

平成 27 年 12 月 25 日

〈研究課題〉 Small interfering RNA (siRNA) を用いた、変形性膝関

節症に対する新規治療法の開発

代表研究者 千葉大学医学部附属病院整形外科 助教 山口智志

共同研究者 千葉大学医学部予防医学センター 教授 佐粧孝久

千葉大学大学院医学薬学府 大学院生 星 裕子

[まとめ]

マウス膝 OA モデルに対して ADAMTS5 および MMP13 に対する siRNA を膝関節内に注射投与し、これらの酵素の発現抑制効果および OA 進行予防効果を検討した。

ADAMTS5siRNA+MMP13siRNA 併用投与と MMP13 siRNA 単独投与では同等の OA 抑制効果であり、OA の発症初期においては MMP13 が ADAMTS5 より重要な酵素であることが考えられた。

1.研究の目的

1-1 siRNA 併用投与と単独投与の OA 抑制効果の比較

MMP-13 と ADAMTS-5 に対する siRNA を関節内に併用投与することによって、単独投与より更なる OA 抑制効果が得られるかを病理組織学的に検討すること。

2.研究方法と経過

2-1 siRNA 特異性の検証

siRNA の特異性を調べるために、培養した C57BL/6 マウス滑膜細胞に各 siRNA を投与し MMP13 と ADAMTS5 の mRNA 発現量を RT-PCR にて測定した。

2-2 siRNA 注射後の膝関節内分布

DMM 法を施行し、その 1 週間後に蛍光標識を施した non-targeting siRNA (どの遺伝子に

対しても抑制効果を発現しない siRNA) を膝関節内に注射投与する。膝関節内注射後 2 日後と 7 日後にそれぞれマウスを屠殺し、膝関節を採取する。採取した膝関節から矢状断面の病理組織切片を作成し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

2-3 病理組織学的評価

C57BL/6 マウス(n=80)を使用し、①健常膝群(N 群)と左膝に DMM(destabilization of medial meniscus)処置を行った OA モデルに対する② non targeting siRNA 投与群 (C 群)、③ ADAMTS5 siRNA 関節内投与群(A 群)、④ MMP13 siRNA 関節内投与群(M 群)、⑤ MMP13 siRNA+ADAMTS5 siRNA 併用投与群(M+A 群)の 5 群に分け、DMM 処置後 4 週と 8 週に Safranin O 染色にて OARSI score による評価を行った。

3.研究の成果

3-1 siRNA 特異性の検証

siRNA は培養滑膜細胞において target の mRNA のみを優位に抑制していた。

3-2 siRNA 注射後の膝関節内分布

蛍光 siRNA は主に関節滑膜内に取り込まれていた。

3-3 病理組織学的評価

DMM 後 4 週では siRNA 投与群間で差は認め

なかった。8週ではC群に対してA、M、A+M群全てで有意に軟骨変性が抑制されており、特にM群とM+A群で有意に軟骨変性が抑制されていた。

4.今後の課題

siRNA 膝関節内単回投与で、OA 抑制効果を確認できたが、siRNA の効果は1週程度までとされており、今後複数回投与などで更なるOA 抑制効果が得られるかどうか検討すべきである。

5.研究成果の公表方法

2013, 2014, 2015 年当教室例会、2014, 2015 年海外学会(OARSI, ORS)で発表(poster)をした。現在論文を海外雑誌 (Osteoarthritis and Cartilage)に投稿中である。