

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590938

研究課題名(和文)糖鎖の制御によるクローン病狭窄症治療

研究課題名(英文) Treatment of intestinal fibrosis of Crohn disease by regulation of expression of glycan chains

研究代表者

鈴木 健司 (Suzuki, Kenji)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：00303123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はステリック再生医科学研究所と共同で、クローン病線維化原因遺伝子として糖硫酸転移酵素CHST15を明らかにし、この遺伝子発現を特異的に抑制するsiRNA医薬「STNM01」を作成した。本研究課題では糖鎖を標的としたRNA干渉医薬「STNM01」の作用機序として、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化の抑制と、コラーゲン産生の抑制がみられること、また同薬が慢性線維化腸炎において有効であることを示した。さらにヒトクローン病腸局所でもCHST15の発現増強がみられた。

研究成果の概要(英文)：We have revealed that the carbohydrate sulphotransferase CHST15 gene plays an important role in intestinal fibrosis in Crohn's disease, and developed a siRNA drug, STNM01, which selectively inhibits the expression of the gene, collaborating with the Stelic Institute of Regenerative Medicine, Tokyo.

In this study, we have revealed that this new siRNA drug inhibited the progression of fibroblasts into myofibroblasts, and decreased the collagen production by fibroblasts, and that STNM01 could ameliorate chronic fibrosing DSS colitis. Additionally, we have revealed the overexpression of CHST15 in the colon of patients with Crohn's disease, suggesting that CHS15 could be a promising target of the siRNA drug for the treatment of intestinal fibrosis in Crohn's disease.

研究分野：消化器内科学

キーワード：siRNA 線維化 糖鎖 クローン病 消化管狭窄

1. 研究開始当初の背景

クローン病は、若青年層に発症する原因不明の難治性炎症性腸疾患である。抗 TNF 製剤の登場により炎症・免疫制御に主眼をおいた新規治療法の開発が期待されているが、最大の合併症である消化管狭窄に関しては現時点で治療薬剤が存在せず、外科あるいは内視鏡的バルーン拡張術等の侵襲的な方法で対応せざるを得ないのが現状である。更には侵襲的治療によっても繰り返す再狭窄やそれに伴う手術を余儀なくされ、いわばクローン病治療の悪循環に陥ってしまい患者 QOL は著しく損なわれる。統計ではクローン病患者は 30 年間でその 70% が手術を受けるとされる。クローン病による腸管の炎症性線維化ならびに癒着性線維化により臨床的に腸管内腔の狭小化を呈する病態をクローン病腸狭窄症と定義すると、これは腸管局所への間葉系細胞の集積とコラーゲンの過剰蓄積が重要な病態と考えられる。特に線維芽細胞の活性化と筋線維芽細胞への分化が、間葉系細胞の集積およびコラーゲン産生の原因とみなされ、炎症性腸疾患における腸線維化・狭窄に対する新たな治療標的として注目されているが、有効な治療戦略の確立は未だ達成されていない。

一方で、炎症性腸疾患に対する特異的治療薬の歴史を振り返ってみると、各々の開発にはその当時の最新のノーベル賞の技術が応用されているのが特徴である。即ち、フレミングのペニシリンの発見による抗生剤の開発、ヘンチラによる副腎皮質ステロイドの発見・人工合成と臨床応用、エリオンらの代謝拮抗薬アザチオプリン/イムランの合成・臨床応用などである。また、現在炎症性腸疾患治療のチャンピオンドラッグとなっているレミケードなどの生物学的製剤が開発されるためには多くのノーベル受賞者が貢献した遺伝子工学の発展、特にケーラー・ミルスタインのモノクローナル抗体の発明が必要であった。このような学問・技術の発展と医薬開発の歴史に照らし合わせると、現在、新薬開発に決定的に重要な革新的技術として注目されているものがファイアとメローにより発見された siRNA を用いた RNA 干渉である。In vitro 実験や動物実験では目覚ましい疾患治療効果が期待されたが、2006 年の彼らのノーベル賞受賞から現在まで、この技術を用いた新薬が生み出されるにはいたっていない。この siRNA 医薬が臨床応用されない最大の要因はドラッグデリバリー技術と標的遺伝子の選択にあると考えられる。

