

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791320

研究課題名（和文） 肺特異的遺伝子翻訳阻害モデルを用いた肺気腫の病態解明と治療開発

研究課題名（英文） Airway administration of small silencing RNA oligonucleotides in mice: transient airspace enlargement induced by VEGF specific blockade in lung.

研究代表者

高橋 祐介 (TAKAHASHI YUSUKE)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00445214

研究成果の概要(和文):遺伝子の肺特異的翻訳阻害モデルをマウスで作製することに成功した。具体的にはサーファクタント蛋白を担体として VEGF siRNA をマウス鼻腔より投与することで肺気腫様の形態学的変化を得ることができ、この変化が VEGF タンパク発現の低下と相関していることや DCI 投与により救済できるということが明らかとなった。肺気腫の病態における VEGF の役割や肺気腫治療開発の第一歩となる可能性がある。

研究成果の概要(英文): We report a readily available model of lung targeted VEGF depletion by airway administration of VEGF small inhibitory RNA oligonucleotides (siRNAs). In the present study, airway administration of VEGF siRNAs mixed in surface active material induced transient air space enlargement in the mouse lung morphologically resembling the previously reported models of pulmonary emphysema. The present model may be useful in dissecting the involvement of VEGF in pulmonary emphysema. Additionally, we found that airway administration of DCI, a combination of dexamethasone, 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate, and isobutylmethylxanthine, which has been reported to induce differentiation of type II alveolar cells, attenuated the air space enlargement in this particular model, at least in part through the recovery of lung VEGF expression. We believe that the results of this study have broad implications in the field of respiratory physiology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：遺伝子翻訳阻害・肺気腫

1. 研究開始当初の背景

肺疾患の中には病態の解明が十分になされていないものが多数存在している。中でも、肺気腫は罹患数、死亡数ともに増加の一途をたどっており、保健・公衆衛生上の大きな問

題となっている。一方で、肺気腫の病態の全容は分かっておらず、特に発症と進行のメカニズムの解明はあまり進んでいない。

従来、特定遺伝子のノックアウトマウスが多く研究されてきた。肺領域においては、肺

の発生やメンテナンスに重要な因子のノックアウトマウスでは、呼吸不全によってマウスが生存しないことも多く、その解析が難しい。出生直後の解析は可能であるが、成熟マウスにおける解析が難しく、成人に起こる疾患の病態を正確に表しているのかという大きな問題が残る。また、ノックアウトマウスの作製は技術的に煩雑であるという課題もあった。

もうひとつの遺伝子ノックアウト技術としては、Cre-loxP システムが挙げられる。標的遺伝子を任意の時期と場所でノックアウトできるため、標的遺伝子が致死遺伝子であってもその形質を確認することができるという長所がある。しかし、その技術的な煩雑さから、いくつかの標的遺伝子の阻害を行う実験モデルに用いることは困難である。

近年普及しつつある RNA 干渉技術は、特定遺伝子の相補的な配列の短い二本鎖 RNA (si RNA) によって翻訳阻害して特定遺伝子をノックダウンする技術である。従来は尾静脈注射などの全身投与が主に行われていたが、それでは肺特異的に特定遺伝子をノックダウンすることにはならず、肺疾患の病態解明という意味では不十分であった。肺特異的な RNA 干渉モデルによって形態的・機能的変化を詳しく検討した報告はない。そこでわれわれは、肺に親和性の高い担体を用いた siRNA の経気道的投与によって特定遺伝子を肺特異的にノックダウンする方法の確立を計画した。

Vascular endothelial growth factor (VEGF) は内皮細胞の生存に欠かせない因子であり、in vivo でも in vitro でも内皮細胞の増殖を誘導し、VEGF の減少が内皮細胞のアポトーシスを誘導する。(Gerber HP et al. (1998) J Biol Chem.) また、重度の肺気腫の患者において肺組織における VEGF が減少していることは数多く報告されている。(Kanazawa H (2007) Med Sci Monit.) 動物実験では VEGF 受容体チロシンキナーゼの特異的阻害剤である SU5416 の全身投与によって肺胞上皮細胞のアポトーシスと肺気腫の形成が起こることが示されている。(Kasahara Y et al. (2000) J Clin Invest.) また、ラットの喫煙による肺気腫モデルでは VEGF₁₆₅ と VEGF 受容体の複合体の形成に

