

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590916

研究課題名(和文) 臨床応用を考慮したRNA干渉法による副甲状腺ホルモン産生制御法の開発

研究課題名(英文) Development of the parathyroid hormone production controlling method by the RNA interference in consideration of clinical application

研究代表者

田中 礼佳 (TANAKA, Reika)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：10372947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：二次性副甲状腺機能亢進症(2HPT)遺伝子治療の臨床応用への安全性を考慮し、ゲノムに損傷を与えないRNA干渉による手法の確立を試みた。テトラサイクリン誘導プロモーターによりヒト副甲状腺ホルモン(hPTH)に対するmiRNAを発現するプラスミドをhPTHを分泌する改変HEK293細胞へ導入した後、これをヌードマウスへ移植した。テトラサイクリン誘導体をマウスへ与えて血中のhPTH濃度の低下を確認し、ex vivoにおけるRNA干渉による制御系の有効性を確認した。同時に新たなRNA干渉の標的遺伝子の探索を行い、副甲状腺細胞の細胞死誘導に関連する因子としてc-myc、p27Kip1を見出した。

研究成果の概要(英文)：Considering the safety to clinical application of gene therapy for secondary hyperparathyroidism (2HPT), we attempted the establishment of the RNA interference system in order to prevent damaging patient's genomes. Expression of miRNA for human parathyroid hormone (hPTH) was controlled with tetracycline inducible promoter in modified HEK293 cells which express hPTH constitutively. The cells were transplanted into nude mice, and secretion of hPTH into serum was confirmed. As the decrease of hPTH concentration in serum by feeding doxycycline was shown, the validity of this system was checked. In parallel to this, the survey of new target genes applied to this system found c-myc and p27Kip1, genes related with apoptosis of parathyroid cells.

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：副甲状腺機能亢進症

1. 研究開始当初の背景

二次性副甲状腺機能亢進症 (2HPT) は慢性腎不全 (CKD) の過程で進行する、血中のカルシウムやリン、ビタミンDの濃度調整不良に反応した適応症として発症し、副甲状腺細胞の増殖と過形成、副甲状腺ホルモン (PTH) の過剰な産生と分泌を特徴とする。これにより、骨吸収、血管と柔組織の石灰化などが引き起こされ、心血管系疾患のリスクを増大させることが知られている。2HPT に対する療法として、近年、2HPT に対するカルシウム受容体作動薬が開発され効果を上げているが、これに抵抗性を示すものもあり、また、原発性の副甲状腺機能亢進症など、副甲状腺インターベンション (PTx、PEIT) の必要な症例はまだ多い。透析療法や副甲状腺インターベンションの結果、低 PTH 状態が長く経過すると患者の骨は低回転骨状態に陥り、骨形成・骨吸収がともに行われにくくなるために骨がもろくなる場合が往々にして見受けられる。PTx に際しては低 PTH 症の予防措置として組織片の自家移植が行われることが多いが、移植片の肥大化による 2HPT の再発や局所浸潤の症例も報告されており、適切な血中 PTH 濃度の管理は難しいのが実情である。

我々は、進行した 2HPT を呈する副甲状腺細胞の遺伝子発現状態を強制的に変化させる技術として RNA 干渉法 (RNA interference: RNAi) に注目し、その応用を試みてきた。RNA 干渉は細胞自身の持つ 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。機能亢進症の副甲状腺細胞は過剰量の PTH を産生・分泌しているが、この過剰分泌は 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、mRNA を直接の標的とする RNA 干渉法が有効であると予想されたので、我々は進行した 2HPT 患者より採取した副甲状腺細胞を培養し、その PTH 発現を指標とした RNA 干渉法の有効性を調査して以下の様に報告した。

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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 を導入したところ、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。

2. 研究の目的

遺伝子治療の臨床応用に関してその安全性を考慮したときに、従来の遺伝子組換えを行う方法では、個体の本来持つ遺伝子 (ゲノム) が傷つけられる可能性があり、発癌などを誘起する危険性が無視できない。私たちは RNA 干渉法を用いることにより、このような危険を最小に抑え、かつ確実な遺伝子発現の制御法を確立することを目的として、二次性副甲状腺機能亢進症を対象に研究を行ってきた。これまでに、副甲状腺細胞の初代培養の長期培養法を開発し、これに副甲状腺ホルモン mRNA に対する siRNA を導入して RNA 干渉を行うことで、副甲状腺ホルモンの産生・分泌を抑制する系を確立している。また、同 siRNA による *in vivo* RNAi により実験動物個体での PTH 産生を抑制することにも成功している。これらの技術をもとに、本応研究の目標を以下の様に設定した。

