

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08602

研究課題名(和文)新しい核酸医薬で敗血症を治療するための分子基盤の構築

研究課題名(英文)A molecular basis to develop the new nucleic acid drugs for sepsis

研究代表者

西澤 幹雄(Nishizawa, Mikio)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：40192687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細菌が感染して炎症が全身に及ぶと敗血症となり、死に至ることも多い。敗血症では一酸化窒素が過剰に合成されて血管を拡張させ、血圧低下(ショック)が起こる。本研究では、ラット肝細胞を用いて一酸化窒素合成酵素のメッセンジャーRNAを減少させるオリゴヌクレオチドを見つけた。これを敗血症モデルラットに投与すると、生存率が有意に改善されたことから、新たなヒト敗血症の治療薬となりうる新しい核酸医薬と期待される。

研究成果の概要(英文)：Bacterial infection causes inflammation. When systemic inflammation occurs, it causes sepsis, resulting often in death. Nitric oxide that is excessively produced during sepsis causes vasodilation, which leads to septic shock. In this study, we found that a sense oligonucleotide that reduced the mRNA levels of inducible nitric oxide synthase in rat hepatocytes. When the oligonucleotide was administered with to the sepsis model rats, their survival rate significantly increased, suggesting that the oligonucleotide may be used to treat human sepsis.

研究分野：生化学、分子生物学、病態生化学

キーワード：敗血症 センスオリゴ 誘導型一酸化窒素合成酵素 肝細胞

1. 研究開始当初の背景

細菌が感染すると、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) によって炎症メディエーターである一酸化窒素 (NO) が作られるのみならず、腫瘍壊死因子 (TNF) が合成される。とくに手術後や肝硬変を合併している場合には感染が全身に及んで重篤な敗血症になることがあり、血圧低下 (ショック) や多臓器不全を起こして死に至ることが多い。

私たちは、iNOS と TNF の遺伝子からメッセージャー RNA (mRNA) の相補鎖と同じ配列をもつアンチセンス転写物 (asRNA) が作られ、この asRNA が mRNA の安定性を調節していることを発見した [Matsui ら. 2008]。asRNA はタンパク質をコードするセンス鎖ではなく、アンチセンス鎖と同じ配列を持ち、タンパク質に翻訳されない RNA である。asRNA を介する遺伝子発現制御はまったく新しいメカニズムであり、asRNA は敗血症を起こしたラットやヒト組織においても発現している [Yoshigai ら. 2014; Yoshigai ら. 2013]。TNF やインターフェロンを含む多くのサイトカイン・ケモカイン遺伝子でも asRNA が発見され、機能解析されるにいたって [Yoshigai ら. 2014; Kimura ら. 2013]、asRNA を介する遺伝子発現調節機構の重要性は広く認知されるようになった [Nishizawa ら. 2012]。

つぎに、iNOS の mRNA と同じ塩基配列の一本鎖オリゴヌクレオチド (以下、センスオリゴと略す) を細胞内に入れたところ、iNOS mRNA 量と NO 量が顕著に減少した [Yoshigai ら. 2013]。これは、センスオリゴが asRNA と結合して、asRNA と mRNA の結合を阻害し、mRNA の分解が促進されたためである。iNOS センスオリゴの効果は、siRNA の RNA 干渉効果とほぼ同程度であった [Yoshigai ら. 2013]。

2. 研究の目的

敗血症では必ずしも抗生物質が効かず、敗血症に著効を示す薬物はほとんどない。したがって、敗血症に対する治療薬を作ることができれば多くの命を救うことができる。

そこで本研究では、培養細胞において iNOS および TNF の mRNA を減少させるセンスオリゴを探し、センスオリゴの最適化を行い、つぎに敗血症モデルラットに投与して生存率を改善するセンスオリゴを探索することを目的とした。そして、センスオリゴをヒトの治療薬として実用化するための分子の基盤を作ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) センスオリゴの設計

iNOS および TNF の mRNA の 3'非翻訳領域の二次構造を予測し、種間で保存されている

配列に対するセンスオリゴを各種デザインし、合成した [Yoshigai ら. 2013; Yoshigai ら. 2014]。

(2) 培養細胞へのセンスオリゴ導入実験

ラット肝細胞へのセンスオリゴ導入は、Matsui らの方法 [Matsui ら. 2008] にしたがって、MATra-A 試薬 (IBA 社) を用いて行った。また、ヒト DLD-1 株細胞への導入も同様に、Yoshigai らの方法 [Yoshigai ら. 2013] にしたがった。

(3) 敗血症モデルラットの遺伝子発現パターンの解析

敗血症モデルにはガラクトサミンと LPS を同時投与したラットを用い、投与後に肝臓を摘出して全 RNA を取り、マイクロアレイ解析 (Agilent 社) を行った。

(4) 敗血症モデルラットへのセンスオリゴ投与

敗血症モデルにはガラクトサミンと LPS を同時投与したラットを用い、ラットの生存率を確認した。センスオリゴ投与後の肝臓組織と mRNA 量は、組織染色および RT-PCR 法により確認した。また、センスオリゴを投与した際の肝臓での mRNA 発現は、マイクロアレイ解析によっても確認した。

なお動物実験計画は立命館大学 BKC 実験動物委員会および関西医科大学動物実験委員会にて承認され、法令およびガイドライン等に従って実施した。

4. 研究成果

敗血症治療薬としてセンスオリゴの実用化の基盤を作るために、以下の項目について検討した。

(1) 培養細胞を用いたセンスオリゴの最適化

ラット iNOS mRNA に対するセンスオリゴについては、初代培養ラット肝細胞を用いた。センスオリゴ S3C [Yoshigai ら. 2013] の配列を基にして、センスオリゴの配列、長さ、修飾などの微調整を行った。その結果、効率よく iNOS mRNA を減少させた S3C-LD1-D (以下、iNOS センスオリゴ 1 と呼ぶ) を、動物への投与実験に用いることとした。

ヒト iNOS については、肝細胞由来のヒト培養細胞では iNOS の発現が非常に低く解析が難しかったため、iNOS の誘導的発現が認められている DLD-1 株を用いて実験を行った。ヒト iNOS mRNA に対するセンスオリゴの配列を設計してセンスオリゴを細胞に導入し、iNOS mRNA を定量してセンスオリゴの効果を検討した。その結果、iNOS mRNA 量を有意に減少させる配列を決めることができた。

ラット TNF mRNA に対するセンスオリゴについては、初代培養ラット肝細胞を用いた。既報の配列[Yoshigai ら, 2014]を基にして数種のセンスオリゴを設計した。これらのセンスオリゴを細胞に導入し、TNF mRNA を定量した結果、TNF mRNA 量を有意に減少させる配列を決めることができた。

(2) 敗血症モデル動物の遺伝子発現パターンの解析

敗血症モデルには、ガラクトサミンと LPS を投与したラットおよび部分肝切除後に LPS 投与したラットの 2 つを選んだ。投与後に肝臓を摘出して RNA を抽出し、陰性対照ラットの RNA とともにマイクロアレイ解析を行い、それぞれの mRNA 発現を、2 つのモデルで比較した。iNOS mRNA については後者のモデルでの発現が、前者に比べて約 3 倍高かった。代表的な炎症性サイトカインやケモカインなどについては、それぞれの遺伝子により発現の強さが異なっていた。

センスオリゴを投与する敗血症モデルには、ガラクトサミンと LPS を投与したラットを用いることとした。

(3) 敗血症モデル動物でのセンスオリゴの効果の検討およびセンスオリゴ投与方法の最適化

まず、iNOS センスオリゴ 1 を敗血症モデルラットに投与する実験を行ったところ、LPS 投与後 72 h の生存率が高い傾向があった。一方、TNF センスオリゴについては結果がはっきりしなかつたため、iNOS センスオリゴを中心に調べた。

iNOS センスオリゴ 1 の投与の方法（投与量、投与のタイミングなど）を変えて、投与条件の最適化を行った。iNOS センスオリゴ 1 を敗血症モデルラットに同時投与すると、生存率が有意に改善され、LPS 投与後 72 h において約 60%が生存していた（図 1）。

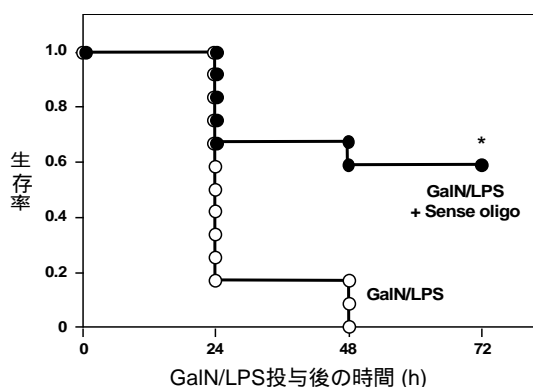


図 1. 敗血症モデルラットに iNOS センスオリゴ 1 を投与したときの Kaplan-Meier 曲線。

ガラクトサミン(GalN)/LPS と iNOS センスオリゴを同時投与、GalN/LPS のみ投与したラット。* $P < 0.05$ versus GalN/LPS のみ。

肝臓を採取して組織を TUNEL 法で解析すると、センスオリゴを投与したラットでは、肝細胞のアポトーシスが有意に減少した（図 2）。

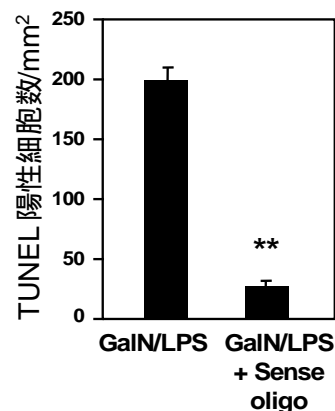


図 2. 肝臓切片における TUNEL 法陽性の細胞数。GalN/LPS と iNOS センスオリゴを同時投与と GalN/LPS のみ投与したラットの肝臓の切片を用いた。** $P < 0.01$ versus GalN/LPS のみ。

また、特異的エステラーゼ染色を行ったところ、肝臓における好中球の浸潤が減少する傾向が見られた（図 3）。すなわち、この iNOS センスオリゴは、敗血症による肝障害を軽減したと考えられた。

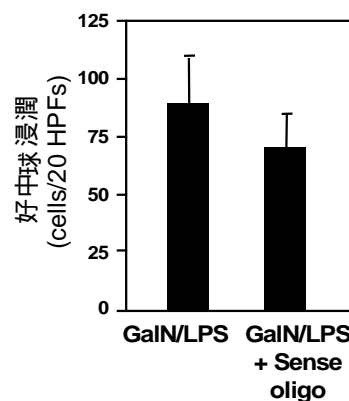


図 3. 肝臓切片における浸潤した好中球細胞数。特異的エステラーゼ染色陽性の細胞を好中球とみなした。GalN/LPS と iNOS センスオリゴを同時投与と GalN/LPS のみ投与したラットの肝臓の切片を用いた。HPF, high power field.

センスオリゴとガラクトサミン/LPS を投与して 72 h 生存していたラット、およびガラクトサミン/LPS のみを投与したラット（陽性対照）について、iNOS mRNA と TNF mRNA の量を測定した。生理的食塩水のみを投与したラット（陰性対照）と比較すると、

陽性対照では iNOS および TNF mRNA 量が増加した。一方、センスオリゴ投与すると iNOS および TNF mRNA 量が顕著に減少した。

以上の結果より、iNOS センスオリゴ 1 は、ガラクトサミン/LPS 投与した敗血症モデルラットの肝障害を軽減し、生存率を改善させた。したがって、iNOS センスオリゴは、ヒトの敗血症（とくに血管拡張の著明な早期の敗血症ショック）の治療薬としての可能性が期待できる。

参考文献

- Kimura T, Jiang S, Nishizawa M, Yoshigai E, Hashimoto I, Nishikawa M, Okumura T, Yamada H. Stabilization of human interferon-alpha1 mRNA by its antisense RNA. *Cell Mol Life Sci.* **70**: 1451–1467 (2013).
- Matsui K, Nishizawa M, Ozaki T, Kimura T, Hashimoto I, Yamada M, Kaibori M, Kamiyama Y, Ito S, Okumura T. Natural antisense transcript stabilizes inducible nitric oxide synthase messenger RNA in rat hepatocytes. *Hepatology* **47**: 686–697 (2008).
- Nishizawa M, Okumura T, Ikeya Y, Kimura T. Regulation of inducible gene expression by natural antisense transcripts. *Front Biosci. (Landmark Ed)*. **17**: 938–958 (2012).
- Yoshigai E, Hara T, Araki Y, Tanaka Y, Oishi M, Tokuhara K, Kaibori M, Okumura T, Kwon AH, Nishizawa M. Natural antisense transcript-targeted regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels. *Nitric Oxide* **30**: 9–16 (2013).
- Yoshigai E, Hara T, Inaba H, Hashimoto I, Tanaka Y, Kaibori M, Kimura T, Okumura T, Kwon AH, Nishizawa M. Interleukin-1 β induces tumor necrosis factor- α secretion from rat hepatocytes. *Hepatol Res.* **44**: 571–583. (2014).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Tetsuya Okuyama, Richi Nakatake, Masaki Kaibori, Tadayoshi Okumura, Masanori Kon, Mikio Nishizawa.

A sense oligonucleotide to inducible nitric oxide synthase mRNA increases the survival rate of rats in septic shock. *Nitric Oxide.* **72**: 32–40 (2018)

査読：有り

DOI: 10.1016/j.niox.2017.11.003

Mikio Nishizawa, Tominori Kimura. RNA networks that regulate mRNA expression and their potential as drug targets.

RNA & Disease. **3**(1): e864 (2016).

査読：有り

DOI: 10.14800/rd.864

〔学会発表〕(計 4 件)

西澤 幹雄、奥山 哲矢、中竹 利知、奥村 忠芳.

誘導型一酸化窒素合成酵素センスオリゴは敗血症モデルラットの生存率を上げる。第 25 回肝細胞研究会

2018 年

Tetsuya Okuyama.

Sense oligonucleotides to inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA for the treatment of septic shock.

The 3rd International Symposium on Science, Sustainability, and Teaching (ISSST)

2018 年 (招待講演)

Mikio Nishizawa, Tetsuya Okuyama, Rich Nakatake, Tadayoshi Okumura.

iNOS sense oligonucleotides to treat septic shock.

The 8th Annual Basic Science International Conference 2018 (BaSIC 2018)

2018 年 (招待講演)

Mikio Nishizawa.

Post-transcriptional regulation of inducible genes by natural antisense transcripts and involvement of herbal medicine.

The 2nd International Symposium on Science, Sustainability, and Teaching (ISSST)

2016 年 (招待講演)

〔その他〕

ホームページ等

立命館大学 生命科学部生命医科学科 医化学研究室ホームページ

<http://www.medch.sk.ritsumeai.ac.jp/>

立命館大学 研究者学術情報データベース

<http://research-db.ritsumeai.ac.jp/scripts/websearch/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西澤 幹雄 (NISHIZAWA MIKIO)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：40192687

(2)研究分担者

海堀 昌樹 (KAIBORI MASAKI)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30333199

奥山 哲矢 (OKUYAMA TETSUYA)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：80614966

中竹 利知 (NAKATAKE RICHI)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：40779401

(3)研究協力者

奥村 忠芳 (OKUMURA TADAYOSHI)

立命館大学・総合科学技術研究機構・

客員協力研究員

研究者番号：80113140