我々はステリック再生医科学研究所と共同で、クローン病線維化原因遺伝子として糖硫酸転移酵素 CHST15 を明らかにし、ヒト CHST15 遺伝子の発現を特異的に抑制する siRNA 医薬「STNM01」を作成した。2009 年より 2011 年まで科研費、基盤研究(C)『クローン病狭窄症に対する RNA 干渉技術を用いた内視鏡治療法開発』の援助を得て、クロ

ン病腸狭窄症のモデルとして慢性 DSS 腸炎モデルを作成し、慢性 DSS 腸炎マウスに対する内視鏡的 STNM01 大腸粘膜下投与による線維化病変の治療効果を示した。この成果により STNM01 のクローン病狭窄症に対する国内第一相臨床試験への道が開けた。

2. 研究の目的

近年抗 TNF 製剤の導入によりクローン病に対する治療成績は格段に向上したが、手術原因の最大の合併症である腸管狭窄に対する有効な治療法は依然存在しない。我々はステリック再生医科学研究所と共同で、クローン病線維化原因遺伝子として糖硫酸転移酵素 CHST15 を明らかにし、ヒト CHST15 遺伝子の発現を特異的に抑制する siRNA 医薬「STNM01」を作成した。慢性 DSS 腸炎マウスに対する内視鏡的 STNM01 大腸粘膜下投与により線維化病変の治療効果がみられたが、その作用機序には不明な点が存在する。本研究ではクローン病患者の QOL を著しく損なう原因である腸管線維化に対して、糖鎖を標的とした RNA 干渉医薬「STNM01」の開発と作用機序解明を目的とする。

3. 研究の方法

CHST15 に対する siRNA 医薬 STNM01 の抗線維化作用機序の解明を目標として以下の方法で研究を実施した。

(1) マウス線維芽細胞とヒト線維芽細胞に対する抗 CHST15 siRNA による筋線維芽細胞への分化、およびコラーゲン産生に対する影響を解析する(in vitro 実験)。

組織線維化においては線維芽細胞の活性化と、筋線維芽細胞への分化が極めて重要なステップであり、培養系実験において抗 CHST15 siRNA の線維化抑制効果の確認とその発現機序を明らかにする。

(2) 抗 CHST15 siRNA 治療の慢性 DSS 腸炎マウス腸管に及ぼす抗線維化作用を、腸管局所の線維芽細胞および筋線維芽細胞に焦点を絞り、その機序を解析する(in vivo 実験)。

申請者らは線維芽細胞と筋線維芽細胞、および各々の活性化状態を腸管局所で明らかにする目的で vimentin、 α -SMA、PCNA に対する抗体を用いた多重蛍光抗体法を開発した(Pathol Int 2011, Suzuki *et al.*)。siRNA のこれら消化管線維化責任細胞に対する影響をこの蛍光抗体法と qRT-PCR、および Wester Blotting(WB)法を用いて解析する。

4. 研究成果

本研究課題では糖鎖を標的とした RNA 干渉医薬「STNM01」の作用機序として、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化の抑制と、コラーゲン産生の抑制がみられることを in vitro 実験により示すことができた。また同薬が慢性線維化腸炎において有効であることを我々の開発した慢性 DSS 腸炎に対する内視鏡的粘膜下注入実験を行い、in vivo においても

STNM01 が腸管線維化を抑制することを示し、この機序として STNM01 による腸管局所における線維芽細胞の活性化を抑制、筋線維芽細胞への分化を抑えることと、コラーゲン分子産生の抑制によることを明らかにした。さらにヒトクローン病腸局所でも CHST15 の発現増強がみられた。

