

Osteopontin Small Interfering RNA Protects Mice from Fulminant Hepatitis

(オステオポンチン siRNA による劇症肝炎の治療)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 細胞外マトリックスの一種であるオステオポンチン (OPN) は、非コラーゲン性分泌型酸性リン酸化糖タンパク質であり、乳汁、破骨細胞、骨芽細胞、マクロファージ、活性化 T 細胞や NKT 細胞、ある種の腫瘍組織などに広く発現が認められている。

OPN は分子内に複数の機能ドメインが存在している。すなわち、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンを代表とする RGD 認識インテグリンと結合する GRGDS 配列、 $\alpha 4\beta 1$ 、 $\alpha 9\beta 1$ インテグリンと結合する SVVYGLR 配列、シンデカンファミリー分子の側鎖と結合するヘパリン結合ドメインが存在し、また、OPN は CD44 と結合することも報告されている。このように OPN は多種の受容体やタンパク質と結合することで、細胞接着、細胞遊走、細胞増殖、腫瘍細胞の浸潤や転移、免疫系では Th1 型サイトカインとして生体防御反応を制御するなど、多彩な機能を持つことが報告されている。

OPN は炎症性疾患の一つである肝炎の病態に深く関与している。当研究室では concanavalin A (ConA) 肝炎モデルマウスを用いて OPN と NKT 細胞の関係を明らかにしており、NKT 細胞から分泌された OPN が NKT 細胞の活性化と好中球の遊走、活性化を惹起することで肝炎を重症化させ、抗 OPN 中和抗体の投与により肝炎が抑制できることを報告してきた。また、抗 OPN 中和抗体は関節リウマチに対する治療効果も見いだすことができ、抗体医薬としての臨床応用が期待され、現在、臨床試験が進められている。このように、OPN は炎症性疾患に対する疾患治療の標的分子として注目されている。

しかし抗体医薬を臨床に応用する場合、その作製には多くの費用、期間がかかるため、実際の治療においては膨大な医療費負担を余儀なくされる。また、アナフィラキシー等の抗体投与時反応や、連用投与による薬効力価の低下を生じる可能性もある。現に、抗 CD28 アゴニスティック抗体の臨床応用では、第 I 相臨床試験にて重大な被害が出ている。さらに、抗体医薬では局所特異的に作用させることが未だ困難であり、Drug Delivery System の開発も遅れているのが現状である。

そこで本研究では、抗体以外の方法による OPN の機能抑制法として、分子特異的ノックダウン法の一つである RNA 干渉 (RNAi) 法に着目した。

small interfering RNA (siRNA) による RNAi は、21~23 塩基の 2 本鎖 RNA を細胞内に導入することにより、その配列特異的に mRNA を分解し、目的遺伝子の発現を抑制する方法である。siRNA はアンチセンス核酸やリボザイムと比較し、配列特異性、有効性が共にはるかに優れており、化学合成が可能であるため安価に短期間で作製できる。また、その作用部位は細胞内であり、血中では容易に分解されるため、抗 siRNA 抗体は産生されにくいと考えられ、連用治療が容易に行えると予想できる。さらに siRNA 発現ベクターの使用により長期的発現抑制、薬剤誘導による発現抑制の制御も可能であり、また、ウイルスベクター等に組み込むことによって、将来的には臓器・部位特異的な発現抑制も可能になると考えられる。このように siRNA を用いた核酸医薬は、抗体医薬と比べて優れた点が多く存在している。

本研究では、RNAi 法、すなわち siRNA を用いた核酸医薬による疾患治療法の開発を目的として、OPN に対する siRNA (OPN siRNA) を用いた OPN 発現抑制効果と、OPN siRNA による劇症肝炎の治療効果、ならびにそのメカニズムについて検討した。

