

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590348

研究課題名(和文)細胞表面のコラーゲン受容体を介する標的細胞特異的な siRNA 送達

研究課題名(英文)Target-cell specific siRNA delivery via collagen receptors on the cells

研究代表者

武井 佳史 (TAKEI, YOSHIFUMI)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70362233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：RNA干渉を誘導する短い2本鎖RNA (siRNA) を医薬品応用するためには、siRNAを疾患部位特異的に送達させる技術が必要不可欠である。我々はこれまでにsiRNA・アテロコラーゲン複合体が炎症部位の炎症性マクロファージや腫瘍組織の癌細胞に特異的に送達され、なおかつ薬理効果を示す事を証明してきた。本課題ではその分子機序を解明するため、網羅的遺伝子解析を行い、炎症性マクロファージや癌組織で発現増加するコラーゲン結合タンパク質を多数同定した。そのうち、CD280がsiRNA・アテロコラーゲン複合体の炎症性マクロファージや癌細胞への取込に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Successful short interfering RNA (siRNA)-based therapy for various diseases depends on functional siRNA delivery specific to disease-responsible cells in vivo. We have shown siRNA/atelocollagen complex was specifically delivered into inflammatory macrophages in inflammatory sites, or tumor cells in tumor tissues in vivo. Thus, we aimed the molecular mechanism to explain the specific delivery. According to comprehensive gene expression array analysis, we found many upregulated genes, which conserve collagen-binding properties, in inflammatory macrophages and tumor cells. Among them, we discovered that CD280, a transmembrane-type collagen receptor, can play a critical role in such specific uptake of siRNA/atelocollagen complex into inflammatory macrophages and tumor cells.

研究分野：医化学一般

キーワード：核酸医薬 siRNA drug delivery アテロコラーゲン 癌治療 炎症治療 コラーゲン受容体

1. 研究開始当初の背景

RNA interference (RNAi) は標的遺伝子配列に相補的な短い 2 本鎖 RNA (short interfering RNA, siRNA) による遺伝子発現抑制技術である。RNAi による遺伝子サイレンシングは、その標的塩基配列特異性や発現抑制効果が高いことから、癌を含む難治性疾患への臨床応用がとても期待されている。siRNA による RNAi 効果をマウス個体レベルにおける疾患治療実験に応用するためには、siRNA の全身性投与を可能にする in vivo デリバリー技術が必要不可欠である。既報において、陽イオン脂質法や陽イオンポリマー法などがあるが、全身性に投与した siRNA を疾患部位だけに到達させ、かつその標的細胞 (疾患原因細胞) 内にのみ導入させる手法について、報告がない。

2. 研究の目的

我々はこれまでにマウスに尾静脈注した siRNA・アテロコラーゲン複合体が炎症部位の炎症性マクロファージや腫瘍組織の腫瘍細胞 (癌細胞) に対して、特異的にデリバリーされて RNAi を発動後、抗炎症効果や抗癌効果 (= 薬理治療効果) を示す事を証明してきた (Ishimoto T, et al. Mol Ther 2008; Mu P, et al. Int J Cancer 2009; and Inaba S, et al. Mol Ther 2012)。In vivo における標的細胞特異的 (疾患原因細胞特異的) な siRNA デリバリー法 (Target-cell specific delivery) の確立は、副作用の少ないより安全な siRNA 核酸医薬の実現のために必要不可欠である。本課題では、siRNA・アテロコラーゲン複合体が示す標的細胞特異性の分子メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 炎症性マクロファージにおける siRNA・アテロコラーゲン複合体の導入分子機序の解明

炎症性マクロファージの作成

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を IFN- γ で刺激し、炎症性マクロファージ RAW 細胞を得た。また、マウス腹腔にチオグリコレートを注入し、腹腔滲出型の炎症性マクロ

ファージも調製した。

網羅的遺伝子発現解析 (アレイ解析)

調製した炎症性マクロファージから総 RNA を取り、常法により網羅的遺伝子発現解析 (Whole Mouse Genome Microarray ver. 2, Agilent 社) を行った。コラーゲン結合分子のアノテーション解析作業も行った。

網羅的遺伝子発現解析 (アレイ解析) の検証

リアルタイム定量 PCR 法で検証した。ABI 社のタックマンプローブ及びその関連試薬を用いた。

炎症性マクロファージに取り込まれた siRNA 量の定量測定実験

炎症性マクロファージに siRNA・アテロコラーゲン複合体を作用させた後、small RNA 画分を抽出した。測定対象とする siRNA のアンチセンス鎖に相補的な蛍光標識オリゴ RNA probe を用いてハイブリダイゼーション反応を施行した。ハイブリダイズしたオリゴ 2 本鎖 RNA を逆相 HPLC で検出し、定量化した (濃度既知の siRNA について、検量線を作成し、検体中の siRNA 濃度・含量を求めた)。

(2) 癌細胞における siRNA・アテロコラーゲン複合体の導入分子機序の解明

ヒト前立腺癌細胞株

3 種のヒト前立腺癌細胞株 (PC-3 細胞、LNCaP 細胞及び DU145 細胞) と 2 種のヒト正常前立腺細胞を用いた。

網羅的遺伝子発現解析 (アレイ解析)

癌細胞等から総 RNA を取り、常法により網羅的遺伝子発現解析 (Whole Human Genome Microarray ver. 2, Agilent 社) を行った。

網羅的遺伝子発現解析 (アレイ解析) の検証

リアルタイム定量 PCR 法で検証した。

癌細胞に取り込まれた siRNA 量の定量

上記の炎症性マクロファージの実験系と同様の方法を用いた。

4. 研究成果

(1) 炎症性マクロファージにおける siRNA・アテロコラーゲン複合体の導入分子機序の解明

IFN- γ により刺激活性化して得た炎症性マクロファージ RAW 細胞やマウス腹腔にチオグリコレートを注入して調製した腹腔滲出型の炎症性マクロファージについて、網羅的遺伝子アレイ解析を施行した。コントロールとして、刺激活性化をしていないマクロファージ RAW 細胞を用いた。炎症性マクロファージにおいて発現が増加した遺伝子を選別し、さらにコラーゲンに結合する特性を示すもの(コラーゲン受容体等)をピックアップした。

多くの遺伝子が同定されたが、今回、我々は CD280 (Endocytic collagen receptor) に注目することとした。CD280 は細胞膜貫通型のタンパク質であり、細胞外に型コラーゲン結合部位がある。活性化していないマクロファージ RAW 細胞では全く発現しておらず、炎症性マクロファージに誘導すると、その発現量が劇的に上昇する特性があった。定量 PCR による実験においても、同様の発現プロファイルを示した。

CD280 に対する siRNA 又は shRNA を炎症性マクロファージ RAW 細胞に導入して CD280 をノックアウトした後、siRNA・アテロコラーゲン複合体 (RAW 細胞が endogenous に常時発現する MCP-1 に対する siRNA を複合体化した) を反応させた。その結果、炎症性マクロファージ RAW 細胞で CD280 をなくすと、siRNA・アテロコラーゲン複合体が細胞の中に入らなくなった (取り込まれた siRNA の定量実験による)。また、アテロコラーゲンと複合体化した siRNA の標的遺伝子である MCP-1 の発現抑制効果も有意に減弱した。siRNA・アテロコラーゲン複合体の細胞内への導入において、CD280 が重要な役割を持つことが示唆された。

(2) 癌細胞における siRNA・アテロコラーゲン複合体の導入分子機序の解明

ヒト前立腺癌 PC-3 細胞、LNCap 細胞及び

DU145 細胞について、網羅的遺伝子アレイ解析を行った。2種のヒト正常前立腺細胞をコントロールとした。前立腺癌細胞において発現が増加した遺伝子を選別し、さらにコラーゲンに結合する特性を示すもの(コラーゲン受容体等)をピックアップした。

同定された遺伝子群を詳しく見ていくと、炎症性マクロファージにおいて見出した CD280 の発現パターンが魅力的であった。正常前立腺細胞での発現量が極めて低く、悪性度の高い骨転移性のヒト前立腺癌細胞 PC-3 で発現が明らかに上昇していることが分かった。

CD280 に対する siRNA 又は shRNA を PC-3 細胞に導入して CD280 をノックアウトした後、siRNA・アテロコラーゲン複合体 (PC-3 細胞が endogenous に常時発現する VEGF-A に対する siRNA を使用) を反応させた。その結果、CD280 がないと、siRNA・アテロコラーゲン複合体が細胞の中に入らなくなった (siRNA の定量実験による)。アテロコラーゲンと複合体化した siRNA の標的遺伝子である VEGF-A の発現抑制効果も有意に低下した。siRNA・アテロコラーゲン複合体の癌細胞内への導入において、CD280 分子が重要な役割を示すことを見出した。

以上、炎症性マクロファージで発現増加する CD280 を介して、siRNA・アテロコラーゲン複合体が細胞内に取り込まれる可能性を示す成果を得た。前立腺癌においても、同腫瘍細胞において発現増加する CD280 を介した類似な分子メカニズムが想定された。また、CD280 以外のコラーゲン結合タンパク質やコラーゲン受容体も数多く同定した。今後、これらのコラーゲン結合タンパク質についても解析を進める予定である。siRNA・アテロコラーゲン複合体の細胞内導入の分子メカニズムについて、包括的な解明成果が期待される。

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 16 件)

1. Fujimoto I, Takei Y*. (*, corresponding author). Atelocollagen-mediated siRNA delivery: future promise for therapeutic application. *Ther Deliv*, 5: 369-371 (2014). 査読有り
doi: 10.4155/tde.14.8.
2. Takei Y*, Ohnishi N, Kisaka M, Mihara K. (*, corresponding author). Determination of abnormally expressed microRNAs in bone marrow smears from patients with follicular lymphomas. *SpringerPlus*, 3: 288 (2014). 査読有り doi: 10.1186/2193-1801-3-288.
3. Takei Y*. (*, corresponding author). Electroporation-mediated siRNA delivery into tumors. *Methods Mol Biol*, 1121: 131-138 (2014). 査読有り doi: 10.1007/978-1-4614-9632-8_11.
4. Horibe H, Murakami M, Iohara K, Hayashi Y, Takeuchi N, Takei Y, Kurita K, Nakashima M. Isolation of a stable subpopulation of mobilized dental pulp stem cells (MDPSCs) with high proliferation, migration, and regeneration potential is independent of age. *PLoS One*, 9: e98553 (2014). 査読有り doi: 10.1371/journal.pone.0098553.
5. Kinashi H, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Terabayashi T, Nagura F, Hattori R, Matsukawa Y, Mizuno T, Noda Y, Nishimura H, Nishio R, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Takei Y. TGF- β 1 promotes lymphangiogenesis during peritoneal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 24:1627-1642 (2013). 査読有り
doi: 10.1681/ASN.2012030226.
6. Murakami M, Horibe H, Iohara K, Hayashi Y, Osako Y, Takei Y, Nakata K, Motoyama N, Kurita K, Nakashima M. The use of granulocyte-colony stimulating factor induced mobilization for isolation of dental pulp stem cells with high regenerative potential. *Biomaterials*, 34:9036-9047 (2013). 査読有り
doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.011.
7. Mihara K, Bhattacharyya J, Kitanaka A, Yanagihara K, Kubo T, Takei Y, Asaoku H, Takihara Y, Kimura A. T-cell immunotherapy with a chimeric receptor against CD38 is effective in eliminating myeloma cells. *Leukemia*, 26:365-367 (2012). 査読有り
doi: 10.1038/leu.2011.205.
8. Inaba S, Nagahara S, Makita N, Tarumi Y, Ishimoto T, Matsuo S, Kadomatsu K, Takei Y*. (*, corresponding author). Atelocollagen-mediated systemic delivery prevents immunostimulatory adverse effects of siRNA in mammals. *Mol Ther*, 20:356-366 (2012). 査読有り
doi: 10.1038/mt.2011.221.
9. Bhattacharyya J, Mihara K, Ohtsubo M, Yasunaga S, Takei Y, Yanagihara K, Sakai A, Hoshi M, Takihara Y, Kimura A. Overexpression of BMI-1 correlates with drug resistance in B-cell lymphoma cells through the stabilization of survivin expression. *Cancer Sci*, 103:34-41 (2012). 査読有り
doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02121.x.
10. Kubo T, Takei Y, Mihara K, Yanagihara K, Seyama T. Amino-modified and lipid-conjugated dicer-substrate siRNA enhances RNAi efficacy. *Bioconjugate Chem*, 23:164-173 (2012). 査読有り
doi: 10.1021/bc200333w.
11. Koide, N, Yasuda K, Kadomatsu K, Takei Y*. (*, corresponding author). Establishment and optimal culture conditions of microRNA-induced pluripotent stem cells generated from HEK293 cells via transfection of microRNA-302s expression vector. *Nagoya J Med Sci*, 74:157-165 (2012). 査読有り

http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya_j_med_sci/7412/16_Koide.pdf

12. Suzuki Y, Ito Y, Mizuno M, Kinashi H, Sawai A, Noda Y, Mizuno T, Shimizu H, Fujita Y, Matsui K, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Takei Y. Transforming growth factor- β induces vascular endothelial growth factor-C expression leading to lymphangiogenesis in rat unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int*, 81:865-879 (2012). 査読有り
doi: 10.1038/ki.2011.464.
13. Kubo T, Yanagihara K, Takei Y, Mihara K, Sato Y, Seyama T. Lipid-conjugated 27-nucleotide double-stranded RNAs with dicer-substrate potency enhance RNAi-mediated gene silencing. *Mol Pharm*, 9:1374-1383 (2012). 査読有り
doi: 10.1021/mp2006278.
14. Bhattacharyya J, Mihara K, Kitanaka A, Yanagihara K, Kubo T, Takei Y, Kimura A, Takihara Y. T-cell immunotherapy with a chimeric receptor against CD38 is effective in eradicating chemotherapy-resistant B-cell lymphoma cells overexpressing survivin induced by BMI-1. *Blood Cancer J*, 2:e75 (2012). 査読有り
doi: 10.1038/bcj.2012.21.
15. Kubo T, Yanagihara K, Takei Y, Mihara K, Sato Y, Seyama T. SiRNAs conjugated with aromatic compounds induce RISC-mediated antisense strand selection and strong gene-silencing activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 426:571-577 (2012). 査読有り
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.128.

〔学会発表〕(計 18 件)

1. Terabayashi T, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Kinashi H, Sakata F, Maruyama S, Takei Y, Matsuo S. Vascular endothelial growth factor receptor-3 can be a new

target to improve ultrafiltration dysfunction in methylglyoxal-induced peritoneal injury. American Society of Nephrology, Kidney Week 2014 (Nov 11, 2014: Philadelphia, PA, USA).

2. 武井佳史、柳原五吉 スキルス胃癌の腹膜転移に特徴的な代謝経路の同定と腹膜転移抑止への応用 第 73 回日本癌学会学術総会 (2014 年 9 月 25 日: パシフィコ横浜 神奈川県・横浜市)

3. 武井佳史、柳原五吉 スキルス胃癌におけるペントースリン酸経路の亢進は細胞の酸化ストレスを軽減し、腹膜転移の促進に働く 第 72 回日本癌学会学術総会 (2013 年 10 月 3 日: パシフィコ横浜 神奈川県・横浜市)

4. 武井佳史、柳原五吉 スキルス胃癌株におけるペントースリン酸経路の亢進は細胞の酸化ストレス軽減に作用し、腹膜転移を促進する 第 86 回日本生化学会大会 (2013 年 9 月 11 日: パシフィコ横浜 神奈川県・横浜市)

5. Takei Y. The microRNA miR-516a-3p regulates the Wnt pathway by targeting extracellular sulfatase1 in human scirrhous gastric cancers: its application for anti-metastatic therapy. 9th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association: Breakthrough in Basic and Translational Cancer Research. (Feb 21, 2013: Lahaina, HI, USA).

6. Takei Y. The microRNA miR-516a-3p regulates the Wnt pathway by targeting extracellular sulfatase1 in human scirrhous gastric cancer. Global COE 4th International Symposium. Global COE Symposium on Neuro-Tumor Biology and Medicine. (2012 年 11 月 15 日: ウェスティンナゴヤキャッスルホテル 愛知県・名古屋市)

7. Takei Y. Anti-metastatic therapy via microRNA-based medicine for repressing

peritoneal dissemination of human scirrhous gastric cancers. 8th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (Oct 28, 2012: Boston, MA, USA).

8. Kubo T, Yanagihara K, Sato Y, Takei Y, Seyama T. Evaluation of RNAi efficacy of lipid-modified double-stranded RNA. 8th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (Oct 28, 2012: Boston, MA, USA).

9. 武井佳史、柳原五吉 スキルス胃癌の腹膜播種性転移はペントースリン酸経路の亢進と関係がある 第 71 回日本癌学会学術総会 (2012 年 9 月 21 日:ロイトン札幌 北海道・札幌市)

10. 武井佳史 生体高分子アテロコラーゲンを用いた target-cell specific in vivo siRNA delivery の開発と分子標的治療への応用 第 12 回遺伝子・デリバリー研究会・夏期セミナー (2012 年 7 月 30 日:かんばんの宿北九州福岡県・北九州市)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 心病変マーカー及びその利用
発明者: 伊藤恭彦、名倉史子、武井佳史、松尾清一、秋山真一、曾我朋義、平山明由
権利者: 国立大学法人名古屋大学
種類: 特許
番号: 特願 2012-268747
出願年月日: 2012 年 12 月 7 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

武井 佳史 (TAKEI, Yoshifumi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 70362233

(2)研究分担者

門松 健治 (KADOMATSU, Kenji)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 80204519