

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659026

研究課題名（和文）腎特異的 siRNA デリバリーシステムの開発および腎線維化遺伝子治療への応用

研究課題名（英文）The development in vivo siRNA delivery system for the treatment of renal fibrosis

研究代表者

森下義幸（MORISHITA YOSHIYUKI）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：30570494

研究成果の概要（和文）：1) smad4-siRNA が TGF- β_1 刺激下でのヒト尿細管上皮細胞の上皮間葉転換を強力に抑制することを同定した。2) smad4-siRNA の antisense 鎖の 5' 末端および sense 鎖の 3' 末端に余剰塩基を付加し生体内での安定性を高めた stable-smad4-siRNA の経静脈的投与により腎線維化モデルマウスにおいて腎臓で有意な smad4 knock down および腎線維化抑制を認めた。以上の結果から腎への治療用 siRNA デリバリーシステムとして stable-siRNA の経静脈的投与と siRNA の腎での急速排泄という生理的動態の組み合わせが有効であり、さらに stable-smad4-siRNA 経静脈的投与により腎線維化抑制効果があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：1) We detected that smad4-siRNA could significantly inhibit the epithelial mesenchymal transition of HK-2 cells with stimulation of TGF- β_1 . 2) We intravenously injected modified smad4-siRNA that was added extra bases at 5 prime of antisense strand and at 3 prime of sense strand to increase its stability in vivo (stable-smad4-siRNA) to renal fibrosis mice. We detected that stable-smad4-siRNA could significantly knock down smad4 expression in kidney and inhibit renal fibrosis. These results suggested that the combination of stable-siRNA and the utilization of acute elimination of intravenously administrated siRNA by kidney is useful as the siRNA delivery system to kidney, and the systematic stable-smad4-siRNA administration may be a useful option for renal fibrosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：物理系薬学

科研費の分科・細目：ドラッグデリバリー

キーワード：ドラッグデリバリー、遺伝子治療、腎線維化

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦の慢性腎臓病患者数は 1,3000 万人に達し、新たな「国民病」とされている（日本腎臓学会, 2009）。すべての進行性腎疾患で尿細管間質線維化は腎不全へ至る共通病変であり、疾患の進行に糸球体病変より強く相関している（N Engl J Med ;339: 1448-1456, 1998）。現在までに尿細管間質線維化を特異的に抑制

する治療薬はなくその開発はすべての腎疾患治療において非常に有意義である。

(2) 治療薬の開発において遺伝子治療はこれまで創薬化が困難であった病因分子を標的とした新しい治療法となる可能性があり近年注目されている。遺伝子治療のなかで 21-23 塩基対からなる短鎖二本鎖 RNA (small interfering

RNA: siRNA) を用いた RNA 干渉 (RNA interfering: RNAi) を介した標的遺伝子抑制はウイルスベクターなど治療法そのものに付随した安全性の問題がなく早期の臨床応用が期待されている。しかし本来標的指向性を持たない siRNA は生体に投与された際、腎での急速排泄、血液中での分解、水溶性高分子であるための非常に低い細胞膜透過性等により標的細胞内へはほとんど到達しない(Annu Rev Med; 56: 401-423, 2005)。この問題を克服するため様々な siRNA デリバリーシステムが研究されているが、将来臨床応用化が期待できる尿細管間質への治療用 siRNA デリバリーシステムは未だ開発されていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は腎臓血行動態および尿細管細胞の特性を利用した末梢静脈から簡便に投与可能な尿細管間質への siRNA デリバリーシステムを開発し腎線維化治療へ応用することである。

3. 研究の方法

in vitro の実験

(1) 腎尿細管間質線維化を起こすシグナルとして TGF- β_1 /smad が中心的経路であることが報告されている(Nat Rev Mol Cell Biol; 7: 131-142, 2006, J Cell Biol; 130: 393-405, 1995)。

TGF- β_1 /smad 経路は尿細管上皮細胞が間葉系細胞に変化する上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition: EMT) に重要な役割を担っていて、EMT が腎線維化進展に関与することが報告されている。このことから不死化ヒト培養尿細管細胞 (HK-2 細胞) を用いて以下の実験をおこなった。

(2) HK-2 細胞を TGF- β_1 (1ng/ml) で刺激し EMT を誘導し上皮系細胞マーカー(E-cadherin (E-cad), occudin (Occl)) および間葉系細胞マーカー(α -smooth muscle actin (α -SMA), fibronectin (FN)) Vimentin (Vim)) の発現変化を qRT-PCR 法で測定した。また細胞の形態変化を光学顕微鏡で観察した。

