

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19790386

研究課題名（和文） カクテル siRNA 気管内投与による間質性肺炎治療の基礎研究

研究課題名（英文） Basic research of cocktail-siRNA treatment for interstitial pneumonia using intratracheal spray

研究代表者

河野 雅之（KOHNO MASAYUKI）

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00437203

研究成果の概要：

間質性肺炎治療のために、炎症、線維化に関わる IL-13 受容体（IL13R₂）と TGF- β 1 発現を抑制するラット small interfering RNA (siRNA) を設計した。siRNA とその細胞導入効率を高める atelocollagen を混合し、病態モデルラットに肺噴霧投与したところ、炎症、線維化が抑制された。また培養細胞で mRNA 抑制効果を有する IL13R₂ のヒト・ラット共通配列 siRNA の設計に成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	
2008 年度	900,000	270,000	
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：薬物治療学、siRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 間質性肺炎は肺の間質組織を主病変とする炎症系疾患の総称である。間質性肺炎の明らかになっている原因は感染、薬剤、放射線、膠原病、血管炎等である。しかしその代表的な疾患である特発性間質性肺炎は原因が未知で特定疾患に指定されており予後が不良である。炎症の進展に伴い高度に線維化され慢性かつ進行性の経過をたどり呼吸不全をきたすこともあり治療が困難である。線維化は肺のみならず、肝、腎等でもおこり、線維化には transforming growth factor beta (TGF- β)、炎症性サイトカインなど多くの

メディエーターが発症に関与していると考えられる。現在は主にステロイド治療がなされているが不十分であり、遺伝子治療などの新たな試みもはじまっている。

(2) 近年非常に注目されている RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) は二本鎖 RNA によって遺伝子サイレンシングが起こる現象である。この現象はヒトでもみられ、抗ウイルス作用等の免疫反応と考えられている。RNAi 法は二本鎖の短い small interfering RNA (siRNA) が細胞質に取り込まれることにより、特定遺伝子のサイレンシングが起こる。従来のオリゴ DNA を用いたアンチセン

手法に比較してより低濃度で遺伝子抑制効果を示す。RNA は分解しやすいが、化学修飾等により血中安定性が格段に高められた。siRNA を全身的に静脈内または腹腔内投与すると、肝臓、肺等の一部の組織では遺伝子サイレンシング効果がみられる。siRNA は多くの組織及びその細胞内に取り込まれにくいいため、siRNA を安定に患部まで送達させる優れた DDS(Drug Delivery system)が必要であり、全身投与では量も必要である。DDSはいまだ開発途上ではあるが、局所投与等では遺伝子抑制効果が示されてきている。この RNAi 技術は創薬化がすでにいくつかの領域で進んでいる。具体的には、眼の疾患に対する局所療法の開発が進んでおり、癌領域では動物実験レベルで腫瘍縮小効果が認められている。現在臨床応用が進んでいる抗体蛋白製剤は製造にコストがかかり、RNAi-drug に期待がかかっている。

2. 研究の目的

本研究では気管内投与により少量の siRNA をプレオマイシン誘発肺線維化モデルマウスの肺患部にピンポイント送達させ、肺線維化の抑制効果を検討する。従来の気道を切開して液体を気管へ滴下させる方法では肺全体に薬液を行きわたらず、かつ複数回投与/切開することは動物愛護の観点から避けるべきである。そこでマウス用気管内投与噴霧スプレーを使うことによりマウスへの負荷を最小限にとどめ、かつ滴下方式に比べ肺全体に薬液を行きわたらせることが可能である(下図)。分子ターゲットとしては線維化に深く関与している TGF- β 1、炎症性サイトカインの IL-1、TNF- α 、IL-6 及びそれぞれの受容体を候補とする。線維化抑制効果の高い分子ターゲットの siRNA をカクテル化して効果増強を図る。さらに臨床応用へ向けて用法・用量を確定して至適なレジメンを提示する。その後の創薬開発としてのアウトプットについては学内外の協力者とともに欧米なみの開発への道筋をつけ、産官学連携の礎を築きたいと考えている。

