

平成22年5月7日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590896

研究課題名（和文）難治性呼吸器疾患に対して RNA 干渉の治療応用を試みる基礎的研究

研究課題名（英文）Application of RNA interference for therapeutic approach to refractory respiratory diseases

研究代表者

服部 登（HATTORI NOBORU）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00283169

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、難治性呼吸器疾患の治療の一手段に、small interfering RNA (siRNA) を応用できるかどうかを検証することであった。難治性呼吸器疾患として、肺線維症、リモデリングを伴う気管支喘息、肺癌の3つを想定し、それぞれの疾患の動物モデルに必要な Green fluorescence protein (GFP) を恒常的に発現している GFP トランスジェニックマウスを繁殖・維持と、GFP を恒常的に過剰発現する Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞 (GFP-LLC 細胞) の作製に成功した。実際にキーエンス社製の Biozero 蛍光顕微鏡を用いて、GFP トランスジェニックマウスの肺組織及び GFP-LLC 細胞による腫瘍組織の蛍光を極めて鮮明に映し出すことが可能であった。そこで、GFP に対する siRNA (GFP-siRNA) を合成し、GFP トランスジェニックマウス及び GFP-LLC 細胞による肺腫瘍を保持するマウスに対して、GFP-siRNA を経気道投与し、Biozero 蛍光顕微鏡にて観察したが、残念ながら蛍光の抑制は認められなかった。siRNA の使用量が少なすぎた可能性があり、今後の検討課題となった。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we tried to determine whether intratracheal administration of siRNA against green fluorescence protein (GFP) could inhibit gene expression of GFP in the lungs of GFP-transgenic mouse or in the lung tumor which was generated by the intrathoracic inoculation of Lewis lung adenocarcinoma (LLC) cells over-expressing GFP (GFP-LLC). To detect fluorescence from GFP in the lung, Biozero fluorescence microscope (Keyence, Osaka, Japan) was used. The strong fluorescence signals were observed both in the lung of GFP transgenic mice and in the lung tumor consisting of GFP-LLC cells. However, intratracheal administration of siRNA against GFP did not inhibit the degree of fluorescence signal. The amount of siRNA used in the study might be insufficient.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：RNA干渉, 肺線維症, 肺癌, 気管支喘息, GFP

## 1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉とは、細胞内に産生される small interfering RNA (siRNA) が、対応する mRNA を認識して分解し、蛋白質への翻訳を阻害することによって、遺伝子発現を抑制する機構である。現在、この siRNA を、特定の遺伝子機能を抑制することで疾患治療に応用する、いわゆる核酸医薬として使用できないかをみる研究が進められているが、問題となっているのは、病変局所にどうやって siRNA をデリバリーするかということである。このデリバリーの問題を考慮した際、経気道的に直接病変部位へ到達することが可能な呼吸器疾患を siRNA 導入のターゲットとすることは非常に合理的なアプローチである。実際過去に、siRNA を直接あるいは siRNA をコードするアデノウィルスベクターを、マウスに対して経気道的投与を行った実験結果が報告されているが、これらの方法を用いることにより、気道から肺胞領域にかけて、siRNA を細胞内に導入することは可能であることは示されている。しかしながら、siRNA は一体どの細胞に導入されているのか、さらに呼吸器疾患に応用した場合、経気道的アプローチにより、本当に病変部位における標的遺伝子のノックダウンが可能であるのかについての検討はほとんどなされていない。特に、我々が対象疾患として考えている肺線維症、リモデリングを伴う気管支喘息、原発性肺癌といった難治性呼吸器疾患に対する応用はほぼ皆無である。この現状を踏まえて、今回我々は、siRNA の経気道的投与により、気道から肺胞領域に至るどの細胞における遺伝子ノックダウンが可能であるのか、さらに、上に挙げた肺線維症、リモデリングを伴う気管支喘息、肺癌の難治性呼吸器疾患の動物モデルを作

製した上で、siRNA を経気道的に導入した場合、病変のどの領域、どの細胞における遺伝子ノックダウンが可能であるのかを検討する研究を提案した。

## 2. 研究の目的

GFP を発現することで蛍光を発するマウスあるいは細胞を用いて、肺線維症、リモデリングを伴う気管支喘息、肺癌といった難治性肺疾患モデルマウスを作製し、これらのモデルマウスへの GFP に対する siRNA を経気道投与することで、GFP の発現が抑制されるのかを検証する。さらに、抑制が認められた場合には、その部位の確認も行う。

## 3. 研究の方法

### A) GFP-LLC 細胞の構築

Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞に対して、GFP の発現プラスミド (pEGFP) をトランスフェクションし、ハイグロマイシンにより GFP 恒常発現細胞を選別する。この GFP 恒常発現細胞の中から、フローサイトメーターを用いて GFP 高発現細胞をソーティングし、さらにその細胞群から限界希釈法により GFP 高発現株を確立する。