(3) smad2-siRNA, smad3-siRNA, smad4-siRNA を lipofection 法で HK-2 細胞に transfection した後、TGF- β_1 (1ng/ml) で刺激し EMT がどの siRNA で最も強力に抑制されるのか、上皮系細胞マーカーおよび間葉系細胞マーカーの発現変化を qRT-PCR 法で形態変化を光学顕微鏡で比較検討することにより評価した。

(4) siRNA の尿細管細胞への取り込み効率と安定性を上昇させる目的で、siRNA の sense

鎖、antisense 鎖に余剰な塩基を付加した siRNA、尿細管細胞に取り込まれる性質が知られている 25-hydroxy vitamin D(25OHD)、アルギニン (Arg) とリシン(Lys)からなるペプチド(Lys-Lys-Arg-Arg)で以下のように修飾した siRNA を作成し HK-2 細胞で標的遺伝子の抑制効果および TGF- β_1 (1ng/ml) 刺激下での EMT 抑制効果について比較検討した。

① antisense 鎖の 5' 末端および sense 鎖の 3' 末端に余剰な塩基を付加した siRNA (stable-siRNA)

② antisense 鎖の 5' 末端に 25-hydroxy vitamin D(25OHD) を付加した siRNA (25OHD-siRNA)。

③ antisense 鎖の 5' 末端にアルギニン (Arg) とリシン(Lys)からなるペプチド (Lys-Lys-Arg-Arg) を siRNA の antisense 鎖 5' 末端に付加した siRNA (Lys-Lys-Arg-Arg-siRNA)。

in vivo の実験

(5) 9-10 週齢の雄 C57BL6 マウスに葉酸 (250 mg/kg) を腹腔内単回投与 (day 0) し腎線維化モデルマウスを作製した。

(6) 腎線維化マウスに stable-siRNA、25OHD-siRNA、Lys-Lys-Arg-Arg-siRNA をそれぞれ 5 nmol、尾静脈から day -1 より週 3 回の頻度で投与した。無処置群、siRNA 非投与群、target を持たない control-siRNA 投与群をコントロール群とし、葉酸投与後 21 日に標的遺伝子の抑制効率を qRT-PCR 法で測定した。

(7) 体重、腎重量、腎機能を比較検討した。さらに腎組織切片で Azan 染色をおこない線維化の程度を評価した。

(9) 腎線維化に関与するシグナルの変化について qRT-PCR 法で比較検討した。

(10) 尿細管間質線維化で増殖している線維芽細胞の由来を検討する目的で、上皮系細胞マーカー (E-cad, Occl)、間葉系細胞マーカー (α -SMA,)、血管内皮細胞マーカー (CD31)、白血球マーカー (CD45)、血管周皮細胞マーカー (PDGFR, NG2) の変化を qRT-PCR 法で比較検討した。

4. 研究成果

in vitro の実験

(1) HK-2 細胞に smad2-siRNA, smad3-siRNA, smad4-siRNA を lipofection 法で transfection し 24 時間後 TGF- β_1 (1ng/ml) を加え、さらに 24 時間と 48 時間後に smad2, smad3, smad4 の

knock down 効率と上皮系細胞マーカー(E-cad, Occl)および間葉系細胞マーカー(α -SMA, FN, Vim)の発現を比較検討したところ smad2, smad3, smad4 の knock down 効率は同程度 (60-70% knock down) であったが TGF- β ₁ 刺激による上皮系細胞マーカーの減少および間葉系細胞マーカーの上昇は smad4-siRNA transfection で最も強く抑制されていた。また細胞形態も smad4-siRNA transfection で最も敷石上の上皮細胞形態が維持されていた。この結果から腎線維化抑制の遺伝子治療に smad4-siRNA を用いることを決定した。

(2)stable-smad4-siRNA,25OHD-smad4-siRNA,Lys-Lys-Arg-Arg-smad4-siRNA の HK-2 細胞での knock down 効率を評価したところ stable-smad4-siRNA、25OHD-smad4-siRNA では有効な smad4 knock down 効率が得られなかったが、Lys-Lys-Arg-Arg-smad4-siRNA では smad4 のある程度の knock down 効果を認めた。

in vivo の実験

(3)腎線維化マウスに 1 回 5nmol の stable-smad4-siRNA、control-siRNA、25OHD-smad4-siRNA および、Lys-Lys-Arg-Arg-smad4-siRNA を週に 3 回 3 週間、尾静脈から経静脈的に投与したところ、control-siRNA 投与群、25OHD-smad4-siRNA 投与群および Lys-Lys-Arg-Arg-smad4-siRNA 投与群では腎臓で有効な smad4 knock down が得られなかったのに対して、stable-smad4-siRNA 投与群で有意な smad4 knock down が認められた。

(2)体重および腎重量は stable-smad4-siRNA 投与群で control-siRNA 投与群、25OHD-smad4-siRNA 投与群および Lys-Lys-Arg-Arg-smad4-siRNA 投与群と比較し、体重減少、腎重量減少が軽減されていた。

(3)血液検査で stable-smad4-siRNA 投与群で control-siRNA 投与群、25OHD-smad4-siRNA 投与群および Lys-Lys-Arg-Arg-smad4-siRNA 投与群と比較し、腎機能の悪化 (BUN, Cr の上昇) が軽減されていた。

(4)腎組織切片の Azan 染色による腎線維化の検討では stable-smad4-siRNA 投与群で control-siRNA 投与群、25OHD-smad4-siRNA 投与群および Lys-Lys-Arg-Arg-smad4-siRNA 投与群と比較し、有意な腎線維化抑制効果が認められた。

(5)腎組織で stable-smad4-siRNA 投与群で control-siRNA 投与群、25OHD-smad4-siRNA 投与群および Lys-Lys-Arg-Arg-smad4-siRNA

投与群と比較し、TGF- β ₁, snail, PDGF-B, Adam12 の抑制が認められた。

(6)腎組織で stable-smad4-siRNA 投与群で control-siRNA 投与群、25OHD-smad4-siRNA 投与群および Lys-Lys-Arg-Arg-smad4-siRNA 投与群と比較し、間葉系細胞マーカー (α -SMA), 血管内皮細胞マーカー (CD31), リンパ球マーカー (CD45), 血管周皮細胞マーカー (PDGFR, NG2) の上昇が抑制されていた。上皮系細胞マーカー (E-cad, Occl) は各群で変化を認めなかった。

以上より in vitro の実験で smad4 が尿細管上皮細胞 (HK-2 細胞)の EMT を強力に抑制することが明らかになった。また腎線維化モデルマウスを用いた in vivo の実験では smad4-siRNA に 25-hydroxy vitamin D を付加した siRNA (25OHD-smad4-siRNA)やペプチド (Lys-Lys-Arg-Arg) を付加した siRNA (Lys-Lys-Arg-Arg-smad4-siRNA) より antisense 鎖の 5'末端および sense 鎖の 3'末端に余剰な塩基を付加した siRNA (stable-smad4-siRNA) を腎からの siRNA の急速排泄という生理的動態と組み合わせることが腎尿細管への有効な治療用 siRNA デリバリーシステムとして、腎線維化遺伝子治療に有効であると考えられた。しかし、in vitro で HK-2 細胞に遺伝子導入効果のあった Lys-Lys-Arg-Arg-smad4-siRNA が in vivo で腎臓での有効な smad4 knock down 効果を示さず、in vitro で遺伝子導入効果のなかった stable-smad4-siRNA が in vivo で有意な smad4 knock down 効果を示した in vitro と in vivo の結果の乖離については、生体内での血行動態や腎尿細管での分子再吸収機構などの影響が推定されたが詳細な機序については未解明であった。この点について今後検討していきたいと考えている。また stable-smad4-siRNA により smad4 を knock down することによる腎線維化抑制効果の機序として上皮系細胞マーカーの変化が認められなかったことから、本研究の腎線維化モデルマウスでは腎線維化に尿細管上皮細胞の EMT の関与が低く、血管内皮細胞由来、リンパ球由来、血管周皮細胞由来の線維芽細胞および元来存在していた線維芽細胞の増殖が関与しており、これらの変化が stable-smad4-siRNA による smad4 knock down により抑制されたことが示唆されたが、この点は未だ確証にいたっていない。この点を明らかにするため今後、各群の腎組織切片で尿細管上皮マーカー (E-cad), 血管内皮細胞マーカー (CD31), リンパ球マーカー (CD45), 血管周皮細胞マーカー (PDGFR) と線維芽細胞マーカー (α -SMA) の 2 重染色をおこない、腎線維化に関わる細胞群の詳細な同定およ

び stable-smad4-siRNA による腎線維化抑制の詳細な機序を今後検討したいと考えている。

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 1 件)

①森下義幸, 吉澤寛道, 大西央, 草野英二: 腎特異的 siRNA デリバリー技術の開発と腎線維化治療. 腎; 35: 123-126, 2012 (査読なし)

[学会発表] (計 1 件)

①Morishita Y, Yoshizawa H, Onishi A, Watanabe M, Kusano E: Systemic smad4-siRNA administration prevents interstitial fibrosis partially by inhibiting the proliferation of myofibroblasts derived from pericytes in renal fibrosis mouse. The 45th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Oct. 30-Nov. 4, 2012, sandiego, CA, USA

[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

森下義幸 (MORISHITA YOSHIYUKI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 30570494