3. 研究の方法

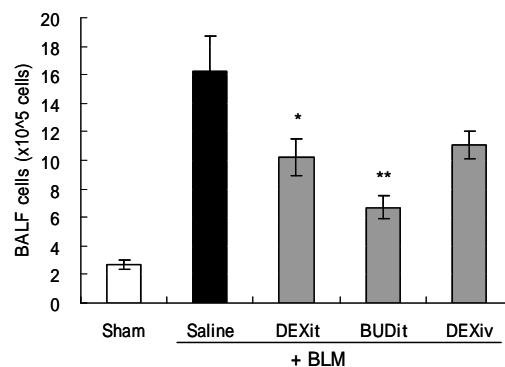
(1) 肺線維化モデルラット評価系構築のために、肺線維化誘発剤の bleomycin をラットの気管内に投与した。ラット(8週齢)に bleomycin (5 mg/kg) をラット用噴霧スプレー(Penn century 社製)で気管から肺へ投与し、間質性肺炎を発症させた。体重測定/経過観察を行い、bleomycin 投与から1または3週間後に肺胞洗浄し、解剖後、肺等の臓器重量測定、肺組織を摘出し、生化学的、病理学的検討等により肺線維化抑制効果及びステロイド等による全身毒性の影響をみるために脾臓、胸腺重量を評価した。

(2) in vitro での siRNA 遺伝子抑制効果確認としては、分子ターゲットとしては線維化に深く関与している TGF- β 1、IL-13 及びその受容体等を候補とした siRNA を設計した。ヒト及びラットマクロファージ細胞株等への遺伝子のサイレンシング効果を realtimePCR 法により評価した。

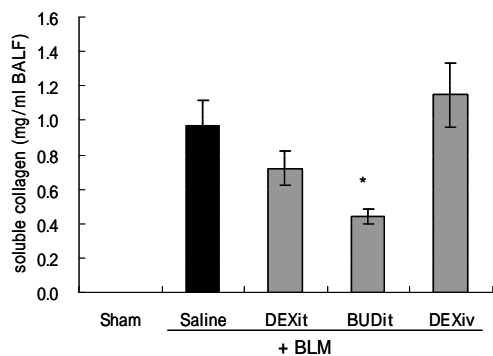
4. 研究成果

(1) 間質性肺炎疾患モデルを用いたステロイド評価研究

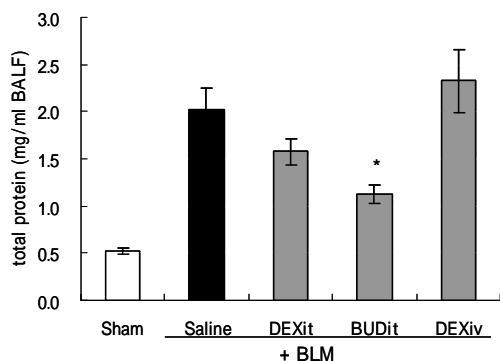
全身投与との比較による肺局所投与に相応しい薬剤として siRNA を有力候補としているが、まず間質性肺炎治療に現在多用されるステロイドの肺局所噴霧投与について bleomycin(BLM)誘発肺線維化ラットモデルにて評価した。血中で長期安定な dexamethasone(DEX)と投与部位特異的な有効性を示す antedrug の budesonide(BUD)との有効性と毒性発現のバランスを比較検討した。SD ラット(雌、9週齢)に bleomycin (5mg/kg)を肺局所噴霧投与し、その翌日から1日おきに3回、budesonide または dexamethasone を0.2mg/kgとして肺局所噴霧投与(it)した。bleomycin 投与から1週間後に解剖して肺重量、肺胞洗浄等を実施し、生化学的、病理学的検討等により肺線維化抑制効果及びステロイドによる影響をみるために脾臓、胸腺重量を評価した。炎症及び線維化に対する抑制効果は dexamethasone よりも budesonide の方が良好であり(図1) 体重、脾臓、胸腺重量の低下が dexamethasone 投与群のみに顕著にみられた(図2)、budesonide 肺噴霧により肺局所限定的な薬効(図1)及びその動態(図3)が認められステロイド性の全身毒性効果が抑えられ、肺噴霧治療によるリスク/ベネフィットバランス向上が示された。



肺胞洗浄液中細胞数(図1a)



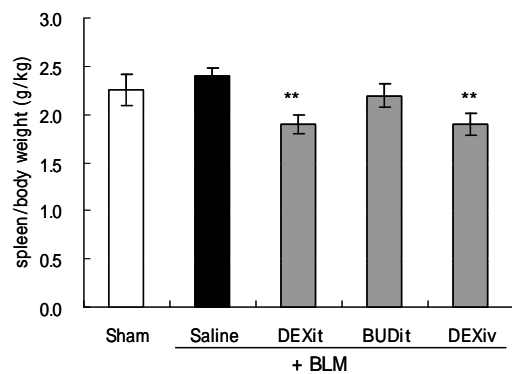
可溶性コラーゲン (図 1b)



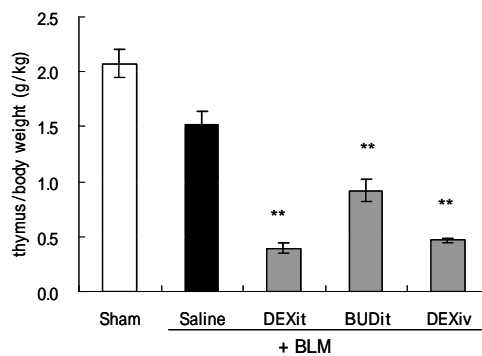
総蛋白量 (肺胞洗浄液, 図 1c)

it: 肺噴霧, iv: 静脈内投与,
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Sham

図 1. budesonide と dexamethasone の抗炎症・抗線維化効果比較



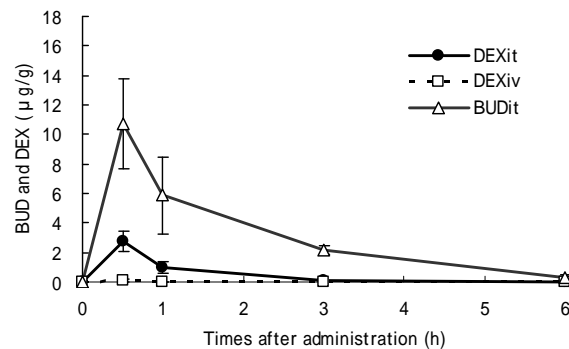
脾臓重量 (図 2a)



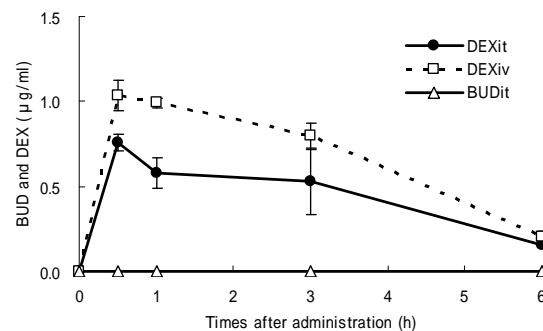
胸腺重量 (図 2b)

it: 肺噴霧, iv: 静脈内投与, ** $p < 0.01$ vs. Sham

図 2. budesonide と dexamethasone の全身毒性発現比較



肺中のステロイド経時的滞留 (図 3a)



血中のステロイド経時的滞留 (図 3b)

it: 気管内投与, iv: 静脈内投与

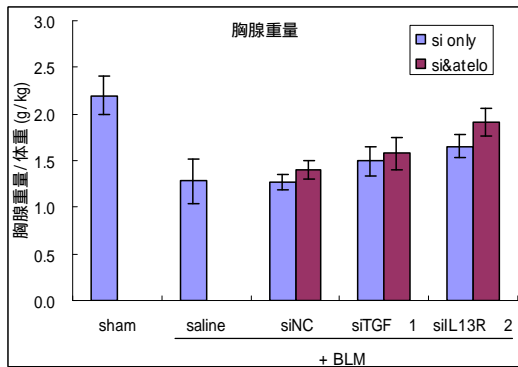
図 3. 肺及び血中における budesonide と dexamethasone の経時的滞留量比較

(2)新規肺線維化抑制 siRNA の評価

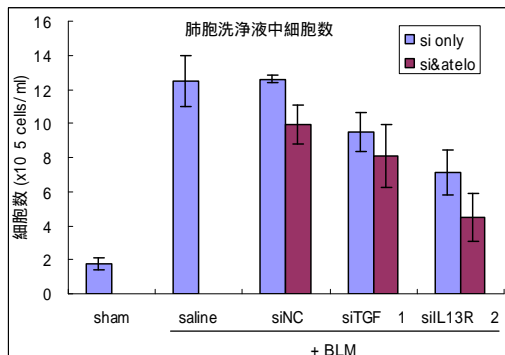
TGF- 1、IL-13 受容体 2 種類 (IL13R 1、2) を標的とした siRNA (ラット配列) を設計し、ラット培養細胞における mRNA 抑制効果を確認した。この 3 種類の siRNA について bleomycin 誘発肺線維化ラットモデルにて有効性及び毒性を評価した。

SD ラット (雌、9 週齢) に bleomycin (5mg/kg) を肺局所噴霧投与し、その翌日から 1 日おきに 3 回、それぞれの siRNA を 30 μg / 100 μL として肺へ局所噴霧投与した。3 種類の siRNA とともに肺での炎症及び線維化の抑制効果がありみられなかったが、siRNA の細胞導入効率を高める DDS である atelocollagen との併用により、TGF- 1 及び IL13R 2 の siRNA 投与群において、炎症抑制及び線維化抑制効果が示されかつ特段の毒性もみられなかった (図 4)。

