

sonoporation 法を用いた関節内への核酸導入法の開発

—small interfering RNA を用いた変形性股関節症の治療法開発に向けて—

京都府立医科大学大学院医学研究科 運動器機能再生外科学（整形外科）

高橋 謙治、齊藤 正純、久保 俊一

はじめに

近年関節疾患に対する分子生物学的機序の解明が進み、関節疾患に対しての遺伝子・核酸治療の応用は有望な治療法のひとつとして注目されている。核酸治療の成功には、有効かつ安全な標的臓器への核酸分子の導入が必要である。われわれはこれまでに adenovirus vector を用いた関節軟骨への遺伝子導入法、electroporation 法を用いた関節滑膜への遺伝子導入法を報告してきたが、安全性および侵襲の面で、致死性でない関節疾患への臨床応用には依然問題がある。

近年、注目されている遺伝子導入法として、超音波遺伝子導入法 (sonoporation) がある。これは超音波の照射により細胞膜の透過性を亢進させ、目的の物質を細胞内に導入する方法である。超音波造影剤であるマイクロバブルを併用することで、細胞膜の透過性がさらに亢進し、遺伝子の取り込みが増強することが知られている。超音波は診断、治療に臨床応用されており、組織への侵襲が少ない。すでにこの sonoporation を用いて、骨格筋、腫瘍、心筋、歯髄組織などの組織に in vivo で遺伝子を導入できることが報告されている。

また、近年、配列特異的に強力に遺伝子の発現を抑制できる RNA 干渉 (RNA interference ; RNAi) の技術が注目を集めて

いる。RNAi は 21-23 塩基からなる small interfering RNA (siRNA) により、配列特異的に遺伝子発現が抑制される現象である。この方法は強力で簡便であるため、各分野の疾患モデルに対して siRNA を用いた治療法がさかんに研究されており、次世代の治療薬として注目を集めている。関節疾患に対しては、tumor necrosis factor (TNF)- α に対する siRNA を electroporation により関節特異的に導入し、関節リウマチ (RA) モデルである collagen induced arthritis の進行を抑制できることが報告されている。しかし、変形性関節症 (OA) への応用には、より低侵襲で長期間作用が持続する siRNA の導入法の開発が期待される。

今回、われわれは siRNA の変形性股関節症への治療応用の足がかりとして、sonoporation を用いたラット膝関節への plasmid DNA (pDNA) および siRNA の導入について検討した。

方法

ルシフェラーゼ遺伝子をコードした pGEG.GL3 プラスミド 30 μ g を 45l の TE buffer に溶解し、マイクロバブル (Optison ; Mallinkrodt 社) 5l と混合してラット膝関節に投与し、Sonopore 3000 (ネッパジーン社) を用いて経皮的に超音波照射を行った。超音波の

周波数は3.0MHz、照射時間は1分間とし、強度は0.5 W/cm²から2.0 W/cm²の間で検討を行った。投与から3日後に投与膝関節から滑膜組織を回収し、ルシフェラーゼアッセイおよびRT-PCRを用いてGL3遺伝子の発現を検討した。

siRNAの導入効率を検討するために、pGEG.GL3プラスミド20 μgとGL3に特異的なsiRNA (siGL3) または非特異的配列のsiRNA 4.5gを45lのTE bufferに溶解し、マイクロバブルμ0と混合してラット膝関節に投与した。プラスミドDNAの導入と同様に超音波の照射を行い、ルシフェラーゼアッセイおよびRT-PCRを用いて滑膜中のGL3遺伝子の発現抑制効率を検討した。

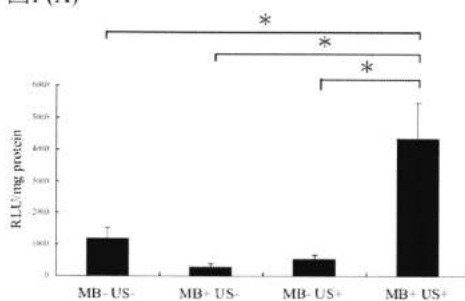
導入されたsiRNAの局在を検討するために、蛍光標識した非特異的配列のsiRNAをマイクロバブルと混合してラット膝関節に投与し、超音波を照射した。導入1日後に投与膝関節を蛍光顕微鏡下に観察した。