(1) ヒト副甲状腺ホルモン mRNA に対する RNA 干渉を用いた臨床応用可能な遺伝子治療システムの開発。これまでにヌードマウスの肝臓にヒトの副甲状腺を移植して副甲状腺ホルモンを過剰分泌させた系に対して、ハイドロダイナミック法により大量の siRNA を投与することで、ヒト副甲状腺ホルモンの分泌量を長期に渡り低下させることに成功しているが、ヒトに対してはこの方法は安全性の問題があるため使用できないと思われる。よって、細胞内で副甲状腺ホルモンに対する miRNA を発現させ、その発現量を外部より制御することで PTH 発現の制御を行う径を確立する。

(2) 二次性副甲状腺機能亢進症の発症と進行、あるいはその治療に深くかかわるとされる遺伝子発現の探索と解析。これまでは、最終産物である PTH の抑制を主として行ってきたが、いわゆる対症療法だけでなく、より根本的な治療のためには病態の原因に直接関与する遺伝子の特定とその発現制御の機序解明が必要である。そのため、発症と病態の進行に不明なところの多い二次性副甲状腺機能亢進症の遺伝子発現の変化を調

査して、発症や病態の進行に重要な遺伝子を特定することで、発症および病態進行の機序解明の糸口とするとともに、特定された遺伝子に対する RNA 干渉により副甲状腺細胞を機能亢進状態から正常状態へと制御する方法を模索する。

以上を本研究の目的として設定し、実験手法を計画する。この研究により、二次性副甲状腺機能亢進症の遺伝子治療の臨床応用を可能ならしめる技術の開発が期待されるとともに、その発症と進行についての重要な知見が得られることが期待される。

3. 研究の方法

(1) ヒト副甲状腺ホルモン mRNA に対する RNA 干渉を用いた臨床応用可能な遺伝子治療システムの開発： これまでに開発したハイドロダイナミック法による遺伝子治療法よりも、より安全性の高い臨床応用可能な手法として、副甲状腺ホルモンに対する microRNA (miRNA) の配列を細胞中で発現させ、これにより副甲状腺ホルモン mRNA に対する RNA 干渉を実現する。このとき、miRNA の発現をテトラサイクリン誘導プロモーターに制御させることにより、外部からのテトラサイクリンあるいはその誘導体であるドキシサイクリンの投与によって調整し、これにより分泌される副甲状腺ホルモン濃度を制御する系を開発する。このコンストラクトの導入細胞としては、副甲状腺細胞は培養下では増殖が難しいので、疑似的な副甲状腺細胞として、HEK293 細胞にヒト副甲状腺ホルモン遺伝子を構成的に発現させた改変 HEK293 細胞を用意し、これにコンストラクトを導入した。In vitro でドキシサイクリンによる miRNA 発現誘導を確認した後に、細胞をヌードマウスへ移植して、食餌へのドキシサイクリンの投与により、血中へ分泌されるヒト副甲状腺ホルモンの濃度変化を観察した。

(2) 二次性副甲状腺機能亢進症の発症と進行、あるいはその治療に深くかかわると思われる遺伝子発現の探索と解析： 新たな標的遺伝子を探索するために、cDNA サブトラクション法により、複数の条件の異なる状態の副甲状腺あるいは副甲状腺培養細胞から作製された cDNA 集団の中で、他の cDNA 集団よりも発現が多い物を選択的に増殖させることにより、元の細胞組織の状態に関連の深い遺伝子発現を探索する。今回は、副甲状腺摘出術により摘出され、提供を受けた副甲状腺組織で、二次性副甲状腺機能亢進症の病態の進行度の異なるもの数種類、原発性副甲状腺機能亢進症、カルシウム受容体作働薬であるシナカルセト塩酸塩の投与治療を続けられたもの、シナカルセト投与治療を受けなかったもの間でいくつかのサブトラクションを実施した。

