

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592215

研究課題名(和文) ヒストン脱アセチル化酵素1(HDAC1) siRNAの遺伝子導入による関節炎治療

研究課題名(英文) Inhibition of experimental arthritis in mice by small interfering RNA targeting histone deacetylase 1 (siHDAC1) using in vivo electroporation method

研究代表者

西田 圭一郎(Nishida, Keiichiro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：80284058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：HDAC1に標的を絞り、siRNAの膝関節投与およびエレクトロポレーションを用いた遺伝子導入による局所治療を試みた。体重や関節炎の臨床評価には差は認めず、全身の関節炎に関する治療効果は認めなかったが、膝関節内のHdac1の発現は抑制され、滑膜増殖も抑制されていた。マウス滑膜組織から単離した滑膜線維芽細胞の炎症性サイトカイン産生能には治療群とコントロール群で差を認めなかった。HDAC1 siRNAの導入による関節破壊抑制効果はサイトカイン制御ではなく、滑膜増殖抑制に起因することが示唆された。HDAC1を標的としたin vivo遺伝子導入により局所関節において滑膜炎の制御が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We examined the therapeutic effects of siRNA targeting histone deacetylase 1 (siHDAC1) using in vivo electroporation method. Intraarticular injection of siHDAC did not affect redness or paw swelling of anti-collagen antibody-induced arthritis in mice. However, synovial proliferation, bone erosion, and degeneration of articular cartilage were milder in the knee joints treated with siHDAC1 than in the control group and the non-specific siRNA group. TUNEL stain revealed increased number of positive cells in the synovial tissue of siHDAC group. Decreased HDAC1 expression was noted in the synovial fibroblasts isolated from arthritic knee joints treated by siHDAC, but no significant difference was shown by RT-PCR in IL-6, TNF, and MMP-3 mRNA expression with those from control and non-specific siRNA group. Our results suggested therapeutic effects of intraarticular siHDAC1 with electroporation was derived by its anti-proliferative property by induction of synovial cell apoptosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：関節リウマチ ヒストン脱アセチル化酵素 遺伝子導入 エレクトロポレーション 抗コラーゲン抗体 誘導関節炎 Lipofection法 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに関節リウマチ(RA)に伴う滑膜の病的増殖をエピジェネティクスの破綻によるものと考え、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤による関節炎の人為的制御を試みてきた。さらに15種類のHDACアイソフォームの中で、RA滑膜ではHDAC1が強く発現することを報告した。また、1988年に2本鎖RNA(double-stranded RNA: dsRNA)によってRNA干渉(RNA interference: RNAi)を生じることが線虫を用いた研究ではじめて明らかにされた。RNAiの中間産物であるsmall interfering RNA(siRNA)を用いることで、特異的に遺伝子の発現を抑制できることが報告されている。

2. 研究の目的

関節炎モデルマウスの膝関節においてHdac1を標的とするsiRNAの局所投与の治療効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

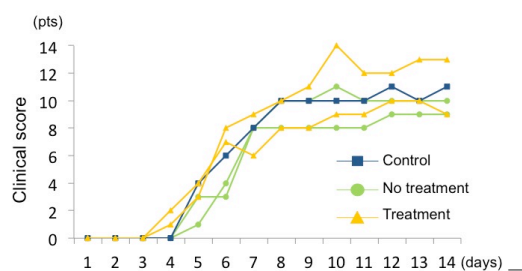
1) HDAC1 siRNA (siHDAC1)を5種類作成し、lipofecton法(Lipofectamine 2000 Reagent, Invitrogen)によりNIH-3T3細胞に導入し、ノックダウン効率を確認した。
2) 最もノックダウン効率の高かったsiHDAC1に蛍光標識を搭載し、正常マウス膝関節内に投与後、electroporation法(CUY21 electric pulse generator, 30V/cm²)を用いて細胞導入し蛍光顕微鏡で観察した。
3) DBA/1マウス(5匹)に抗II型コラーゲン抗体カクテル(150mg)とLPS(100μl)を投与し、関節炎を誘導した。コントロール、non-specific siRNA投与、siHDAC1投与に分け、経時的に体重、関節炎スコアの評価を行うとともに、関節炎誘導後5日目、10日目にsiRNA(10μg)を膝関節内に投与、14日目に組

織サンプルを採取した。膝関節の組織学的評価を行うとともに、滑膜組織から、mRNAを採取し、RT-PCRによりHDAC1 mRNAの遺伝子発現を検討した。さらに関節炎誘導後のマウスの膝関節内から、炎症滑膜を採取し、コラゲナーゼ処理を行い、マウス滑膜細胞を分離、培養した。培養した滑膜細胞に、siHDAC1、コントロールsiRNAをlipofecton法(Lipofectamine 2000 Reagent, Invitrogen)を用いて、導入した。導入後72時間で、RNAを抽出し、G3PDH、HDAC1、IL-6、TNF、MMP3の遺伝子発現をRT-PCRで解析した。