結果

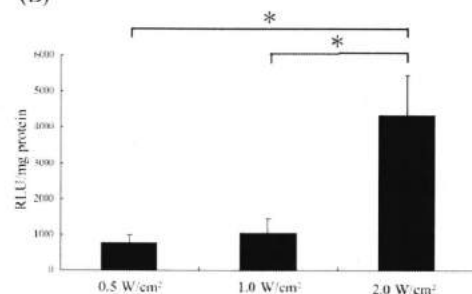
2.0 W/cm²の超音波を用いて、マイクロバブルと超音波の併用効果の検討を行った。プラスミドとマイクロバブルを混合して投与を行った群 (US-MB+)、プラスミドのみ投与して超音波照射を行った群 (US+MB-) ではプラスミドのみ投与した群 (US-MB-) と比べて滑膜におけるGL3の発現に有意な変化はなかった。これに対して、プラスミドとマイクロバブルを混合してさらに超音波照射を行った群 (MB+US+) では、滑膜でのルシフェラーゼ活性は有意に上昇した (P<0.05, vs. MB-US-; P<0.05, vs. MB+US-; P<0.05, vs. MB-US+) (図1A)。

これにより、超音波とマイクロバブルの併用により、プラスミドの滑膜への導入効果が増強することが明らかになった。続いて超音波の強度による導入効率の変化を検討した。ルシ

図1 (A)

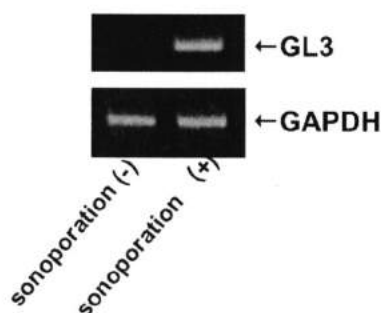


(B)



フェラーゼ活性は超音波の強度依存的に増大し、0.5 W/cm²および1.0 W/cm²と比較して2.0 W/cm²では有意にルシフェラーゼ活性が増強した (P<0.05) (図1B)。また、RT-PCRを用いて、プラスミドとマイクロバブル投与後の滑膜組織におけるルシフェラーゼ遺伝子の発現を検討した。超音波照射を行わなかった群 (sonoporation(-)) ではGL3の発現を認めなかったが、超音波照射を行った群 (sonoporation(+)) においてGL3の発現を認めた (図1C)。

図1 (C)



(図 1)

プラスミド投与を行ったラット膝関節滑膜におけるルシフェラーゼ活性。

- (A) 超音波とマイクロバブル併用効果の検討。超音波とマイクロバブルを併用した群のみ、有意に遺伝子発現が増強した (* $P < 0.05$)。US ; 超音波、MB ; マイクロバブル (MB)
- (B) 照射超音波強度によるルシフェラーゼ活性の変化。超音波の強度依存的にルシフェラーゼ活性は増大した。
- (C) ラット膝滑膜組織におけるルシフェラーゼ遺伝子の発現をRT-PCRにより検討した。超音波照射を行わなかった (sonoporation(-)) ではGL3の発現を認めなかったが、超音波照射を行った (sonoporation(+)) において、GL3の発現を認めた。

共導入では抑制されなかったが、GL3に対するsiRNA (siGL3) により有意に抑制された (* $P < 0.05$)。

(B) RT-PCRにおいても、siGL3投与群でGL3の発現は減弱していた。

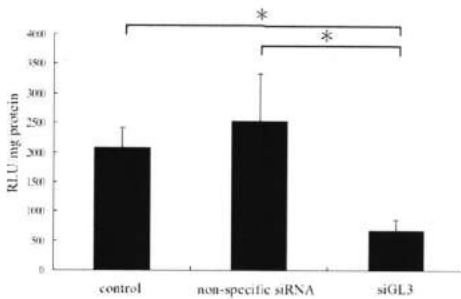
超音波照射を行った膝関節において、皮膚障害、関節内血腫、滑膜の増生等の副作用は認めなかった。

SonoporationによるsiRNAの導入効果を検討するために、プラスミドとsiRNAを混合して投与し、超音波照射を行った。非特異的配列のsiRNAの添加では関節滑膜のルシフェラーゼ活性に変化は認めなかったが、siGL3の添加によりルシフェラーゼ活性は有意に減弱した ($P < 0.05$) (図 2A)。

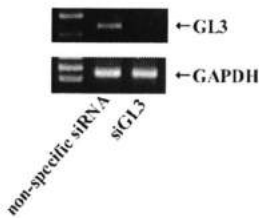
RT-PCRにおいても、siGL3投与群において、GL3のシグナルは減弱した (図 2B)。以上より、siGL3が関節滑膜細胞中に導入され、GL3の遺伝子発現を抑制していることが明らかになった。

導入されたsiRNAの関節内での局在を明らかにするために、蛍光標識したsiRNAをsonoporationによって関節内に導入した。siRNAの緑色蛍光は主に大腿骨、脛骨関節面周辺の滑膜組織に認められた (図 3)。

図2(A)



(B)

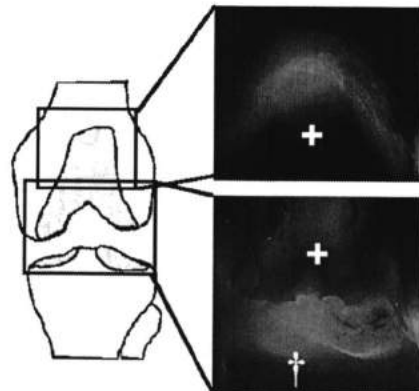


(図 2)

siRNAによる遺伝子発現抑制効果。

(A) 膝関節滑膜におけるルシフェラーゼ活性は、非特異的配列のsiRNA (non-specific siRNA) の

図3



(図3)

sonoporation法を用いて導入した蛍光標識siRNAの関節内分布。siRNAは主に関節裂隙の滑膜に導入されていた。+；大腿骨関節面，；脛骨関節面

関節軟骨表面には明らかな蛍光を認めなかった。Sonoporationにより導入されたsiRNAは主に関節滑膜に導入されていることが明らかになった。

考 察

近年、分子生物学の発展に伴い、関節疾患の病態の主体となる分子が明らかにされてきた。RAではTNF- α 、interleukin-1 β (IL-1 β)といった炎症性サイトカインが病態形成に関わっていることはよく知られている。また、(OA)においても、aggrecanaseやmatrix metalloproteinase (MMP)といったproteinaseが軟骨変性に関わっていることが明らかになってきた。したがって、これらの因子の働きを関節局所で阻害することが関節疾患の治療法につながると考えられる。しかし、これらの因子の産生を効果的に抑制する方法は、現在のところ有効なものがない。

RNAiによる遺伝子抑制法は、病態責任遺伝子の抑制を生体内で行うことによる新しい疾患治療法として応用できると期待されている。しかし、治療法として応用するには安全で有効なin vivo導入法が不可欠である。siRNAの導入にはvirus vectors, non viral vectors, naked siRNA法などが用いられている。

致死的でない関節疾患にウイルスベクターを用いる方法は、安全性の面での問題が大きく、vectorを用いない導入法が臨床応用への障壁が低いと考えられている。われわれはelectroporationを用いた関節内へのpDNAの導入とsiRNAの導入を報告してきた。さらにこの系を用いて、RAモデルラットの関節滑膜にTNF- α 特異的なsiRNAを導入し、関節炎が有

意に抑制できることも見出した。しかし、臨床応用に際しては、より低侵襲で効率的な方法の開発が望ましい。

本研究で用いたsonoporation法の有効性は各臓器ですでに報告されているが、最大の利点は、組織への侵襲が少ないことである。臨床応用されている超音波として、診断用と治療用があり、整形外科領域では、検査、骨折の治療および温熱療法に用いられている。本研究では診断用として用いられている超音波と大差ない強度で遺伝子導入に成功した。また、この強度では膝関節組織への明らかな障害を認めなかった。これらの結果から、本法は臨床に応用可能である低侵襲な遺伝子・核酸導入法であると考えた。

今回われわれはsonoporationを用いて、siRNAも関節内滑膜に導入できることを示した。sonoporationでは、硬組織で反射される超音波の特性上、骨・軟骨への遺伝子導入は現時点では困難であった。しかし、滑膜組織には効率的にsiRNAの導入が可能であった。OAの病態は軟骨の変性が主体ではあるが、滑膜から産生される因子が深くかかわっていることが知られている。したがって、滑膜への核酸導入で、病態責任遺伝子の発現抑制をすることができれば、関節疾患の病態解明の研究手段として有用だけでなく、OAの有効な治療法となりうると考えた。

本研究において、sonoporationを用いて関節滑膜特異的にpDNA/siRNAを導入できることを示した。本法は組織に与える侵襲が少なく、安全であり、比較的容易に臨床応用できる方法であると考えられる。本法はOAをはじめとした関節疾患の核酸治療に応用できる可能性がある。

謝 辞

本研究は平成17年度財団法人日本股関節研究振興財団の研究助成により行った。

文 献

1. Ikeda T, Kubo T, Arai Y, et al. 1998. Adenovirus mediated gene delivery to the joints of guinea pigs. *J Rheumatol* 25: 1666- 1673.
2. Ogawa K, Tachibana K, Uchida T, et al. 2001. High-resolution scanning electron microscopic evaluation of cell-membrane porosity by ultrasound. *Med Electron Microsc* 34:249-253.
3. Greenleaf WJ, Bolander ME, Sarkar G, et al. 1998. Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound Med Biol* 24:587-595.
4. Lu QL, Liang HD, Partridge T, et al. 2003. Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. *Gene Ther* 10:396-405.
5. Nishida K, Doita M, Takada T, et al. 2006. Sustained transgene expression in intervertebral disc cells in vivo mediated by microbubble-enhanced ultrasound gene therapy. *Spine* 31:1415-1419.
6. Sakakima Y, Hayashi S, Yagi Y, et al. 2005. Gene therapy for hepatocellular carcinoma using sonoporation enhanced by contrast agents. *Cancer Gene Ther* 12:884-889.
7. Tsunoda S, Mazda O, Oda Y, et al. 2005. Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 118- 127.
8. Nakashima M, Tachibana K, Iohara K, et al. 2003. Induction of reparative dentin formation by ultrasound-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11. *Hum Gene Ther* 14:591-597.
9. Nakaya H, Shimizu T, Isobe K, et al. 2005. Microbubble-enhanced ultrasound exposure promotes uptake of metho-trexate into synovial cells and enhanced antiinflammatory effects in the knees of rabbits with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 52: 2559-2566.
10. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
11. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.
12. Song E, Lee SK, Wang J, et al. 2003. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9: 347-351.
13. Zhang W, Yang H, Kong X, et al. 2005. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med* 11:56-62.
14. Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, et al. 2005. Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11:429-433.
15. Soutschek J, Akinca, Bramlage B, et al. 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-178.
16. Schiffelers RM, Xu J, Storm G, et al. 2005. Effects of treatment with small interfering RNA on joint inflammation in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 52:1314-1318.

17. Inoue A, Takahashi KA, Mazda O, et al. 2005. Electro-transfer of small interfering RNA ameliorated arthritis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 903-908.
18. Cui FD, Kishida T, Ohashi S, et al. 2001. Highly efficient gene transfer into murine liver achieved by intravenous administration of naked Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vectors. *Gene Ther* 8:1508-1513.
19. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, et al. 1997. \uparrow Green mice \uparrow as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407:313-319.
20. Ohashi S, Kubo T, Kishida T, et al. 2002. Successful genetic transduction in vivo into synovium by means of electroporation. *Biochem Biophys Res Commun* 293:1530-1535.
21. Kishida T, Asada H, Satoh E, et al. 2001. In vivo electroporation-mediated transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes induces significant antitumor effects against melanoma in mice. *Gene Ther* 8:1234-1240.
22. Kawamoto T. 2003. Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Arch Histol Cytol* 66:123-143.
23. Kishida T, Asada H, Gojo S, et al. 2004. Sequence-specific gene silencing in murine muscle induced by electroporation-mediated transfer of short interfering RNA. *J Gene Med* 6: 105-110.
24. Heidel JD, Hu S, Liu XF, et al. 2004. Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. *Nat Biotechnol* 22: 1579-1582.
25. Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, et al. 2005. Gene transfer to human joints: progress toward a gene therapy of arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8698-8703.
26. Wells DJ. 2004. Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. *Gene Ther* 11: 1363-1369.
27. McMahon JM, Signori E, Wells KE, et al. 2001. Optimization of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase: increased expression with reduced muscle damage. *Gene Ther* 8: 1264-1270.
28. Choy EH, Panayi GS. 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 344: 907-916.
29. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. 2002. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39:237-246.