よるシグナル伝達が阻害されていることが報告されている。しかし、VEGF そのものを直接的に、また肺特異的に阻害したモデルの検討は行われていない。 今回の肺特異的 VEGF 阻害モデルを用いて肺気腫の病態における VEGF の関与を考察することを目標とした。

2. 研究の目的

呼吸器領域では十分に病態の解明がなされていない疾患が数多く存在している。従来、疾患の病態解明には主としてノックアウトマウスや Cre-loxP システムが用いられてきたが、技術的に煩雑であるため、iv vivo で病態の解明を進めることが困難であった。申請者はマウスにおいて肺特異的に遺伝子翻訳を阻害する、in vivo RNAi モデルを確立することを考えた。このモデルの解析によって肺疾患の病態解明につながる可能性がある。本研究ではとくに、予備実験において近似した組織像を得ることができた肺気腫について、その因子の解析のみでなく、リコンビナント蛋白や誘導因子の投与による救済実験を行い、治療法の開発の可能性に繋がる病態、とくに VEGF との関連について明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

動物・siRNA 投与

雄性、10 週齢の C57/BL6 マウスは ad libitum な飲水・食餌、12 時間毎の明暗交代する環境で飼育する。

siRNA の投与にあたって、マウスにタミン (25mg/kg) およびキシラジン (3mg/kg) の腹腔内注射にて麻酔をかける。VEGF siRNA は 10 µg を、全量が 5 µl となるように Infasurf と混和して 15 分室温でインキュベートしたのち、マイクロピペットでマウスの鼻腔内に投与する。ネガティブコントロール群として nonsilence のオリゴヌクレオチド 10 µg を同様に投与する。

検体採取

siRNA 投与後、2、4、7 日後にそれぞれマウスにケタミン (100mg/kg) ・キシラジン (10mg/kg) を腹腔内注射した後、胸骨正中切開より開胸して上大静脈を切開し脱血死させる。右肺を摘出し、10%ホルマリンを 20cm 水柱の圧で気管から注入後、気管を結紮して固定する。左肺は生化学的実験のために液体

窒素で凍結し保存しておく。

形態計測

ホルマリン固定後、Scherle の置換法で体積測定を行う。パラフィン包埋後、5 μ m に薄切した組織をヘマトキシリン-エオジン染色を行う。標本は 10 倍拡大の顕微鏡視野下で形態計測を行う。Mean linear intercept (MLI), mean chord length (MCL), surface to volume ratio (S:V) を計測して肺気腫の評価を行う。(Zielinski L et al. (2009) Am J Respir Crit Care Med.) 検者は盲検法でランダムに標本を選んで、1 検体あたり 20 視野ずつ計測を行うこととする。

免疫染色

未染標本を、抗 VEGF 抗体(A-20)を一次抗体として、抗ウサギ抗体を二次抗体としてそれぞれ用いて免疫染色を行う。VEGF の陽性率と局在を比較し、siVEGF の効果と組織学的変化の相関を検討する。(ここでは特に、肺胞中隔における変化に注目する。)

VEGF および VEGFR2 型受容体の発現

凍結組織は気管などを含まない末梢肺から RIPA バッファーを用いてタンパク抽出を行う。まず VEGF のタンパク量を sandwich ELISA によって定量化する。VEGF, VEGFR2, リン酸化 VEGFR2 の発現は免疫電気泳動によって検出する。同じメンブレンを アクチンで再び反応させて、その発現量で標準化して比較する。

細胞増殖とアポトーシスの評価

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) を用いた免疫染色を行って、盲検法でランダムに PCNA 陽性核の計測を行う。アポトーシス、特に肺気腫モデルマウスにおいて肺胞中隔の細胞のアポトーシスが誘導されるとされているため、その評価のために、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)法を行う。抗原賦活後にビオチン化ヌクレオチドと rTdT 酵素で TUNEL 反応を行う。その後 Alexa Fluor647 ストレプトアビジンを用い

て検出し、siVEGF とアポトーシスの数的な相関およびアポトーシスの局在を調べる。

他の因子の抽出

VEGF のみでなく、claudin5 や Abca12 などに対する siRNA の投与も行って同様の評価を行う。予備実験では VEGF siRNA 投与群と同様に、肺気腫に近似した変化が認められた。これらについて VEGF siRNA 投与群との形態学的な相違点、VEGF や Claudin5、Abca12 などの発現やアポトーシスの差異などについての考察を加える。

