

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15932

研究課題名（和文）アデノ随伴ウイルスベクターを用いた肺線維症に対する遺伝子治療法の開発

研究課題名（英文）Development of gene therapy for pulmonary fibrosis using adeno-associated virus vectors

研究代表者

黒崎 史朗（KUROSAKI, Fumio）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：60625705

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：難治性疾患である肺線維症に対し、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた遺伝子治療の開発について研究を行った。治療遺伝子として、抗炎症性サイトカインであるIL-10遺伝子を用い、IL-10発現AAVベクターを作製した。組み換えAAVベクターをブレオマイシンで誘発した肺線維症モデルマウスに気管内投与を行って、肺線維症の発症を予防できることを確認した。IL-10による治療効果はブレオマイシン誘発肺線維症マウスの死亡率の抑制、病理組織での線維化の抑制、肺のコラーゲン生成の抑制、線維化促進性サイトカインのTGF- β 1の生成が抑制されていることで確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症は、発症機序として、持続する慢性炎症と、肺傷害に対する過修復が推定されており、臨床現場では抗線維化作用を持つ薬剤が使用されている。しかし、未だ根治には至っていない現状がある。本研究では、抗炎症性サイトカインであるIL-10に着目し、IL-10遺伝子をAAVベクターに組み込むことで、ブレオマイシン肺線維症モデルマウスに効率良く遺伝子を導入し、生存率の向上と抗線維化効果の両方を示すことができた。本研究によって、IL-10を発現した組み換えAAVベクターが肺に特異的かつ長期に導入でき、肺の線維化を予防する効果を示せたことから、肺線維症に対する新たな治療法になりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Our research goal was to develop gene therapy for an intractable disease called pulmonary fibrosis, using adeno-associated virus (AAV) vectors. We used the gene of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, as a therapeutic gene and created recombinant AAV vectors that express IL-10. We delivered the recombinant AAV vectors into the lungs of bleomycin-induced pulmonary fibrosis models through the trachea. We found that the recombinant AAV vectors prevented the fibrosis from progressing in the lungs. The anti-fibrotic effects of IL-10 were verified by the histological prevention of fibrosis, increased survival rate, and reduced collagen production and pro-fibrotic cytokine, TGF- β 1 in the lungs.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：AAVベクター 肺線維症 IL-10

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF) は未だ有効な根治療法のない慢性呼吸器疾患であり、診断後の余命は 3~5 年に過ぎない。IPF の原因については不明な点も多いが、主たる病態は肺胞上皮細胞の繰り返す損傷とその修復・治癒過程の異常と考えられている。その過程には、線維化を促進するサイトカインである TGF- β 1 が関与しており、TGF- β 1 は線維芽細胞や筋線維芽細胞を持続的に活性化して遊走・増殖・細胞外基質の過剰産生を引き起こして肺構造の破壊に至る。かつて経験的に IPF 治療に用いられてきたステロイドや免疫抑制剤などの抗炎症治療は、大規模な研究解析により、生存率が向上しないどころか、むしろ易感染性など副作用の方が上回る結果となり、現在のガイドラインでは推奨されていない。代わりに、ピルフェニドンやニンテダニブといった抗線維化作用を示す薬剤が投与されるようになったが、これらの抗線維化薬は進行を遅らせることはできても病勢改善には至らず、IPF に対する有効な治療法の確立は喫緊の課題である。そこで、申請者は免疫抑制性サイトカインとして知られる IL-10 に注目した。IL-10 はマクロファージやリンパ球など様々な免疫細胞から産生されるが、免疫についてのみならず多彩な抑制作用を有する。申請者らの研究グループは、これまでに IL-10 を様々な臓器傷害モデル動物 (肺高血圧モデル、高血圧モデル、脳卒中モデル、腹膜線維症モデル) に導入すると、臓器傷害が軽減し、生存率も向上することを明らかにしてきた (Onishi et al. Lab Invest 95: 1353-62, 2015 等)。さらにその機序として、IL-10 によって TGF- β 1 を介する線維化が抑制され、肺や心筋、腎臓、腹膜における臓器傷害が軽減されていることを見出した。一方で、申請者はアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの遺伝子導入効率改善に取り組み、従来法に比べて飛躍的に優れた方法を確立した (Kurosaki F, et al. Gene Ther. 24: 290-297, 2017.)。AAV 血清型は数多く存在するが、その中でも肺への遺伝子導入には AAV6 型が最も優れ、CAG プロモーターと組み合わせることで、これまで遺伝子治療研究で使用されてきた手法よりも遙かに高効率で肺に遺伝子導入できることを見出した。この AAV6-CAG ベクターを気管内に投与すると、他臓器への漏れは殆どなく、肺においてのみ導入遺伝子が発現するため、副作用や安全の観点からも優れている。そこで、IL-10 遺伝子を搭載した AAV ベクター (AAV-IL10) が肺線維症治療に有効であるという仮説を立て、実験的肺線維症モデルとして確立しているプレオマイシン肺線維症マウスに AAV-IL10 を投与し、IL-10 の生理作用や有効性、安全性を評価することにした。

2. 研究の目的

これまで有効な治療法がなかった IPF に対して、遺伝子治療という新規アプローチを開拓することを目指し、1) IL-10 発現 AAV ベクター (AAV-IL10) を作製し、この組み換えベクター (AAV-IL10) をマウスの気管内に投与し、IL-10 の発現および安全性を評価する。そして、2) 実験的肺線維症モデルとして確立しているプレオマイシン肺線維症モデルマウスに IL-10 発現 AAV ベクター (AAV-IL10) を投与し、IL-10 の有効性や抗線維化作用を評価する。

3. 研究の方法

本研究は以下の方法で行った。

(1) IL-10 発現 AAV ベクター (AAV-IL10) の作製

AAV-IL10 の作製については、申請者らの研究グループで実績のある方法で作製する。すなわち、ベクタープラスミド (pCAG-IL10) とウイルスタンパク質をコードする AAV6 型のパッケージングプラスミド、アデノウイルス由来の E2A、E4、VA を含むヘルパープラスミドをリン酸カルシウム共沈法でヒト胎児腎細胞 293 (HEK293) にトランスフェクションした。72 時間の培養後に、HEK293 細胞を回収して凍結・融解を繰り返すことにより組み換え AAV ベクターを含む粗抽出液を得、これを塩化セシウム密度勾配遠心法で精製して作製した。

(2) マウスにおける IL-10 の発現および安全性

C57BL/6J マウスに IL-10 発現 AAV ベクター (AAV-IL10) を気管内に投与し、気管支肺胞洗浄液 (BALF) や血漿での IL-10 の発現の推移を長期間追跡した。安全性については、BALF における白血球分画や AAV-IL10 の投与 4 週間後の肺切片を用いて、病理学的評価を行った。

(3) 肺線維症の病態における IL-10 の抗炎症効果と抗線維化効果

プレオマイシン肺線維症モデルの作製は、C57BL/6J マウスにプレオマイシンを充填した浸透圧ポンプを皮下に埋め込み、持続投与を行うことで作製した。肺線維症の評価については、組織染色 (HE 染色、Masson-Trichrome 染色) を行い、病理医とともに組織学的検討を行った。線維化の評価については、Masson-Trichrome 染色を基にして、線維化スコアリング (Ashcroft Score) を行った。マウスにおける遺伝子導入は AAV-IL10 またはプラセボを気管内投与し、経過を追って気管支肺胞洗浄液 (BALF) や血液を採取した。

具体的には、線維化に関与するサイトカイン (TGF- β 1)、コラーゲンの増生について解析した。

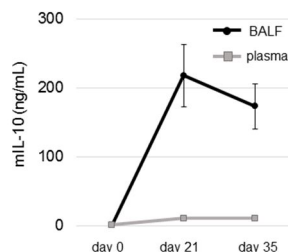
4. 研究成果

(1) IL-10 発現 AAV ベクター (AAV-IL10) の作製

作製した AAV-IL10 は *in vitro* で培養した気管支上皮細胞 (BEAS-2B) に遺伝子導入を行い、その細胞の培養上清を ELISA 法にて測定し、確認した。

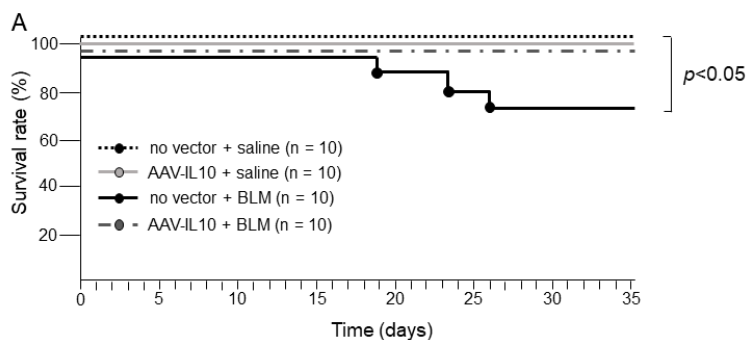
(2) マウスにおける IL-10 の発現および安全性

C57BL/6J マウスに 1 個体あたり AAV-IL10 を 5×10^5 vg を気管内に投与し、BALF と血漿の IL-10 の濃度を ELISA で評価したところ、約 5 週間に渡って肺に特異的に発現していることを確認した。安全性については、回収した BALF ならびに肺切片を評価したが、炎症細胞の増加や肺組織への浸潤は認められなかった。

