

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号： 11401
研究種目： 奨励研究
研究期間： 2020～2020
課題番号： 20H01100
研究課題名 複数種のsiRNA混合による肝線維化抑制効果の検討

研究代表者

小松 幸恵 (komatsu, yukie)

秋田大学・医学系研究科・技術専門職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000円

研究成果の概要：本研究では、これまで肝線維化抑制効果が知られている複数種のsiRNAを混合させることによる肝線維化抑制効果検証を目的とし、培養細胞及びマウスで検討を行った。マウスへのsiRNA投与の予備実験としてマウス培養細胞でSec23A、Sec24D、HSP47の発現抑制効果の検討を行い、siRNAによる発現抑制効果を確認することができた。次にマウスへのsiRNA投与した際の導入効率確認のため、マウス尾静脈よりDNAを投与した結果、肝臓でのDNA発現を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝線維化は生活習慣病的要因により引き起こされ、肝硬変・肝癌へと進行するが、線維化に対する根本的な治療法は確立していない。肝線維化抑制の標的として単離された因子をsiRNAにより発現抑制することで肝線維化が抑制できると報告されているが、標的因子が必ずしも肝星細胞特異的でないという問題点がある。本研究において、これまで肝線維化抑制効果が知られているsiRNAを低濃度で混合させることで、より効率的かつ安全なsiRNA治療薬の開発へと繋げることが可能になると考える。

研究分野： 内科学一般、器官システム内科学、生体情報内科学およびその関連分野

キーワード： siRNA 肝線維化

1. 研究の目的

アルコール、肥満等の生活習慣病的要因により引き起こされる肝線維化は、肝硬変・肝癌へと進行するが、線維化に対する根本的な治療法は確立されていない。当研究室では肝星細胞の分泌経路に着目し、小胞体からの分泌に関与する因子 Sec23A/Sec24D を siRNA によって発現抑制することで I 型コラーゲンの分泌のみならず、肝線維化マーカーの発現を抑制できることを明らかにしている。また、これまでに HSP47 をはじめ、いくつかの因子が肝線維化抑制の標的として単離され、実際に発現抑制によって肝線維化が抑制できると報告されている。しかし、標的因子が必ずしも肝星細胞特異的でないという問題点がある。本研究では、これまで肝線維化抑制効果が知られている複数種の siRNA を低濃度で混合させることによる肝線維化抑制効果検証を目的とした。

2. 研究成果

マウスへの siRNA 投与の予備実験としてマウス培養細胞で Sec23A、Sec24D、HSP47 の発現抑制効果の検討を行った。まず、マウス培養細胞に Sec23A、Sec24D、HSP47 を発現させた後、免疫沈降とウエスタンブロッティングにより、それぞれに使用できる抗体の検討を行った。Sec23A はいくつかの市販の抗体にてプロットを行ったが、Sec23A と Sec23B 両方が検出されてしまい、Sec23A 特異的に検出できる抗体がなかったため、新たに抗体を作製した。これらの抗体を用いて、各種 siRNA によるノックダウンの効果を検討し、Sec23A および Sec24D、HSP47 について発現量の減少を確認した。これにより、マウス培養細胞での siRNA による発現抑制効果を確認することができた。

次にマウスへ siRNA を投与した際の導入効率を確認するため、まずはプラスミド DNA を用いて導入効率の確認を行った。マウス尾静脈へ多量の核酸溶液を急速に投与する Hydrodynamic Tail Vain injection (HTVi) 法によりプラスミド DNA を投与した。HTVi 法は投与の際の水圧によって肝臓へ核酸を導入することができる。プラスミド DNA と siRNA どちらにも使用できる溶液を用いて EGFP を発現するプラスミドを投与し、投与後 24 時間および 48 時間で肝臓を回収した。組織切片の EGFP 免疫染色を行った結果、投与後 24 時間において肝臓で発現を確認することができた。

今後は肝線維化モデルマウスへ Sec23A および Sec24D、HSP47 の siRNA 投与を行い、肝線維化抑制効果を検討し、その後、他の因子にも検討を拡大したいと考えている。

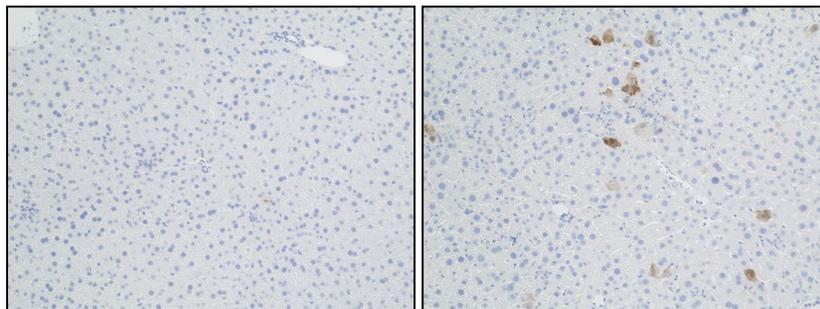


図 1 免疫染色した肝臓（投与後 24 時間） 左：control 右：EGFP

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
齋藤 康太	(Saito Kota)
前田 深春	(Maeda Miharuru)