

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17425

研究課題名(和文)免疫細胞指向性DDSを用いた肺線維症の核酸治療開発

研究課題名(英文) Development of nucleic acid medicine for lung fibrosis using DDS directing to immune cells

研究代表者

武田 和 (Takeda, Takashi)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：20781793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：特発性肺線維症は予後不良な指定難病である。病巣部の樹状細胞を起点として炎症のカスケードが活性化し、慢性的な炎症に伴い線維化が進展する。マウスにブレオマイシンを静脈内投与し、肺線維症モデルを作成した。線維化を起こした肺病巣部からフローサイトメトリーによって樹状細胞を採取し、その遺伝子発現(mRNA)とmicroRNA発現をRNAシーケンスで調べた。その分析から肺線維症の進展に重要であるCD80とCD86のmRNA発現を抑制するmicroRNAを2種同定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症は、指定難病である特発性間質性肺炎の一つで予後不良であり、樹状細胞などの免疫細胞が病態形成に重要な役割を果たすことが示されているが、画期的な治療法がないのが現状である。本研究では、マウス肺線維症モデルを用いて病巣部に存在する樹状細胞を採取して精査し、どのような遺伝子発現変化を起こしているか、あるいはそれを制御するmicroRNAについての詳細なデータが取得できた。その中の2種のmicroRNAは、今後、肺線維症の治療剤となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis is a condition in which lung becomes scarred and breathing becomes gradually difficult. Its prognosis is poor and specified as an intractable disease. One of the mechanisms is attributed to tissue fibrosis caused by sustained inflammation in which dendritic cells play a primitive role as a control tower initiating inflammatory cascade. In this study we produced the lung fibrosis model in mice by administration of bleomycin and collected tissue dendritic cells in the fibrotic lesion of lung by a flow cytometer. RNA sequencing revealed many changes in mRNA and microRNA in dendritic cells of lung fibrosis as compared to those in normal control lung. Among them, increase were mRNA levels of CD80 and CD86 which are supposed to play a role to cause inflammation and lead to lung fibrosis. Among altered microRNA, two were found to be at low level in dendritic cells of lung fibrosis and they suppressed CD80 and CD86 levels in mouse macrophage cells.

研究分野：3次元ゲノム構造、免疫療法

キーワード：肺線維症 microRNA 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症は、指定難病である特発性間質性肺炎の一つで予後不良であり、近年2つの抗線維化剤がわが国で保険償還されたが、その効果は軽微な疾患進行の抑制にとどまり、全生存期間延長をもたらす画期的な治療法がないのが現状である。肺線維症は病巣部の慢性的な炎症の持続とそれに伴う線維化がその本態である。病巣部に樹状細胞が集積し、これによりナイーブT細胞の活性化を起点とする炎症のカスケードが活性化し、肺組織の線維化が生じると考えられている。肺線維症の病態には制御性T細胞(Treg)が関与するとの報告もみられる。私達が開発したドラッグデリバリーシステム(DDS)である(スーパーアパタイト:sCA)は、マウス大腸炎モデルにおいて、炎症腸管に存在する樹状細胞に効率よく核酸を送達すること、樹状細胞はナイーブT細胞を炎症性T細胞に変化させる司令塔として働くため、miR-29a/bを樹状細胞に送達することで、下流の炎症性T細胞の活性化を阻害し、腸炎の予防・治療に有用であることを報告している。今回sCAに人工核酸であるMIRTXを搭載し、マウスに静注して肺線維症の病巣内の免疫細胞への取り込みを分析したところ、樹状細胞や制御性T細胞に効率的に核酸が送達されることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、マウス肺線維症モデルを用いて樹状細胞によるナイーブT細胞から炎症性T細胞の活性化を抑制する、あるいは制御性T細胞の活性をコントロールする核酸医薬を同定し、肺線維症に対する画期的な核酸治療の実現を目指す。

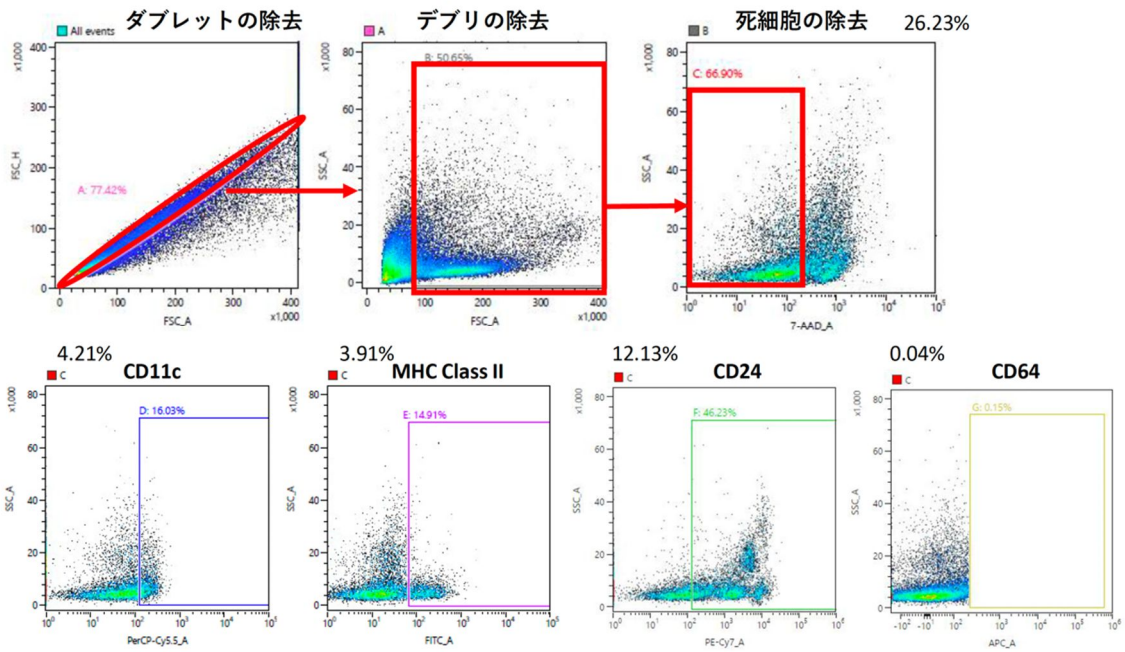
3. 研究の方法

(1)肺線維症の発症過程に樹状細胞において発現が変化する遺伝子、microRNA(miRNA)の同定:肺線維症マウスの肺組織から樹状細胞だけを単離しRNAを抽出後、mRNA-seqおよびmicroRNA-seqを行う。シーケンス結果の解析を行い、肺線維症の発症過程で発現が変化する樹状細胞内の遺伝子、microRNAを同定する。(2)樹状細胞を標的とした治療的miRNA候補の選定:以下の流れで治療的miRNA候補を選定する。シーケンス解析の結果からリストアップされた遺伝子、miRNAに対し、TargetScan(miRNAの結合予測)やIPA(Ingenuity Pathways Analysis:パスウェイ解析)といったin silico解析を行い、肺線維症の発症過程において、樹状細胞によるナイーブT細胞活性化を抑制する可能性のあるmicroRNA候補を選定する。先ず簡便なマウスマクロファージ細胞株J774A.1細胞を用いた実験を行う。で選定したmiRNAを作用させ、発現が変化する想定される分子、シグナル経路の動きを検討し、治療的miRNA候補を絞り込む。その後、樹状細胞やマウスモデルを用いて検証する。

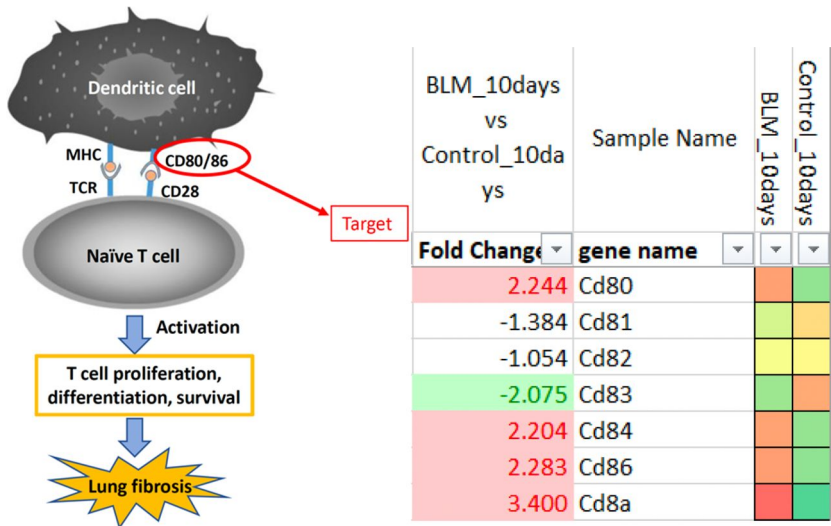
4. 研究成果

ICRマウスにプレオマイシンを静注(80mg/kg; day 0とday 3の2回)して肺線維症モデルマウスを作成した。プレオマイシン投与後10日目に肺組織の線維化の程度をエラスチカ・ファン・ギーソン(EVG)染色で検討したところ、HEで線維化とみられる部位に膠原線維の沈着が認められ線維化が形成されていることを確認した。

線維化を起こしたマウスの肺組織、および無処理のコントロールマウスの肺組織から、フローサイトメーターでノイズとなるシグナルを除去した後に、CD11c+MHCII+CD24+CD64-の分画を集めることで樹状細胞を採取した。



コントロールマウスと肺線維症モデルマウスの肺組織より day10 で樹状細胞を単離し、RNA-seq を実施し両者の mRNA 発現の違いを調べたところ、肺線維症の樹状細胞においてナイーブ T 細胞 活性化の補助刺激分子である CD80, CD86 の発現がそれぞれ 2.24 倍、2.28 倍上昇していることが明らかとなった。



さらに単離した樹状細胞サンプルに対し、microRNA-seq を実施し、肺線維症の樹状細胞において発現が低下している microRNA を同定した。それらの中から、CD80, CD86 を標的としうる microRNA を in silico 解析によって絞り込んだ。

すなわち、肺線維症で発現量が 1.5 倍以上下がっているマウス microRNA を絞る。

Targets can でマウス CD80, CD86 に結合するマウス microRNA を検索する。このうちヒトとマウスで共通する microRNA に絞り込む。以上の候補 microRNA は全部で 12 個あり、うち 6 個は let-7 family members と miR-139 など既に報告されているものであったことから、この方法論は正しいことが示唆される。残りの 6 個の microRNA が新規の治療剤としての候補となる。

In vitro 実験で候補 microRNA の効果を検討するためにマウスマクロファージ細胞株である

J774A.1 細胞を用いて 予備実験を行った。J774A.1 細胞では炎症を惹起する LPS の添加がない状態で CD80 は 20%, CD86 は 100%の陽性率であった。しかし Negative control (NC)miR を導入しただけで CD80 は 95%陽性となり、6 個の候補 miR のうち 2 個の miR で 85%まで低下した。一方、CD86 を低減させる miR はなかった。CD80 を低下させた二つの miR は有望であるが、NC でも CD マーカーが高度に誘導されマクロファージ細胞が核酸自体を異物と認識する可能性があること、核酸導入剤(RNAimax)が刺激となっている可能性があることを踏まえ、マウス樹状細胞や sCA での核酸導入法を用いて検討を進めている。助成期間が 2 年間と短く最終的なゴールまでにはまだ時間を要するが、今後さらに研究費を獲得し、本研究のデータを足場に研究を完遂させるよう努めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------