以上より、STNM01 は線維性消化管狭窄症治療の標的である線維芽細胞および筋線維芽細胞に作用する新薬としての可能性が示唆され、本研究の成果は STNM01 のクローン病腸狭窄症に対する国内第一相臨床試験へつながることになった。

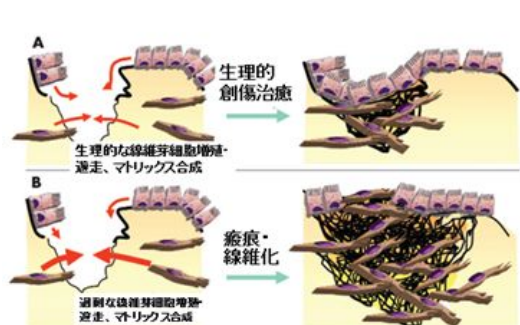


図2. 線維芽細胞・筋線維芽細胞は線維性消化管狭窄症治療の標的である。

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)

[雑誌論文](計 14 件)

Arumugam S, Sreedhar R, Thandavarayan RA, Giridharan VV, Karuppagounder V, Pichaimani V, Afrin MR, Miyashita S, Nomoto M, Harima M, Suzuki K, Watanabe K, Telmisartan treatment targets inflammatory cytokines to suppress the pathogenesis of acute colitis induced by dextran sulphate sodium. *Cytokine*, 査読有, 2015, 15:305-312.

Watanabe K, Arumugam S, Sreedhar R, Thandavarayan RA, Nakamura T, Nakamura M, Harima M, Yoneyama H, Suzuki K. Small interfering RNA therapy against carbohydrate sulfotransferase 15 inhibits cardiac remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. *Cell Signal*, 査読有, 2015, 15:1517-1524.

Thandavarayan RA, Giridharan VV, Arumugam S, Suzuki K, Ko KM, Krishnamurthy P, Watanabe K, Konishi T, Schisandrin B prevents doxorubicin induced cardiac dysfunction by modulation of DNA damage, oxidative stress and inflammation through inhibition of MAPK/p53 signaling. *PLoS One*, 査読有, 2015, 1-18.

Fujii M, Suzuki K, Suenaga S,

Wakatsuki M, Kushida Y, Touma M, Hosono M, Dominant trait linked to chromosome 1 in DBA/2 mice for the resistance to autoimmune gastritis appears in bone marrow cells. *Exp Anim*, 査読有, 2014, 63:155-167.

Gounder VK, Arumugam S, Arozal W, Thandavarayan R, Pitchaimani V, Harima M, Suzuki K, Nomoto M, Watanabe K, Olmesartan protects against oxidative stress possibly through the Nrf2 signaling pathway and inhibits inflammation in dauronorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Int Immunopharm*, 査読有, 2014, 18:282-289.

Soetikono V, Sari FR, Lakshmanan AP, Arumugam S, Harima M, Suzuki K, Kawachi H, Watanabe K, Curcumin alleviates oxidative stress, inflammation, and renal fibrosis in remnant kidney through the Nrf2-keap 1 pathway. *Mol Nutr Food Res*, 査読有, 2013, 57:1649-59.

Arumugam S, Mito S, Thandavarayan RA, Ciridharan VV, Pitchaimani V, Karuppagounder V, Harima M, Nomoto M, Suzuki K, Watanabe K. Mulberry leaf diet protects against progression of experimental autoimmune myocarditis to dilated cardiomyopathy via modulation of oxidative stress and MAPK-mediated apoptosis. *Cardiovas Ther*, 査読有, 2013, 31:352-362.

Nagata M, Noman AA, Suzuki K, Kurita H, Ohnishi M, Ohyama T, Kitamura N, Kobayashi T, Uematsu K, Takahashi K, Kodama N, Kawase T, Hoshina H, Ikeda N, Shingaki S, Takagi R, ITGA3 and ITGB4 expression biomarkers estimate the risks of locoregional and hematogenous dissemination of oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 査読有, 2013, 13:1-9.

Fujii M, Shibasaki Y, Wakamatsu K, Honda Y, Suzuki K, Arumugam S, Watanabe K, Ichida T, Asakura H, Yoneyama H, A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetic and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol*, 査読有, 2013, 46:141-152.

Lashmanan AP, Meilei H, Suzuki K, Soetikono V, Nagata M, Nakamura T, Takahashi T, Sone H, Kawachi H, Watanabe K, The hyperglycemia stimulated myocardial endoplasmic reticulum(ER) stress contributes to

diabetic cardiomyopathy in the transgenic non-obese type 2 diabetic rats: A differential role of Unfolded Protein Response (UPR) signaling proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, 査読有, 2013, 45:438-447

Yamaguchi H, Suzuki K, Nagata M, Kawase T, Sukumaran V, Thandavarayan RA, Kawauchi Y, Yokoyama J, Tomita M, Kawachi H, Watanabe K, Yoneyama H, Asakura H, Takagi R, Irsogladine maleate ameliorates inflammation and fibrosis in mice with chronic colitis induced by dextran sulfate sodium. *Med Mol Morphol*, 査読有, 2012, 45:140-151.

Uematsu K, Kawase T, Nagata M, Suzuki K, Okuda K, Yoshie H, Burns DM, Takagi R, Tissue culture of human alveolar periosteal sheets using a stem-cell culture medium (Mesen PRO-RSTM): In vitro expansion of D146-positive cells and concomitant upregulation of osteogenic potential in vivo. *Stem Cell Research*, 査読有, 2012, 10:1-19.

Nagata M, Hoshina H, Li M, Arasawa M, Uematsu K, Ogawa S, Yamada K, Kawase T, Suzuki K, Ogose A, Fuse I, Okuda K, Uoshima K, Nakata K, Yoshie H, Takagi R, A clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells: Coordinated activation of bone formation and resorption. *Bone*, 査読有, 2012, 50:11123-1129.

Soetikono V, Watanabe K, Lakshamanan AP, Arumugam S, Sari FR, Skumaran V, Thandavarayan RA, Harima M, Suzuki K, Kawachi H, Nagata M, Takagi R, Kodama M, Role of protein kinase C-MAPK, oxidative stress and inflammation pathways in diabetic nephropathy. *J Nephrol Therapeutic*, 査読有, 2012, S2:1-9.

〔学会発表〕(計 1 件)

Suzuki K, Yokoyama J, Kawauchi Y, Honda Y, Asakura H, Okazaki K, Suzuki Y, Sameshima Y, Fukushima T, Fujii M, Hashiguchi T, Mizumoto S, Sugahara K, Yoneyama H., Endoscopic submucosal injection of a synthesized anti-CHST15 dsRNA for sulfated glycosaminoglycan is a safe and beneficial treatment for patients with Crohn's disease who do not respond sufficiently to the conventional treatment, 2014 DDW, Chicago, 2014 May 4, Chicago, IL, USA.

〔図書〕(計 2 件)

Suzuki K, Nagata M, Kawase T, Uematsu K, Honda Y, Kawauchi Y, Yokoyama J, Arumugam S, Thandavarayan RA, Yoneyama H, Watanabe K, Asakura H., Nova Science Publishers, Inc., Vimentin: Concepts and molecular mechanisms, 2013, 170.

Suzuki K, Nagata M, Kawase T, Uematsu K, Honda Y, Kawauchi Y, Yokoyama J, Arumugam S, Thandavarayan RA, Yoneyama H, Watanabe K, Asakura H., Nova Science Publishers, Inc., Mast cells. Phenotypic features, biological functions and role in immunity, 2013, 301.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 健司 (SUZUKI KENJI)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号 : 00303123

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :