

## 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 25 年 5 月 21 日現在

機関番号： 14101  
 研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2010 ~ 2012  
 課題番号： 22590859  
 研究課題名 (和文) siRNA による気道リモデリング制御方法の検討及び創薬の可能性の検討  
 研究課題名 (英文) siRNA for the treatment of airway remodeling

研究代表者  
 小林 哲 (KOBAYASHI TETSU)  
 三重大学・医学部附属病院・講師  
 研究者番号： 20437114

研究成果の概要 (和文) : siRNA は難治性疾患に対する根本的治療法の開発ツールとして注目されている。我々は、ブレオマイシン肺線維症マウスモデルに対して種々の siRNA を作成し、経気道的に投与し、その病態抑制に成功した。さらにヒト化肺線維症マウスモデルの作成に成功し、それに対して、ヒトに対する siRNA を作成し、経気道的に投与しその病態制御をすることが出来た。今後、本法を用いた創薬に期待できる結果となった。

研究成果の概要 (英文) : SiRNA has been the focus of attention for its potential application for the development of new drugs. To evaluate the effect of intratracheal administration of siRNAs in murine disease models. Firstly, bleomycin was used for induction of lung fibrosis. After confirming the effectiveness of siRNA effect *in vitro*, siRNAs for several targets including TGF-beta1 were intratracheally administered by inhalation. Mice treated with scrambled siRNA or vehicle were used as controls. We generated a novel model of human TGF-beta1 transgenic mouse that spontaneously develops pulmonary fibrosis. Intrapulmonary delivery of aerosolized siRNAs of TGF-beta1 significantly inhibited bleomycin-induced pulmonary fibrosis. In addition, aerosolized siRNAs against human TGF-beta1 also inhibited spontaneous pulmonary fibrosis. These results suggest that intratracheal instillation of RNAi agents may be useful for the therapy of airway remodeling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：呼吸器内科学

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：肺線維症、siRNA、RNAi、TGF- $\beta$ 、リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 2006年にノーベル賞を授与された siRNA 技術は、研究ツールとしてだけでなく、その後の臨床応用を期待されたが、現段階で市場に薬剤として出てきたものはない。

## 2. 研究の目的

(1) RNAi (RNA 干渉) とは、ある遺伝子と相同なセンス鎖とアンチセンス鎖からなる 2 本鎖 RNA を導入することによって、その相補的な mRNA を分解し、目的遺伝子の発現のみを抑制する現象である。この RNAi という現象を用いて病態制御を試みる方法が世界中で開発されている。主には siRNA を用いて、今までの治療薬に反応しないような、特に難治性の疾患に対する治療の可能性を秘めた方法として脚光を浴びている。しかしながら、siRNA に関する基本特許は海外に先行され、日本における siRNA 創薬は根本的に困難な状況に陥っている。呼吸器科領域には COPD や肺線維症、肺癌などをはじめとして、生命を脅かす難治性疾患が数多く存在し、RNAi などの方法を用いた治療が可能となればその恩恵は計り知れない。呼吸器疾患領域において RNAi を用いた創薬を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) マウス肺線維症モデルにおいて人工的に合成された siRNA が経気道的に投与された場合の肺の線維化抑制の確認を行う。

①ブレオマイシン肺線維症マウスモデルの作製： osmotic pump を背部の皮下に埋め込み、pump 内にブレオマイシンを入れ持続的に薬剤を投与する。

② siRNA による肺組織線維化抑制効果の検討：線維化に関与すると考えられる TGF- $\beta$ , PDGF, MCP-1, CTGF などを含む因子に対する siRNA を数種類作製し別々に投与し比較する。siRNA の投与は day3, day7, day14 と全例気管挿管下にて投与し、day21 に sacrifice する。その際には BALF を施行し、その細胞分画、サイ

トカイン濃度などを測定する。さらに肺の摘出後、線維化指標である Ashcroft score を含めた組織学的評価を行う。

(2) siRNA のターゲット選択、投与濃度の調整、毒性評価を行う。

① Interferon 反応： siRNA 投与による interferon 反応の否定を行う。

② negative 及び target siRNA 投与による毒性： siRNA 投与に伴う組織変化、サイトカイン変化を検討。TLR の発現 (特に TLR3) に関しても検討を行う。

③ siRNA の off target の否定：

(3) トランスジェニックマウスの作製  
TGF を含む系がターゲットとして有力である。そこで、SP-C TGF  $\beta$  RecBAC 遺伝子 TG マウスの作製を行う。組換え BAC 型 SP-C TGF  $\beta$  発現ベクターを作製し、それをもとに、マウス肺における、ヒト TGF  $\beta$  発現亢進マウスを作製する。

(4) マウス肺における、ヒト TGF  $\beta$  発現亢進マウスを使用して、治療ターゲットとして選択したヒト配列の siRNA の効果を検討する。

## 4. 研究成果

(1) ブレオマイシン肺線維症マウスモデルにおいて、数種類の siRNA に関し、その線維化抑制を確認した。

(2) 中でも TGF- $\beta$  を選択しさらに検討を加えた。

(3) 選択した TGF- $\beta$  に対する siRNA に関して、副作用の検討を行った。Off target や TLR, IFN などに関して有意な副作用は認めなかった。

(3) ヒト臨床モデルに近づけるため、ヒト TGF- $\beta$  の全長 cDNA を使った TG マウスを作成し、自然発症の肺線維症モデルの作成に成功した。

(4) 上記ヒト化肺線維症マウスモデルを用い、ヒト TGF- $\beta$  に対する siRNA による肺線維症抑制に成功した。

上記成果は米国呼吸器学会雑誌に掲載された。(Am J Respir Cell Mol Biol. 46 (3) :397-406, 2012.)