4. 研究成果

(1) ヒト副甲状腺ホルモン mRNA に対する

RNA 干渉を用いた臨床応用可能な遺伝子治療システムの開発： テトラサイクリン誘導プロモーターにヒト副甲状腺ホルモンに対する miRNA を組み込んだコンストラクトをヒト副甲状腺ホルモン分泌性の改変 HEK293 細胞へ導入したものは、培地へドキシサイクリンを添加することによりヒト副甲状腺ホルモンの分泌の約 80% を抑制することができた。この細胞をヌードマウスに移植したところ、1 週間後には血中のヒト副甲状腺ホルモンの濃度が高まったので、ドキシサイクリンを経口投与したところ、投与 1 週間後には血中へのヒト副甲状腺分泌はほぼ完全に抑制された(下図右)。これにより、RNA 干渉法を用いた副甲状腺ホルモン産生の制御系が開発できた。今後はこの ex vivo の系から副甲状腺細胞を標的とした in vivo への遺伝子導入を実現し、実際に臨床応用できる系を確立する予定である。

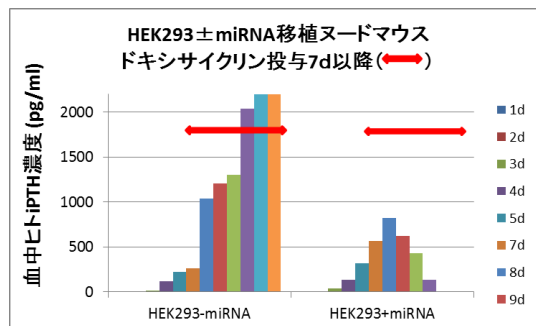
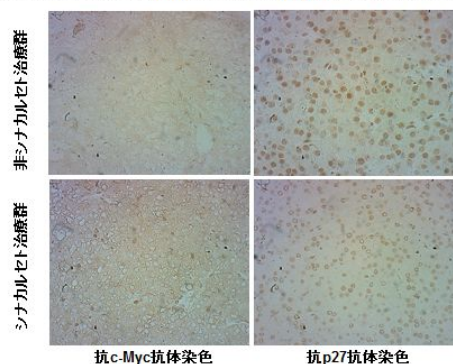


図. 血中ヒト副甲状腺濃度の推移を示す
左側 HEK293-miRNA: miRNA 遺伝子のない対照
右側 HEK293+miRNA: miRNA 遺伝子を導入したもの、赤矢印: ドキシサイクリン投与期間

(2) 二次性副甲状腺機能亢進症の発症と進行、あるいはその治療に深くかかわると思われる遺伝子発現の探索と解析： 種々の組み合わせによる cDNA サブトラクションを行い、その中から、シナカルセト塩酸塩による治療を受けた副甲状腺と受けなかった副甲状腺の比較で、シナカルセト塩酸塩治療を受けた副甲状腺で有意に多く発現している遺伝子として c-myc を単離した。組織切片の抗 c-myc 抗体染色から、実際にシナカルセト治療した副甲状腺組織において c-myc を発現する細胞が増えていることが確かめられ、c-myc の多くの機能の内、細胞周期の静止期 (G0 期) から G1 期への移行の促進に關与する可能性が考えられたので、その反対に働く (G1 期 G0 期) p27Kip1 の発現で確かめたところ、実際に多くの細胞で p27Kip1 のタンパク量が減少していることが確認できた(下図)。これらの結果は、シナカルセト塩酸塩投与を受けた副甲状腺で細胞増殖が刺激されていることを示唆するものだが、実際にはシナカルセト塩酸塩投与治療により、副甲状腺は縮退することが報告されており、その他の調査から、G1 期に移行した細胞の多くは細胞死の経路へ進んでいる可能性が示された。この結果は、

薬剤耐性を持つ副甲状腺に細胞死を引き起こすことのできる遺伝子治療の開発に繋がると期待されるので、(1)で開発された系を利用して、細胞死を制御する系の開発を計画中である。

シナカルゼト治療群でp27発現が低下、Myc発現細胞が増加する



図．副甲状腺組織切片の抗体染色を示す
上段：非シナカルゼト治療の組織切片
下段：シナカルゼト治療の組織切片
左列：抗 c-myc 抗体による染色
右列：抗 p27Kip1 抗体による染色

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

田中 礼佳 (TANAKA, Reika)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：10372947

(2)研究分担者

金井 巖太 (KANAI, Genta)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：00535221

澤田 佳一郎 (SAWADA, Kaichiro)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：10420952

角田 隆俊 (KAKUTA, Takatoshi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：50276854