VEGF siRNA 救済実験

肺気腫が形成される VEGF siRNA 投与マウスに何らかの因子を Infasurf と混和して投与することによって気腫化からの救済を行う。VEGF リコンビナント蛋白や肺胞形成に関与する可能性があるステロイド製剤などの投与による救済を試み、肺気腫の変化について形態計測による評価を行う。

生命倫理・安全対策に関する留意事項

本動物実験計画における動物の取り扱いについては、すでに本大学医学部動物実験委員会により、動物福祉の精神に沿った適切な計画であることが承認されている。

4. 研究成果

平成22年度は肺気腫モデルの確立を目指し、VEGF のノックダウンを c57/BL6 マウスに対して、VEGF 遺伝子に対する siRNA を Infasurf と混合したのちマウス鼻腔より投与した。H.E. 標本作製し、組織学的変化の詳細を画像解析ソフトを用いた morphometry を行ってその経時的変化を検討した。また、siRNA の作用期間と考えられる 48-72 時間と形態学的変化が合致するか否かを検討し、また Infasurf 単独投与群をコントロールとして、その比較によって肺特異的遺伝子翻訳阻害モデルとしての妥当性を評価した。その結果、肺気腫に類似する形態学的変化、つまり肺胞壁の破壊と気腔拡大が起こっていることが明らかとなった。一方で、組織学的には炎症は起こっておらず、その原因が炎症によるものではないと考えられた。さらに、肺気腫に類似する形態学的変化が一過性のものであり、その経時的変化が siRNA の作用期間とほぼ一致していること、Infasurf 単独ではこれらの形態学的変化

が起こりえないことが明らかとなった。
平成23年度は各因子のmRNA量およびタンパク発現量と形態像との経時的变化を解析した。Western blotting法を用いた解析によって、VEGFタンパク発現と形態学的変化の時間的な相関が明らかとなった。DCI(dexamethason, c-AMP, isobutylmethylxanthine)またはレチノイン酸や投与を同時に行うことによって形態学的変化を抑制できるかの救済実験を試みた。上記と同様のmorphometryによってDCI投与群ではVEGFsRNA投与群で起こる形態学的変化が起こらないことが分かった。これらの知見は肺気腫の病態におけるVEGFの役割や肺気腫治療開発の第一歩となる研究と成り得ると考えている。

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3件)

Takahashi Y, Ishii G et al. Fibrous stroma is associated with poorer prognosis in lung squamous cell carcinoma patients. 査読有、J Thorac Oncol. 6(9): 2011, 1460-1467

Takahashi Y, Izumi Y et al. Airway administration of dexamethason, 3'-5'-cyclic adenosine mono-phosphate, and isobutyl methylxanthine facilitates compensatory lung growth in adult mice. 査読有、Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 300(3): 2011, L453-461

Takahashi Y, Izumi Y et al. Thyroid transcription factor-1 influences the early phase of compensatory lung growth in adult mice. 査読有、Am J Crit Care Med. 15; 181(2): 2010, 1397-1406

[学会発表](計5件)

高橋祐介、泉陽太郎ら マウス代償性肺成長におけるDCI投与による促進効果
第64回日本胸部外科学会定期学術集会(2011年10月11日 名古屋)

高橋祐介、石井源一郎ら 扁平上皮癌における間質の形態学的特徴と悪性度の相関
第28回日本呼吸器外科学会総会(2011年5月13日 大分)

高橋祐介、泉陽太郎ら 成体マウス肺の再生過程における thyroid transcription factor
第100回日本病理学会総会(2011年4月29日 横浜)

高橋祐介、泉陽太郎ら マウス代償性肺

再生における肺胞形成は正常肺発生に類似する
第63回日本胸部外科学会定期学術集会(2010年10月25日 大阪)
高橋祐介、泉陽太郎ら 難治性気胸に対するフェンタニル塩酸塩を用いた局所麻酔下手術の二例
第27回日本呼吸器外科学会総会(2010年5月13日 仙台)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 祐介 (TAKAHASHI YUSUKE)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 00445214