### B) GFP に対する siRNA の構築

GFP 発現を有効に抑制する siRNA の塩基配列は、既にいくつかの論文にて発表されている。これらの配列を用いて、siRNA の合成を業者に委託する。3種類程度の siRNA 合成を計画している。

### C) GFP-LLC 細胞における siRNA による GFP 発現抑制の確認

合成した GFP に対する siRNA を、GFP-LLC 細胞に導入試薬を用いてトランスフェクシ

ンし、どの配列の siRNA が GFP ノックダウンに有効であるかを検証する。この検証には、蛍光顕微鏡による観察のほか、フローサイトメーターによる定量も行う。

D) GFP-LLC 細胞を用いた同所移植肺癌モデルの作製

GFP-LLC 細胞をマウス肺へ同所性移植を行って、原発性肺癌のモデルを作製する。GFP-LLC 細胞をマトリジェルと混合させて、C57BL/6 マウス肺へ注入し、腫瘍細胞の移植を行う。

E) GFP-LLC 細胞を用いた同所移植肺癌モデルにおける GFP 発現の抑制

GFP-LLC 細胞を用いた同所移植モデルへ、GFP に対する siRNA の経気道的投与を行い、Biozero 蛍光顕微鏡にて蛍光の程度を解析を行う。

E) GFP トランスジェニックマウス準備

このマウスは現在業者から購入可能であるので、購入後、広島大学動物実験施設にて維持する。

F) GFP トランスジェニックマウスの肺における GFP 発現の抑制

GFP に対する siRNA を、GFP トランスジェニックマウスに対して、経気道的に投与する。その後、Biozero 蛍光顕微鏡にて蛍光の程度の解析を行う。

#### 4. 研究成果

A) GFP-LLC 細胞の確立

研究の方法にて述べた手法を用いて、GFP-LLC 細胞の樹立に成功した。

B) GFP に対する siRNA の作製

GFP に対する siRNA については、Ambion 社からノックダウン確認済みの *Silencer*® GFP siRNA を購入することとした。この配列については、開示されていない。

C) GFP-LLC 細胞を用いた同所肺移植肺癌モデルの確立

通常の LLC 細胞及び GFP-LLC 細胞を C57BL/6 マウス肺へ注入し、腫瘍細胞の移植を行った。

図 1 通常の LLC 細胞の移植モデル

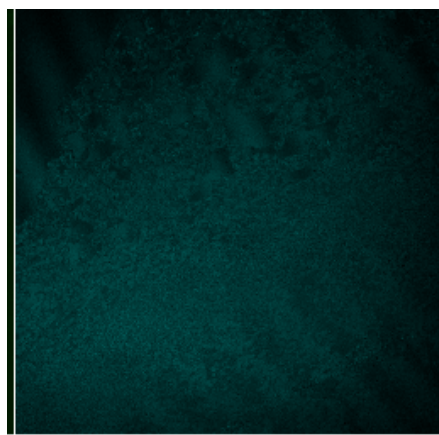


図 2 GFP-LLC 細胞の移植モデル

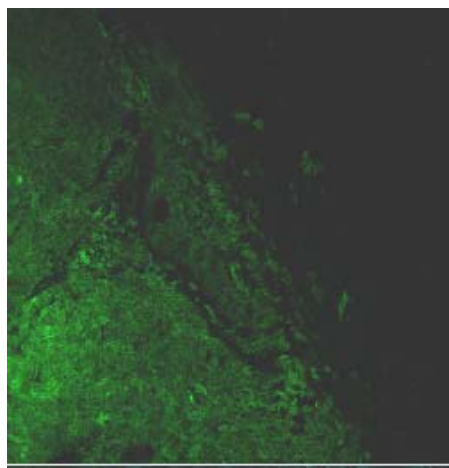


図 1 ではほぼ蛍光を認めないが、図 2 に示すように、GFP-LLC 細胞の移植モデルでは、明らかに蛍光の認められる腫瘍組織が正常肺ときっちり分離される形で認められた。