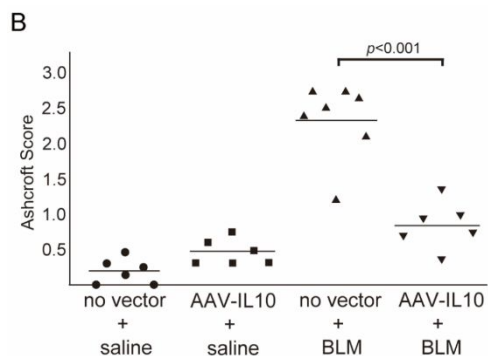


(3) 肺線維症の病態における IL-10 の抗炎症効果と抗線維化効果

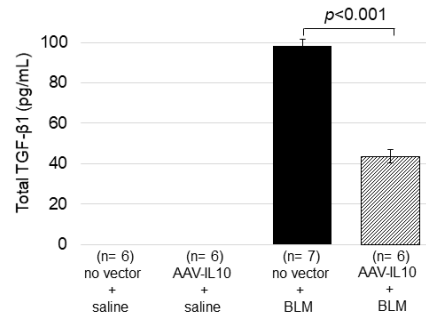
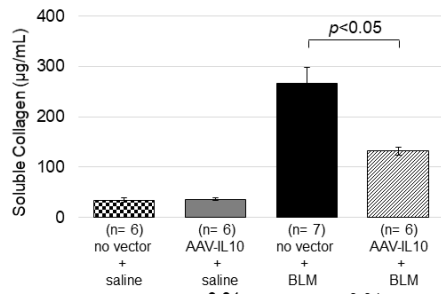
当初、プレオマイシンまたは生理食塩水 (生食) を充填した浸透圧ポンプを C57BL/6J マウスの皮下に移植した後に、AAV-IL10 またはプラセボを投与する実験を行った。皮下にプレオマイシンのポンプを移植した後から、気管内投与を行うまでの時間を週毎に評価をしたが、マウスの体重減少が著しく、死亡率が 50% に迫るため、断念した。そのため、最初に AAV-IL10 またはプラセボをマウスに気管内投与し、その後にプレオマイシンのポンプを皮下に移植する方法を選択した。その間の期間は 1 週間とした。すると、プレオマイシンかつプラセボを気管内に投与された群 (疾患群) は 30% 死亡したのに対し、AAV-IL10 を投与された群 (治療群) は体重減少を認めたものの、死亡することはなかった。



病理学的評価については、35 日目に肺切片を Masson-Trichrome 染色かつ線維化スコアリング (Ashcroft Score) を行ったところ、治療群は疾患群と比較して優位に線維化が抑制されていることが分かった。



生化学的評価では、35 日目に回収した BALF 中の可溶性コラーゲンならびに線維化促進性サイトカインである TGF- β 1 を測定すると、治療群は疾患群と比較して有意にそれらの生成が抑制されていた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurosaki Fumio, Takemura Tamiko, Bando Masashi, Kuroki Tomonori, Numao Toshio, Moriyama Hiroshi, Hagiwara Koichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Progressive plasterer's pneumoconiosis complicated by fibrotic interstitial pneumonia: a case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Pulmonary Medicine	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12890-018-0776-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kurosaki Fumio, Yoshimoto Taichiro, Nakayama Masayuki, Bando Masashi, Hagiwara Koichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Pulmonary Mycobacterium heckeshornense infection in a healthy woman	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 483 ~ 486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2018.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kurosaki Fumio, Uchibori Ryosuke, Sehara Yoshihide, Saga Yasushi, Urabe Masashi, Mizukami Hiroaki, Hagiwara Koichi, Kume Akihiro	4. 巻 29
2. 論文標題 AAV6-Mediated IL-10 Expression in the Lung Ameliorates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 1242 ~ 1251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/hum.2018.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sehara Yoshihide, Shimazaki Kuniko, Kurosaki Fumio, Kaneko Naoki, Uchibori Ryosuke, Urabe Masashi, Kawai Kensuke, Mizukami Hiroaki	4. 巻 682
2. 論文標題 Efficient transduction of adeno-associated virus vectors into gerbil hippocampus with an appropriate combination of viral capsids and promoters	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 27 ~ 31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2018.06.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sehara Yoshihide, Inaba Toshiki, Urabe Takao, Kurosaki Fumio, Urabe Masashi, Kaneko Naoki, Shimazaki Kuniko, Kawai Kensuke, Mizukami Hiroaki	4. 巻 48
2. 論文標題 Survivin overexpression via adeno-associated virus vector Rh10 ameliorates ischemic damage after middle cerebral artery occlusion in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3466 ~ 3476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.14169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 黒崎史朗、内堀亮介、瀬原吉英、水上浩明、萩原弘一、久米晃啓
2. 発表標題 プレオマイシン誘発肺線維症におけるIL-10発現AAVベクターの線維化抑制効果
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒崎史朗、内堀亮介、間藤尚子、水上浩明、萩原弘一、久米晃啓
2. 発表標題 アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる呼吸器細胞への最適な遺伝子導入法
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒崎史朗、横須賀響子、野村由至、梅津貴史、沼尾利郎
2. 発表標題 二度の気管支鏡検査で診断に至ったサルコイドーシスに器質化肺炎を合併した一例
3. 学会等名 第41回日本呼吸器内視鏡学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------