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6件)

- 1: Hamasaki T, Suzuki H, Shirohzu H, Matsumoto T, D'Alessandro-Gabazza CN, Gil-Bernabe P, Boveda-Ruiz D, Naito M, Kobayashi T, Toda M, Mizutani T, Taguchi O, Morser J, Eguchi Y, Kuroda M, Ochiya T, Hayashi H, Gabazza EC, Ohgi T. Efficacy of a novel class of RNA interference therapeutic agents. *PLoS One*. 2012;7(8):e42655. doi: 10.1371/journal.pone.0042655. (査読あり)
- 2: Fujiwara A, Kobayashi H, Masuya M, Maruyama M, Nakamura S, Ibata H, Fujimoto H, Ohnishi M, Urawa M, Naito M, Takagi T, Kobayashi T, Gabazza EC, Takei Y, Taguchi O. Correlation between circulating fibrocytes, and activity and progression of interstitial lung diseases. *Respirology*. 2012 May;17(4):693-8. doi: 10.1111/j.1440-1843.2012.02167.x. (査読あり)
- 3: Fujiwara A, Taguchi O, Takagi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Boveda-Ruiz D, Toda M, Yasukawa A, Matsushima Y, Miyake Y, Kobayashi H, Kobayashi T, Gil-Bernabe P, Naito M, Yoshida M, Morser J, Takei Y, Gabazza EC. Role of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in allergic bronchial asthma. *Lung*. 2012 Apr;190(2):189-98. doi: 10.1007/s00408-011-9337-9. (査読あり)
- 4: D'Alessandro-Gabazza CN, Kobayashi T, Boveda-Ruiz D, Takagi T, Toda M,

- Gil-Bernabe P, Miyake Y, Yasukawa A, Matsuda Y, Suzuki N, Saito H, Yano Y, Fukuda A, Hasegawa T, Toyobuku H, Rennard SI, Wagner PD, Morser J, Takei Y, Taguchi O, Gabazza EC. Development and preclinical efficacy of novel transforming growth factor- $\beta$ 1 short interfering RNAs for pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 Mar;46(3):397-406. doi: 10.1165/rcmb.2011-01580C. (査読あり)
- 5: Takagi T, Taguchi O, Toda M, Ruiz DB, Bernabe PG, D'Alessandro-Gabazza CN, Miyake Y, Kobayashi T, Aoki S, Chiba F, Yano Y, Conway EM, Munesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Suzuki K, Takei Y, Morser J, Gabazza EC. Inhibition of allergic bronchial asthma by thrombomodulin is mediated by dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jan 1;183(1):31-42. doi: 10.1164/rccm.201001-01070C. (査読あり)
- 6: Maruyama T, Taguchi O, Niederman MS, Morser J, Kobayashi H, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza C, Nakayama S, Nishikubo K, Noguchi T, Takei Y, Gabazza EC. Efficacy of 23-valent pneumococcal vaccine in preventing pneumonia and improving survival in nursing home residents: double blind, randomised and placebo controlled trial. *BMJ*. 2010 Mar 8;340:c1004. doi: 10.1136/bmj.c1004. (査読あり)

[学会発表] (計4件)

三重大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：90197244

(1) 2012年10月6日臨床喘息研究会 第  
20回学術講演会(金沢)

演題名：気道リモデリング制御方法としての  
RNAi 創薬の試み

発表者：小林 哲

(2) 2012年7月21日第85回閉塞性肺疾  
患研究会(東京)

演題名：呼吸器疾患における RNAi を用いた  
治療の可能性

発表者：小林 哲

(3) 2012年1月28日第84回閉塞性肺疾  
患研究会(東京)

演題名：気道リモデリングにおけるメカニカ  
ルストレスの関与の検討

発表者：小林 哲

(4) 2011年11月19日臨床喘息研究会 第  
19回学術講演会(大阪)

演題名：気道リモデリングにおける ECM  
contraction および degradation の検討

発表者：小林 哲

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称：線維症予防又は治療剤

発明者：小林哲、ガバザ・エステバン

権利者：三重大学、大塚製薬

種類：特許

番号：特願2010-231946

出願年月日：2010年10月14日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 哲 (KOBAYASHI TETSU)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20437114

(2) 研究分担者

Gabazza Esteban (GABAZZA  
ESTEBAN)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00293770

田口 修 (TAGUCHI OSAMU)