D) GFP に対する siRNA 投与

GFP-LLC 細胞を用いて、同所肺移植肺癌モデ

ルを作製した後、*Silencer*<sup>®</sup> GFP siRNA を経気道的に投与した。

図3 *Silencer*<sup>®</sup> GFP siRNA 投与後の腫瘍辺縁部

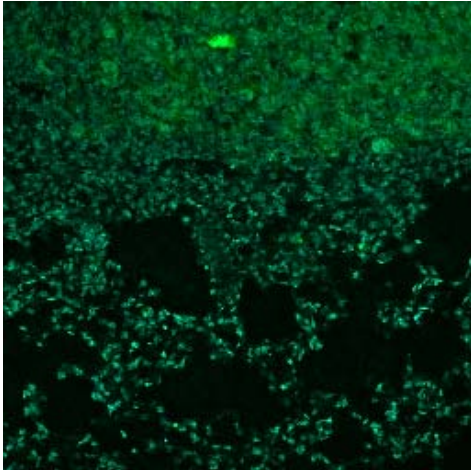


図3に示すように、辺縁部の蛍光が若干変化しているようにも見えるが、これははっきりと確認できるものではなかった。

D)GFP トランスジェニックマウスにおける蛍光の確認

図4 GFP トランスジェニックマウスの肺組織の蛍光

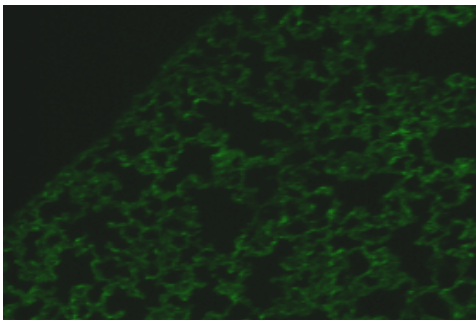


図4に示すように、GFP トランスジェニックマウスでの肺組織ではGFPの発する蛍光を観察できたが、同条件での観察では正常マウスの肺組織では全く蛍光を検出できなかった。

E)GFP に対する siRNA 経気道投与による蛍光の変化

残念ながら、今回の観察では、GFP に対する siRNA の経気道投与後に大きな蛍光の変化を認めなかった。これは、siRNA の投与量が少なすぎた可能性が考えられる。siRNA の合成は高額なため、今回充当された研究費ではこれ以上の合成を行うことが出来ず今後の課題となった。

#### 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] (15件)

1. Kimura T, Yokoyama A, Kohno N, Nakamura H, Eboshida A. Perceived stress, severity of asthma, and quality of life in young adults with asthma. *Allergol Int* (査読有) 58: 2009: 71-79.
2. Onari Y, Yokoyama A, Haruta Y, Nakashima T, Iwamoto H, Hattori N, Kohno N. IL-12p40 is essential for the down-regulation of airway hyperresponsiveness in a mouse model of bronchial asthma with prolonged antigen exposure. *Clin Exp Allergy* (査読有) 39; 2009: 290-298.
3. Iwamoto H, Yokoyama A, Kitahara Y, Ishikawa N, Haruta Y, Yamane K, Hattori N, Hara H, Kohno N. Airflow limitation in smokers is associated with subclinical atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* (査読有) 179; 2009: 35-40.
4. Furonaka M, Hattori N, Tanimoto T, Senoo T, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Yokoyama A, Kohno N. Suplatast tosilate prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* (査読有) 328; 2009: 55-61.
5. Nakashima T, Yokoyama A, Onari Y, Shoda H, Haruta Y, Hattori N, Naka T, Kohno N. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits pulmonary inflammation and fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* (査読有) 121; 2008:1269-1276.

6. Kanehara M, Yokoyama A, Tomoda Y, Shiota N, Iwamoto H, Ishikawa N, Taooka Y, Haruta Y, Hattori N, Kohno N. Anti-inflammatory effects and clinical efficacy of theophylline and tulobuterol in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther* (査読有) 21; 2008: 874-878.
7. Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, Tanaka S, Nishino R, Yoshioka K, Ohshimo S, Fujitaka K, Ohnishi H, Hamada H, Arihiro K, Kohno N. Usefulness of monitoring the circulating Krebs von den Lungen-6 levels to predict the clinical outcome of patients with advanced nonsmall cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Int J Cancer* (査読有) 122; 2008: 2612-2620.
8. Nakashima T, Yokoyama A, Ohnishi H, Hamada H, Ishikawa N, Haruta Y, Hattori N, Tanigawa K, Kohno N. Circulating KL-6/MUC1 as an independent predictor for disseminated intravascular coagulation in acute respiratory distress syndrome. *J Intern Med* (査読有) 263; 2008:432-439.
9. Ishikawa N, Takano A, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Ito H, Miyagi Y, Nakayama H, Fujita M, Hosokawa M, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y, Daigo Y. Cancer-testis antigen lymphocyte antigen 6 complex locus K is a serologic biomarker and a therapeutic target for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res* (査読有) 1567; 2007:11601-11611.
10. Taniwaki M, Takano A, Ishikawa N, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y, Daigo Y. Activation of KIF4A as a prognostic biomarker and therapeutic target for lung cancer. *Clin Cancer Res* (査読有) 13(22 Pt 1); 2007: 6624-6631.
11. Sakurai J, Hattori N, Nakajima M, Moriya T, Suzuki T, Yokoyama A, Kohno N. Differential expression of the glycosylated forms of MUC1 during lung development. *Eur J Histochem* (査読有) 51; 2007: 95-102.
12. Takeda T, Hattori N, Tokuhara T, Nishimura Y, Yokoyama M, Miyake M. Adenoviral transduction of MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 inhibits lymph node

metastasis in orthotopic lung cancer model. *Cancer Res* (査読有)67; 2007: 1744-1749.

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

服部 登 (HATTORI NOBORU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00283169

(2)研究分担者

(3)連携研究者

横山 彰仁 (YOKOYAMA AKIHITO)

高知大学・医学部・教授

研究者番号：30191513

(H19:研究分担者)

石川 暢久 (ISHIKAWA NOBUHISA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90423368

(H19:研究分担者)