



Title	The Supercarbonate Apatite-MicroRNA Complex Inhibits Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis
Author(s)	深田, 唯史
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72527
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 深田 唯史

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授
	副 査	大阪大学教授
	副 査	大阪大学教授

土岐 祐一郎

竹原 徹也

小川 和彦

論文審査の結果の要旨

炎症性腸疾患は若年で発症し、腹痛・下痢を主症状とする難治疾患である。本研究では、マイクロRNA (miRNA) -29b を、super carbonate apatite (sCA) ドラッグデリバリーシステムに搭載し、デキストラン硫酸ナトリウムを自由給水させて作成したマウス大腸炎モデルにおける効果を検討した。その結果、予防モデルと治療モデルの両方で腸炎が抑制された。蛍光マーカーで標識したmiRNAは腸管の樹状細胞で確認され、MACS法により腸管壁から分離したCD11c(+) 樹状細胞をRT-PCR法により解析すると、miR-29投与群ではIL-6やIL-23 mRNA発現の低下を認めた。以上よりsCA-miR-29 は、樹状細胞が産生する炎症惹起因子の発現抑制を通じて、マウス大腸炎を抑制すると考えられた。本研究はマウス大腸炎に対してmiRNAの全身投与が有効であることを初めて示し、医療応用の可能性を開いたことから、博士(医学)の学位授与に値すると考えられる。(430字)

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	深田 唯史
論文題名 Title	The Supercarbonate Apatite-MicroRNA Complex Inhibits Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis (スーパーアパタイトに搭載したマイクロRNAはマウス大腸炎を抑制する)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) は腸管の慢性炎症を伴う原因不明の疾患であり、1970年以降、本邦を含め世界的に患者数の急増がみられる。抗TNF-α抗体であるレミケードをはじめとする抗サイトカイン療法などによって寛解率は上がったが、最終的に外科治療の対象となる患者は多く、継続的な新薬の開発が求められている。核酸医薬は低分子化合物、抗体医薬に続く、次世代治療法として期待されているが、核酸は血中で容易に分解されてしまうため、生体内で安定して核酸を患部に届けることのできるドラッグデリバリーシステム (drug delivery system: DDS) が不可欠である。しかし、その開発は十分ではなくmicroRNA (miRNA) を利用したIBD治療モデルの報告はみられない。本研究では、ノックアウトマウスを用いた実験でデキストラン硫酸ナトリウム溶液 (dextran sodium sulfate: DSS) 誘発腸炎の治療分子としての可能性が報告されているmiR-29aまたはmiR-29bを治療用核酸として、当科で癌治療モデルに利用してきたスーパーアパタイト (super carbonate apatite: sCA) デリバリーシステムを利用して、sCA-miRNA複合体をマウスIBDモデルに全身投与し、治療法としての有用性を明らかとすることを目的とした。sCAはカルシウム、炭酸、無機リンからなる pH 感受性のドラッグデリバリーシステムであり癌組織には核酸を大量に送達できることが分かっている。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 8週齢の雌のBALB/cマウスにDSSを7～9日間、自由飲水させてマウスに大腸炎を惹起した。治療用のmiRNAとして、in vivoグレードで無修飾のmiR-29aまたはmiR-29bをジーンデザイン社から購入した。sCAに内包したmiR-29a、miR-29bをDSS投与開始時より1, 2, 3, 5日目に尾静脈から全身投与して9日目に腸管を採取した。マウスの体重変化、腸管長、組織学的な炎症スコアを指標として大腸炎の予防効果を検討したところ、miR29-a, bともに腸炎の発症を有意に抑制した。一方、sCAを使用せずmiR-29b単独で全身投与しても腸炎は予防できなかった。次に治療モデルとして、DSS投与開始後5日目より隔日投与でsCA-miR-29bを6回投与したところ、最終までDSS溶液の給水を継続した状態でも、腸管の炎症は有意に鎮静化された。DSSによる炎症腸管からmRNAを抽出してRNAシーケンスによってGene ontology分析を行ったところ、Toll like receptorの下流のインターフェロン関連の炎症カスケードが高度に活性化されていることが分かった。一方、sCA-29a, bによって治療を受けたマウス腸管では、この炎症カスケードに属する関連分子の多くが抑制されていた。更に静注のみならず、sCAに内包したmiR-29bは皮下注射でも腸管炎症を抑制した。sCAに内包したmiRNAの組織内分布を調べるために、赤色蛍光標識したmiR-29bを作成し、sCAに内包してマウスに投与し、4時間後に組織を回収した。蛍光顕微鏡で凍結組織切片を観察したところ、miR-29bの腸管細胞への取り込みは乏しく、間質に存在する免疫細胞様の細胞に取り込まれている像が観察された。そこで各種の免疫細胞に対する細胞表面マーカーを用いて、赤色核酸の局在との関係を調べたところ、miR-29b は CD11c陽性の樹状細胞に一致して取り込まれていることが分かった。MACS proによってCD11c陽性の樹状細胞を腸管から分離して、RNAを抽出しRT-PCR法で分析したところ、DSS投与群で上昇したIL-6、TGF-β、IL-23サブユニットのIL-12p40とIL-23p19の発現がsCA-miR-29a, b投与によって有意に抑制されていた。これらの炎症性サイトカイン分子は、naïve T細胞からTh17細胞への分化に必須であることから、sCA-miR-29a, bが炎症腸管の樹状細胞を起点とする炎症カスケードの初期免疫応答を阻害した可能性が考えられる。 〔総 括(Conclusion)〕 sCAはマウスIBDモデルにおいて炎症腸管の樹状細胞に対して効率よくmiRNAを送達することが分かった。sCA-miR-29a, bは、樹状細胞が産生するIL-23をはじめとする炎症性サイトカインの発現抑制を通じてTh17細胞の分化誘導を抑制し、マウス大腸炎の予防・治療に有用であると考えられた。	