【方法と結果】 本研究では最初に、マウス OPN 遺伝子配列から配列特異的な siRNA を複数個作製し、*in vitro* において外来性 OPN の発現抑制を mRNA レベル、タンパク質レベルで確認した。内在性 OPN の発現抑制についても同様にその効果を確認し、作製した siRNA の内、最も発現抑制効果の高い OPN siRNA 配列を以後の実験に用いた。また、OPN siRNA による発現抑制効果の持続期間を検討したところ、約7日間の抑制効果がみられた。

OPN siRNA の核酸医薬としての可能性を評価するため、以下の実験を行った。まず、投与した siRNA の体内動態を確認するため、蛍光標識した siRNA を0時間、8時間、24時間の3回、マウスに尾静脈から投与し、最終投与から24時間後に肝臓組織切片を作製、共焦点顕微鏡にて siRNA の導入を確認した。siRNA は肝実質細胞及び内皮細胞の細胞質内、核近傍に存在することを確認した。

次に、炎症性疾患に対する治療効果を検討するため、ConA 肝炎モデルマウスを用いた *in vivo* アッセイを行った。OPN siRNA を、ConA 投与の24時間前、16時間前、同時間の3回、尾静脈からマウスに前投与し、さらに ConA を投与して肝炎を誘発させ、炎症反応と OPN 発現に対する抑制効果について検討した。炎症の指標として血清 ALT 値を測定したところ、OPN siRNA 投与群においてその有意な低下が見られた。また、この OPN siRNA 投与群では、肝臓内の OPN タンパク質発現も同様に抑制されていた。更に、肝臓組織切片の HE 染色により、病理学的にも、OPN siRNA 投与群において肝炎の増悪化が抑制されていることを確認した。これらのことから、OPN siRNA は OPN タンパク質の発現を抑制することにより、肝炎の発症・増悪化を抑制することが示唆された。

OPN siRNA が肝炎を抑制するメカニズムについて解明するため、肝臓組織における OPN、IFN- γ の発現量を mRNA レベルにて確認した。その結果、OPN 発現量と IFN- γ の発現量が相関していることが明らかとなった。

【考察】 本研究の結果より、OPN siRNA を尾静脈から投与し肝臓内に導入することで、肝臓内の OPN 発現量を下げ、ConA 誘導劇症肝炎の発症を抑制し、治療できることが明らかとなった。

ConA 肝炎モデルマウスにおいて、NKT 細胞が発現する OPN が肝炎の増悪化に大きく寄与していることが、OPN 欠損マウス、NKT 細胞欠損マウス、抗 OPN 中和抗体を用いた研究により報告されている。OPN siRNA は肝実質細胞、内皮細胞への導入は確認できたが、NKT 細胞への取り込みは確認できていない。これは、NKT 細胞を示す NK1.1 マーカー分子の発現が、ConA による NKT 細胞の活性化に付随して低下してしまい、siRNA が導入された活性化 NKT 細胞を検出することが困難なためである。今後、siRNA が導入された細胞の同定をはじめとする、肝炎抑制メカニズムのより詳細な解明が必要であると考えられる。

これまでに、OPN の機能抑制が関節リウマチ、多発性硬化症等といった炎症性疾患の発症抑制につながるということが報告されている。投与方法ならびに導入法の検討を必要とするが、OPN siRNA はこれらの疾患に対しても治療効果が期待できると考えられる。

【結論】 本研究により、OPN siRNA に疾患治療効果があることが明らかになった。これにより、OPN siRNA が核酸医薬と成り得る可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 笠 原 正 典

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

Osteopontin Small Interfering RNA Protects Mice from Fulminant Hepatitis

(オステオポンチン siRNA による劇症肝炎の治療)

オステオポンチン (OPN) は、分子内に複数の細胞結合部位を有し、それぞれに特異的な受容体、タンパク質と結合することにより細胞の生存・増殖、免疫細胞の活性化などに関与している。OPN の発現増強は炎症性疾患を悪化させ、OPN 欠損や OPN に対する中和抗体投与により炎症性疾患の緩和が報告されている。特に肝炎においては、NKT 細胞の産生する OPN が、NKT 細胞、好中球、T 細胞といった免疫細胞を活性化し、肝実質細胞に対する細胞障害を惹起し、肝炎を悪化させていることが報告されている。そこで申請者は、OPN を抑制する siRNA (OPN siRNA) を用いた肝炎抑制効果について検討した。

申請者は、OPN siRNA を 4 種作製し、最初にその発現抑制効果について検討した。外因性及び内在性 OPN 発現細胞にて OPN の発現抑制効果を検討し、最も効果の高い OPN siRNA を以後の実験に用いた。OPN siRNA は分裂を繰り返す培養細胞において 5 日間程度の OPN 発現抑制効果を持つことを確認した。

次に siRNA の肝臓導入について検討した。蛍光標識した siRNA をハイドロダイナミクス法にてマウス尾静脈から静注し、肝臓切片を共焦点顕微鏡にて確認したところ、肝実質細胞や血管内皮細胞の細胞質に siRNA の導入が確認された。

そこで、OPN siRNA をコンカナバリン A 投与肝炎モデルマウスに発症前投与し、肝炎抑制効果について検討した。siRNA 単独投与では血清 ALT 値の増加は見られず、siRNA そのものの肝毒性な無いことをまず確認した。肝炎モデルにコントロール siRNA を投与した群では高い血清 ALT 値を示したが、OPN siRNA 投与群では、その増加が有意差をもって抑制された。この時の肝臓内での OPN タンパク質もまた、OPN siRNA 投与群においてその発現が抑制されていた。肝臓組織切片を用いた病理組織学的検討により壊死範囲を確認したところ、OPN siRNA 投与群では肝壊死の著明な減少を確認した。これらのことから、OPN siRNA は肝臓内の OPN 発現を抑制することにより、肝炎増悪化を抑制することを明らかにした。肝臓内における OPN 発現と肝炎増悪に関与するインターフェロン γ の発現に相関性があることから、OPN siRNA の肝炎抑制効果の 1 つのメカニズムとして、Th1 型サイトカインの産生抑制の可能性がある。

申請者の発表に対し、副査 笠松教授より、OPN siRNA による肝炎治療において、NKT 細胞への siRNA 導入、発現抑制の確認について質問があり、申請者は、コンカナバリン A 刺

激により NKT 細胞特有のマーカーが消失する特性があり、当時、技術的に NKT 細胞を追跡・分離することが不可能だったことを説明した。次に、肝炎の発症初期での治療的 siRNA 投与に対する効果の見解について質問があり、申請者は、他の免疫細胞への活性化刺激が考えられることから、本発表のような抑制効果は難しいと回答した。最後に、関節炎モデルでの疾患抑制を目的とした siRNA 投与の検討についての質問に対し、申請者は、他の標的分子に対する siRNA を用いた関節炎実験の結果から、導入及び発現抑制には効果が見られるものの、疾患抑制という点では効果が低く、これは導入された細胞の種類が大きく関係していると回答した。

次いで主査 小野江から、siRNA の遺伝子発現抑制メカニズムについて質問があり、自身の実験データに基づき詳細に回答した。siRNA の水圧による細胞導入の機序説明に対しても適切に回答した。また、作製した OPN siRNA のヒト・マウス種族間の相補性と効果についての質問に対しても、配列特異性の点から、異種間においては同様の抑制効果は得られないと推察する旨の回答をした。

最後に副査 上出教授より、培養細胞導入後の siRNA による長期遺伝子発現抑制の機序について質問があり、申請者は、過去の文献的考察をもとに概ね妥当な回答を成しえた。

本学位論文は、siRNA を用いて肝炎モデル動物における肝炎抑制効果を示したことが評価でき、今後 siRNA を用いた肝炎治療への応用が期待される。更に近年、siRNA による核酸医薬の臨床試験が始まっている状況を踏まえると、本学位論文は核酸医薬の基礎研究として重要であると判断する。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、また、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定する。