTR 産生抑制効果

これら結果より、Fol-P α C/siRNA 複合体は安全かつ FR を発現する RPE において TTR 産生を抑制可能であり、TTR アミロイド線維形成も抑制することから、新規 TTR-FAP 眼アミロイドーシス治療法として有用となる可能性が示唆された。今回、申請研究では、TTR-FAP モデルである ATTR Tyr114Cys Tg マウスを用いて、眼内分布および組織内動態などを評価する予定であったが、Tg マウス交配後の出産数が少なく、個体数が確保できず、TTR 産生抑制効果の評価が主体となった。Tg マウスを用いた組織評価を含めた詳細な検討は、順次交配を進め、今後も継続して研究を行う予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Recent Advances in Oligonucleotide-based Therapy for Transthyretin Amyloidosis: Clinical Impact and Future Prospects, Y. Hayashi, H. Jono, Biol. Pharm. Bull., 41(12), 1737-1744 (2018). (査読有)

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。