4. 研究成果

1) 投与したsiHDAC1は蛍光顕微鏡により滑膜、半月板、軟骨への集積を認め、関節内への確実な投与が確認できた。
2) 総関節炎スコアはLPS投与後から増加し、各群とも8日目頃にピークを迎えた。体重や関節炎の臨床評価には差は認めず、全身の関節炎に関する治療効果は認めなかった(図1)。

図1. CAIAマウスにおけるsiHdac1の治療効果



一方で摘出した左膝関節の滑膜組織から採取したmRNAではコントロール、非治療群と比較して、治療群ではHdac1の遺伝子発現が減少していた(図2)。組織像での関節炎評価はコントロール(n=4)、非治療群(n=5)と比較して、治療群(n=7)では有意に低値であった(図3)。

図 2. siHdac1 による Hdac1 の抑制効果

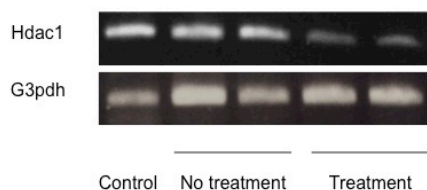
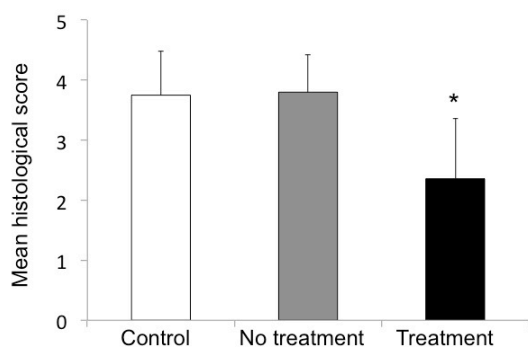
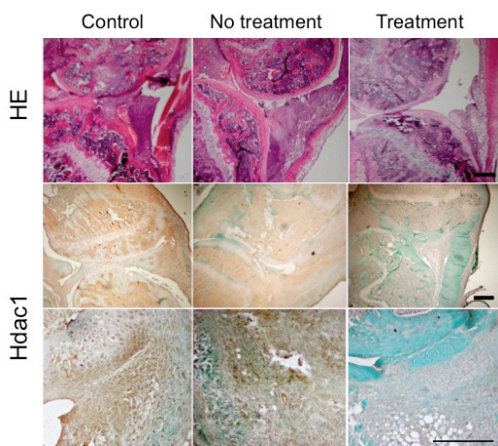


図 3. siHdac1 による関節炎の組織評価



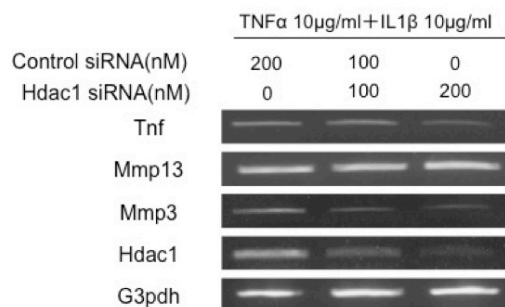
組織像(HE 染色)では、コントロール、非治療群では炎症細胞の浸潤を伴う滑膜細胞の増殖、パンヌスの形成を認めたが、治療群では、滑膜増殖は著明に抑制され、パンヌス形成は認めなかった。Hdac1 の染色では、コントロール、非治療群で Hdac1 の発現を認めたが、治療群では Hdac1 の発現は認めなかった(図 4)。

図 4. siHdac1 による関節炎の組織像と Hdac1 に対する免疫染色



さらに、マウス滑膜組織から単離した滑膜線維芽細胞に対する炎症性サイトカインによる刺激後の TNF α 、MMP-3、MMP-13 産生能には治療群とコントロール群で差を認めなかった(図 5)。

図 5. マウス滑膜線維芽細胞のサイトカイン刺激後の TNF α 、MMP-3、MMP-13 の発現に対する siHDAC1 の効果



以上の結果から、HDAC1 siRNA の導入による関節破壊抑制効果はサイトカイン、蛋白分解酵素発現の制御ではなく、滑膜の増殖抑制に起因する可能性が示唆された。本研究では HDAC1 を標的とした in vivo 遺伝子導入により局所関節において滑膜炎の制御が可能であることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

金澤智子 他、関節炎モデルマウスに対するヒストン脱アセチル化酵素 1(Hdac1) siRNA の治療効果の検討. 第 27 回日本整形外科基礎学術集会、2012 年 10 月 26-27 日、名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田圭一郎 (NISHIDA KEIICHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80284058

(2)研究分担者

大橋俊孝 (OOHASHI TOSHITAKA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：50194262

川畑智子 (KAWABATA TOMOKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90600669