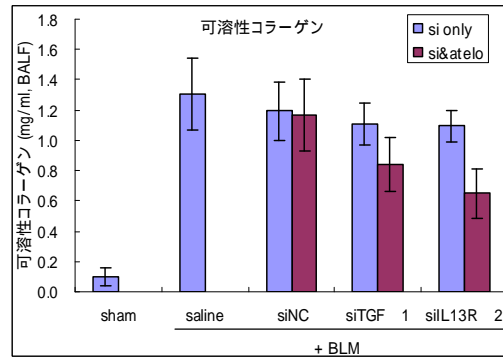
有効性の高かった IL13R 2 について、ヒトとラットとの共通配列 siRNA を 4 種類設計し、ヒトとラットの IL13R 2 高発現培養細胞でのサイレンシング効果を評価したところ、3 種類の配列でヒトとラットの両方に十分な mRNA 抑制効果を確認できた (図 5)。



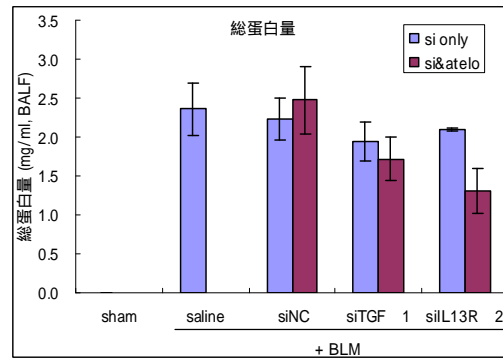
胸腺重量 (図 4a)



肺胞洗浄液中細胞数 (図 4b)



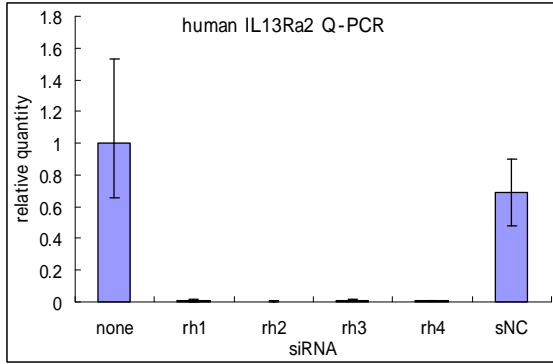
可溶性コラーゲン (図 4c)



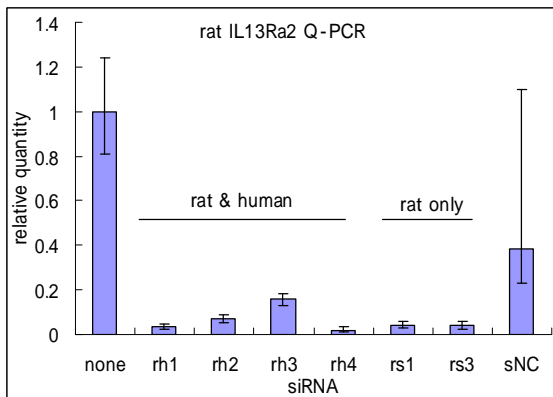
総蛋白量 (図 4d)

siNC: negative control 配列の siRNA

図 4. siRNA と atelocollagen との併用による肺線維化モデル動物への効果比較



ヒト細胞株での siRNA サイレンシング効果 (図 5a)



ラット細胞株での siRNA サイレンシング効果 (図 5b)

図 5. ヒト・ラット共通配列の IL13R 2-siRNA のサイレンシング効果

(3) まとめ、今後の展望

肺噴霧に相応しい薬の薬理学的プロファイルを明確にし、siRNA 新規治療薬について

は IL13R 2 及び TGF- 1 に対する siRNA を atelocollagen との混合により動物実験で有効性を示し、臨床応用化へ向けたヒト・ラット共通配列 IL13R 2-siRNA の in vitro サイレンシング効果を示した。今後この共通配列 siRNA について肺線維化モデルにおける薬効を確認次第、特許申請を進める予定である。

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)

Kohno M, Haramoto M, Nakajima O, Yang L, Hinotsu S, Yokohira M, Imaida K, Kawakami K. Aerosolized budesonide attenuates lung fibrosis with minimal adverse effects.

Eur Respir J (現在論文投稿中)

[雑誌論文] (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

河野 雅之 (KOHNO MASAYUKI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 00437203

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :