

分担研究報告書

マウスモデルを用いた掻痒発現機序の解析と治療戦略の構築

研究分担者 稲垣 直樹 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 教授

研究協力者 田中 宏幸 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 准教授

研究協力者 山下 弘高 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 助教

研究要旨

皮膚表層に存在する表皮ケラチノサイトは種々の刺激に際して様々な因子を産生し、皮膚の炎症や掻痒の誘発、増強においても重要な役割を演じると推定される。したがって、表皮ケラチノサイトを標的とし、炎症あるいは掻痒の発現に関わる因子の発現を制御することは炎症の軽減、掻痒の抑制に有効であると推定される。これまでの検討において、2,4-dinitrofluorobenzene を反復塗布したマウスでは、NGF mRNA 発現が増大し、神経線維が表皮内へ多数侵入することを確認している。また、tacrolimus 投与が神経線維の表皮内侵入を抑制するとともに、搔破行動を減少させることから、表皮ケラチノサイトの NGF 発現を抑制し、神経線維の表皮内伸長を抑制することが掻痒の抑制に有効性を発揮する可能性が示唆される。一方、siRNA (small interfering RNA) は 21-23 塩基対の二本鎖 RNA であり、塩基配列特異的に mRNA を破壊する。生体への siRNA の適用は難しいとされており、安定性、標的への送達に関して活発に研究が進められているが、皮膚表層に存在する表皮ケラチノサイトを標的とすること、患者皮膚ではバリアの機能が脆弱であると考えられることから、siRNA 外用による適用の可能性が期待される。一昨年の検討では、NGF 特異的な siRNA を用い、NGF の遺伝子発現を制御することによる掻痒の制御戦略、さらにはアトピー性皮膚炎の治療戦略の構築を試み、NGF mRNA 発現を抑制する可能性を示唆する成績を得たが、抑制の強度、信頼性に問題があることが判明した。そこで、本年度はさらに信頼性の高い成績を得ることを目標に検討を行った。

(1) マウス TNF- α を ICR マウスの耳殻へ注射し、6 時間後の NGF mRNA 発現を検討した。100 ~ 1,000 ng の TNF- α は強力に NGF mRNA 発現を誘導し、300 ng を用いた経時変化の検討では、6 時間後の NGF mRNA 発現の誘導が最も強く、安定していた。(2) これまでの検討から、有効性が確認されている NGF 特異的 siRNA を用い、トランスフェクション試薬 3 種の効果を比較した。TNF- α 注射による NGF mRNA 発現の抑制は、InvivoFectamine2 を 5 μ g の siRNA と混和して注射した場合に認められ、抑制は強力であった。1 μ g の siRNA を用いた場合の抑制も 5 μ g の場合と同程度であり、強力であった。(3) NC/Nga マウスに TNF- α を注射して誘発する NGF mRNA 発現も、InvivoFectamine2 に混和した siRNA の注射によって強く抑制された。一方、NC/Nga マウスにダニ抗原を反復塗布して誘発する皮膚炎においても NGF mRNA 発現の増大が認められるが、NGF mRNA 発現は、siRNA および InvivoFectamine2 をクリームに混和して塗布した場合には抑制されなかった。siRNA および InvivoFectamine2 を混和して注射した場合には抑制が認められた。

本年度の検討結果から、トランスフェクション試薬としては InvivoFectamine2 が適していること、siRNA を InvivoFectamine2 と共に注射することにより、NGF mRNA 発現を抑制できることが確認された。今後は、外用による有効性を確実にするための条件の検討が必要である。

A. 研究目的

掻痒はアトピー性皮膚炎患者の最も重要な症状であり、誘発される搔破行動は皮膚症状を増悪する重要な因子である。表皮ケラチノサイトは皮膚表層にあって種々の刺激によってさまざまな因子を産生し、皮膚炎や掻痒の誘発、増強にも関わると推定される。これまでに、2,4-dinitrofluorobenzene を反復暴露するこ

とにより、高頻度の搔破行動を伴うマウス皮膚炎モデルを確立し、tacrolimus が表皮ケラチノサイトの神経成長因子 (NGF) 産生抑制を介して搔破行動を抑制する可能性を示した。一方、siRNA (small interfering RNA) は 21-23 塩基対の二本鎖 RNA であり、塩基配列特異的に mRNA を破壊する。生体への siRNA の適用は難しいとされており、安定性、生体内標的への送達法について

活発に検討が進められているが、皮膚表層に存在する表皮ケラチノサイトを標的とすること、患者皮膚ではバリアの機能が脆弱であると考えられることから、表皮ケラチノサイトを標的とする siRNA 外用によるアトピー性皮膚炎治療への適用の可能性が期待される。一昨年の検討では、NGF 特異的な siRNA を用い、NGF の遺伝子発現を制御することによる掻痒およびアトピー性皮膚炎の治療戦略の構築を試み、NGF mRNA 発現の抑制を示唆する成績を得たが、抑制の強度、信頼性に問題があることが判明した。そこで、本年度は信頼性の高い成績を得ることを目標に、さらに検討を加えた。

B. 研究方法

TNF- α による NGF mRNA 発現の誘導: 雄性 ICR マウスあるいは雌性 NC/Nga マウスの耳殻へマウス TNF- α 溶液 20 μ l を注射して NGF mRNA 発現を誘導した。これまでの検討ではヒト TNF- α を用いてきたが、本検討ではマウス TNF- α を使用した。

ダニ抗原反復曝露による皮膚炎: 雌性 NC/Nga マウスの両耳殻の表裏に、培養したコナヒョウヒダニ排泄物から調製した抗原 (ダニ抗原) 溶液 (10 mg/ml) を 25 μ l ずつ、計 100 μ l を週 2 回、計 9 回塗布して皮膚炎を誘発した。

siRNA およびトランスフェクション試薬: siRNA はこれまでの検討で、NGF mRNA 発現抑制効果が最も強力であることが確認されている市販のものを使用した。トランスフェクション試薬はこれまで用いてきたものが販売中止になったこと、その効果が不確実であることが分かったことから、新たに 3 種の市販の試薬、Safetrans、InvivojetPEI および Invivofectamine2 を購入して使用した。siRNA はトランスフェクション試薬と混和し、溶液を耳殻へ注射した。また、皮膚炎モデルの実験では siRNA およびトランスフェクション試薬をクリームに混和して耳殻へ塗布した。

NGF mRNA の評価: mRNA の評価には real-time RT-PCR 法を用いた。

(倫理面への配慮)

動物を使用する実験はすべて岐阜薬科大学における動物実験の実施に関する規程にしたがい、実験計画を委員会に提出して審査、承認を受けて実施した。

C. 研究結果

(1) マウス TNF- α の NGF mRNA 発現誘導効果の確認: マウス TNF- α 100 ~ 1,000 ng を ICR マウスの耳殻へ注射し、6 時間後の NGF mRNA 発現を検討した。いずれの用量の TNF- α によっても強力な NGF mRNA 発現が誘導された。また、300 ng の TNF- α を注射し、経時的に mRNA 発現を検討し、6 時間後の mRNA 発現の誘導が最も強力で、安定していた。

(2) トランスフェクション試薬の比較: これまでの検討から、有効性が確認されている NGF 特異的 siRNA を用い、トランスフェクション試薬 3 種を用いて mRNA 発現抑制効果を比較した。300 ng TNF- α 注射による 6 時間後の NGF mRNA 発現の抑制は、Invivofectamine2 を 5 μ g の siRNA に混和して注射した場合に認められ、抑制は強力であった。一方、Safetrans および InvivojetPEI を用いた場合には mRNA 発現には抑制は認められなかった。また、Invivofectamine2 を用い、1 μ g および 5 μ g の siRNA の mRNA 発現抑制効果を比較した結果、いずれの用量によっても同程度の強い抑制が認められた。

(3) NC/Nga マウスを用いた検討: NC/Nga マウスに TNF- α を注射して誘発する NGF mRNA 発現も、Invivofectamine2 に混和した siRNA の注射によって強く抑制された。一方、NC/Nga マウスにダニ抗原を反復塗布して誘発する皮膚炎においても NGF mRNA 発現の増大が認められるが、NGF mRNA 発現は、siRNA および Invivofectamine2 をクリームに混和して塗布した場合には抑制されなかった。siRNA および Invivofectamine2 を混和して注射した場合には抑制が認められた。

D. 考察

本年度の検討では、以前の検討において、real-time RT-PCR によって得られる siRNA の mRNA 発現抑制効果の成績の信頼性が低いことが懸念されたことから、これまで用いてきたヒト TNF- α をマウス TNF- α に改め、また、トランスフェクション試薬を 3 種入手して有効性の高い試薬を選択した。

siRNA による RNAi の手法は確立されたものであり、多くの in vitro の研究で遺伝子発現をノックダウンする手法として繁用されている。一方、in vivo への適用に関しては、siRNA の体内での安定性、標的組織、細胞への送達、などに解決すべき問題があり、生体への応用はほとんど進んでいない。したがって、トランスフェクション試薬に関しても、in vivo における使用実績が示されているものはなく、今回は、市販の 3 種の試薬について in vivo での有効性を比較した。

ヒト TNF- α をマウス TNF- α におきかえた場合でも、ICR マウス耳殻へ注射することによって、ほぼ同様の条件下、明らかな NGF mRNA 発現の誘導が確認できたため、以下の検討にはマウス TNF- α を使用した。また、比較検討した 3 種のトランスフェクション試薬、Safetrans、InvivojetPEI および Invivofectamine2 の中では、Invivofectamine2 を使用した場合にのみ、siRNA による強い mRNA 発現抑制効果が認められたことから、以下の検討では Invivofectamine2 を使用した。検討には適切なトランスフェクション試薬を選択することも重要と思われる。また、これまでの検討では、市販の NGF 特異的 siRNA 3 種を in vitro の実験系において比較検討し、最もノックダウン効果の強い siRNA を選択して使用してきたが、siRNA の選択、さらにはトランスフェクション試薬

との組み合わせも考慮すべきと思われる。

アトピー性皮膚炎患者皮膚への適用の可能性を探るため、NC/Nga マウスのダニ抗原反復塗布による皮膚炎モデルを用い、siRNA および Invivofectamine2 をクリームに混和して塗布した。siRNA および Invivofectamine2 の注射は NC/Nga マウスにおいても TNF- α 注射による NGF mRNA 発現を強く抑制するが、皮膚炎モデルにクリームに混和して塗布した場合には抑制は認められなかった。皮膚炎モデルの場合でも、siRNA および Invivofectamine2 を注射した場合には抑制効果が認められたことから、siRNA および Invivofectamine2 が標的組織へ到達すれば効果を発揮することが明らかであると考えられる。

siRNA は巨大な分子であるため、皮膚から透過させることに限界があることは考慮すべきと思われるが、蛍光標識した siRNA の皮膚透過性を検討した予備的な成績では、クリームに混和することで Invivofectamine2 が効果を示さなくなる可能性が推定されている。溶媒を変えた場合の皮膚透過性についても検討することが必要と思われる。

これまでは、耳殻全体として mRNA 発現を検討してきたが、表皮ケラチノサイトを標的とする検討であるため、表皮を分離して評価することにより、よりの確な成績が得られるものと考えられる。また、表皮ケラチノサイトは皮膚最外層に位置するため、外用した siRNA の効果が得られやすい可能性も考えられるため、表皮ケラチノサイトの mRNA 発現に対する効果を区別して確認することも必要と思われる。

E. 結論

本年度の検討では、siRNA をトランスフェクション試薬 Invivofectamine2 と組み合わせることにより、また、確実に組織へ注入することによって標的 mRNA 発現を強く抑制できることを確認した。アトピー性皮膚炎患者皮膚への外用を目標としているため、今後は、皮膚バリアが破綻している皮膚炎モデルマウス等を用い、溶媒を選択し、また、表皮を分離して表皮ケラチノサイトに対する効果を明らかにする検討を実施したい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamashita H, Makino T, Inagaki N, Nose M, Mizukami H: Assessment of relief from pruritus due to Kampo medicines by using murine model of atopic dermatitis. J Trad Med 30: 114-123, 2013.2.

2. 学会発表

稲垣直樹: アトピーの慢性化と最新研究について. アレルギーケアフォーラム, 東京, 2013.6.13.

稲垣直樹: アトピー性皮膚炎とかゆみ. 日本薬学図書

館協議会研究集会, 名古屋, 2013.8.8.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし