

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461154

研究課題名(和文) RNA干渉を応用した肺高血圧症の新时期治療戦略の開発

研究課題名(英文) RNA interference for the therapy of pulmonary hypertension

## 研究代表者

田口 修 (Taguchi, Osamu)

三重大学・保健管理センター・教授

研究者番号：90197244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺高血圧症の原因は様々であり、そのうち、原因不明の特発性肺動脈性肺高血圧症、膠原病による肺動脈性肺高血圧症、及び肺気腫、肺線維症などに伴うものもある。本研究では肺高血圧症の発症に關与する因子に対するsiRNAの抑制効果を検討した。肺気腫と肺線維症に伴う肺高血圧症におけるRNA干渉の抑制効果を検討した。NFkappaB siRNAを投与した肺気腫マウスでは、非投与群に比べ、肺気腫の程度は有意に低下した。また、ペリオスチン siRNAを投与した肺線維症マウスでは、対象群に比べ、肺線維症は有意に低下した。基礎疾患に伴う肺高血圧症に対するRNA干渉が有効であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary hypertension may be of unknown etiology or caused by underlying disorders including emphysema, lung fibrosis or thromboembolism. This study evaluated the usefulness of RNA interference against NF-kappaB and periostin for pulmonary hypertension associated with lung fibrosis and emphysema. Cigarette smoke extract significantly increased the expression of endothelin and its receptors in pulmonary epithelial cells. Mice with emphysema was treated with siRNA against NF-kappaB. Alveolar wall destruction and lung inflammation were significantly suppressed by NF-kappaB siRNA compared to untreated mice. In addition, periostin siRNA significantly inhibited the development of fibrosis compared to control RNA. Overall, the results of this investigation clearly demonstrated the usefulness of siRNA therapy against transcription factor and matrix protein for the treatment of diseases that frequently lead to the development of pulmonary hypertension.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺高血圧症 RNA干渉 転写因子 ペリオスチン 肺線維症 慢性閉塞性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症の原因は様々であり、そのうち、原因不明の特発性肺動脈性肺高血圧症、膠原病・先天性肺疾患薬剤性による肺動脈性肺高血圧症、及び肺気腫、肺線維症などに伴うものもある。呼吸器科領域では、慢性炎症を来たす疾患および病態の多くは治療抵抗性で難治性である。そのうち肺高血圧症は、予後不良の疾患の一つであり、治療法は現在のところほぼ対症療法に留まる。肺高血圧症では種々の血管作動物質、特にエンドセリン-1が過剰に産生放出され、その病態形成に重要な役割を果たしていることがわかっている。内皮細胞、平滑筋細胞、気管支上皮細胞、マクロファージなどがエンドセリン-1の過剰発現に関わっており、さらに本疾患では血管平滑筋細胞膜上にエンドセリン-1受容体であるETAの発現も増加していると報告されている。興味深いことに、肺高血圧症の病態で産生が低下している血管弛緩物質の多くは細胞増殖抑制作用がある一方、肺高血圧症で産生が増加するエンドセリン-1は、細胞増殖促進作用が報告されており、これらの血管作動物質の不均衡が血管の細胞増殖を誘発すると考えられている。現在までの肺高血圧治療の主流は、血管弛緩物質の補充または血管収縮の抑制により、血管の異常緊張を取り除き、それと同時に細胞増殖を抑制する効果を期待したものである。

2. 研究の目的

本研究では画期的な治療法が存在しない肺高血圧症の病態に対して、その責任遺伝子、蛋白に対する siRNA を用いて、それらをノックダウンすることによって、その病態を制御できるかを検討するものである。

3. 研究の方法

(1) マウス肺腺腫由来の LA-4 細胞株を用いて ET-1 とその受容体の発現に対するタバコ煙抽出液(cigarette smoke extract;CSE)の効果を検討した。

(2) タバコ煙抽出液誘発慢性閉塞性肺疾患マウスモデルに対する NFκB siRNA の効果：我々は開発したマトリックスメタロプロテアーゼ-2 トランジェニックマウスを用いて肺気腫マウスモデルを作製した。本肺気腫マウスモデルに煙草暴露させる前に毎日 NFκB 又はコントロール核酸を経鼻投与し、血液、気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン、細胞数などを比較検討した。

(3) プレオマイシン(BLM)誘発肺線維症マウスを用いて抗ペリオスチン・アンチセンス核酸又はコントロール核酸を経鼻投与した。治療期間終了後、肺の画像検査、肺機能測定、肺の病理組織学的検査、生化学的解析、マウスの生存期間の検討を行った。

4. 研究成果

(1) LA-4 細胞は CSE の存在下で培養すると

エンドセリン-1 と ETA の発現が有意に上昇した(図 1 と図 2)。

(2) NFκB siRNA を投与したタバコ煙誘発肺気腫マウスでは、マウス対象群に比較して、肺胞壁の破壊の程度は有意に低下した(図 3)。また、NFκB siRNA を投与したタバコ煙誘発肺気腫マウスでは、マウス対象群に比較して、肺組織中 TNFαの濃度及び肺胞洗浄液(BALF)中の総細胞数は有意に低下した。一方、野生型マウスでは有意な変化はなかった(図 3)。

(3) Periostin siRNA を投与したプレオマイシン誘発肺線維症マウスでは、マウス対象群に比較して、肺組織のコラーゲンの沈着及び Ashcroft スコアは有意に低下した(図 4、5)。

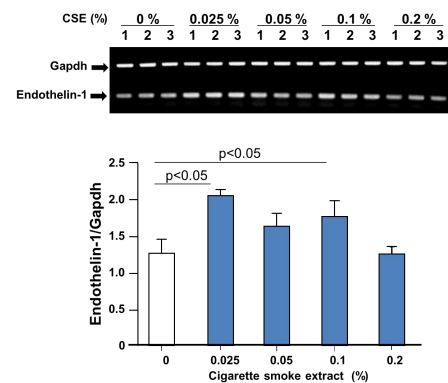


図 1. CSE によるエンドセリン-1 発現の上昇。

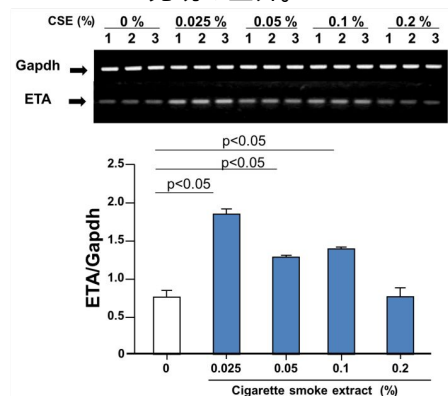


図 2. CSE による ETA 発現の上昇。

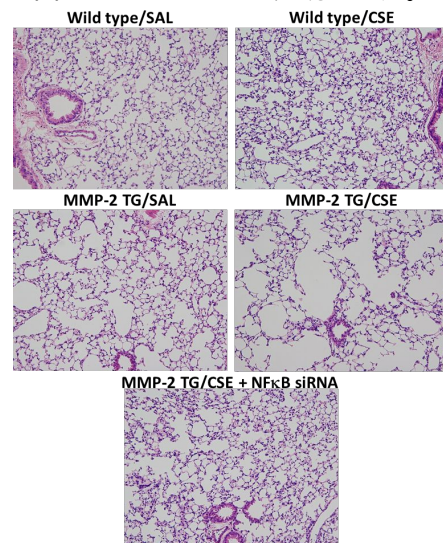


図3 肺気腫に対するNFκB siRNAの抑制効果。

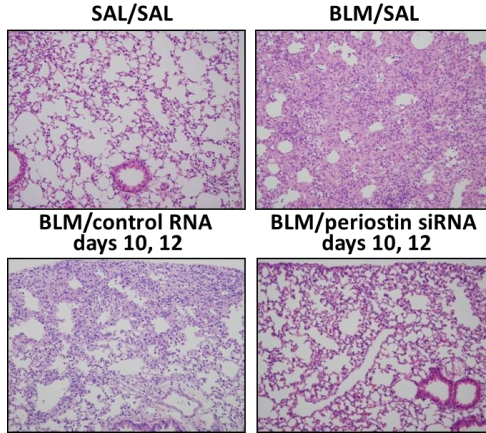


図4 . Periostin siRNA 投与群では対象群にくらべ肺線維症が有意に抑制された。  
SAL= Saline(生理食塩)。

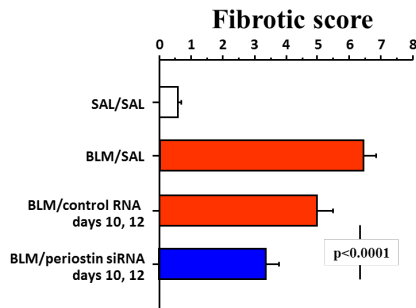


図5 . Periostin siRNA 投与群では対象群にくらべ Ashcroft score は有意に低かった。

### 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〕(計 13 件)

- Honda T, Kobayashi Y, Togashi K, Hasegawa H, Iwasa M, Taguchi O, Takei Y, Sumida Y. Associations among circulating branched-chain amino acids and tyrosine with muscle volume and glucose metabolism in individuals without diabetes. *Nutrition* 32:531-8, 2016 査読有り
- Kobayashi H, Naito M, Masuya M, Maruyama M, Urata K, Takahashi Y, Tomaru A, Fujiwara K, Ohnishi M, Takagi T, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza C, Urawa M, Gabazza EC, Taguchi O, Takei Y. Circulating fibrocytes correlate with the asthma control test score. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2016, in press. 査読有り
- Takagi H, Kobayashi Y, Taguchi O, Takei Y, Sumida Y. Influence of dietary intake of fish oil, magnesium, and zinc on metabolic parameters among individuals tested for diabetes. *Nutrition* 31:988-93, 2015 査読有り
- Matsumoto T, Matsushima Y, Toda M, Roen Z, D'Alessandro-Gabazza CN, Hinneh JA, Harada E, Yasuma T, Yano Y, Urawa M, Kobayashi T, Taguchi O, Gabazza

- EC. Activated protein C modulates the proinflammatory activity of dendritic cells. *J Asthma Allergy*. 8:29-37, 2015 査読有り
- Roehn Z, Toda M, D'Alessandro-Gabazza CN, Onishi M, Kobayashi T, Yasuma T, Urawa M, Taguchi O, Gabazza EC. Thrombomodulin inhibits the activation of eosinophils and mast cells. *Cell Immunol* 293:34-40, 2014 査読有り
- Kodama H, Yamakado K, Hasegawa T, Takao M, Taguchi O, Fukai I, Sakuma H. Radiofrequency ablation for ground-glass opacity-dominant lung adenocarcinoma. *J Vasc Interv Radiol* 25:333-9, 2014 査読有り
- Toda M, D'Alessandro-Gabazza CN, Takagi T, Chelakkot-Govindalayathila AL, Taguchi O, Roehn Z, Muniesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Gabazza EC, Morser J. Thrombomodulin modulates dendritic cells via both antagonism of high mobility group protein B1 and an independent mechanism. *Allergol Int* 63:57-66, 2013 査読有り
- Maruyama T, Fujisawa T, Okuno M, Toyoshima H, Tsutsui K, Maeda H, Yuda H, Yoshida M, Kobayashi H, Taguchi O, Gabazza EC, Takei Y, Miyashita N, Ihara T, Brito V, Niederman MS. A new strategy for healthcare-associated pneumonia: a 2-year prospective multicenter cohort study using risk factors for multidrug-resistant pathogens to select initial empiric therapy. *Clin Infect Dis* 57:1373-83, 2013 査読有り
- Miyake Y, D'Alessandro-Gabazza CN, Takagi T, Naito M, Hataji O, Nakahara H, Yuda H, Fujimoto H, Kobayashi H, Yasuma T, Toda M, Kobayashi T, Yano Y, Morser J, Taguchi O, Gabazza EC. Dose-dependent differential effects of thrombin in allergic bronchial asthma. *J Thromb Haemost* 11:1903-15, 2013 査読有り
- Yasukawa A, Hosoki K, Toda M, Miyake Y, Matsushima Y, Matsumoto T, Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, Nagao M, Sugimoto M, Hiraguchi Y, Tokuda R, Naito M, Takagi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Suga S, Kobayashi T, Fujisawa T, Taguchi O, Gabazza EC. Eosinophils promote epithelial to mesenchymal transition of bronchial epithelial cells. *PLoS One*. 2013 May 21;8(5):e64281, 2013 査読有り
- Suzawa N, Yamakado K, Takao M, Taguchi O, Yamada T, Takeda K. Detection of local tumor progression by (18)F-FDG PET/CT following lung radiofrequency ablation: PET versus CT. *Clin Nucl Med* 38 :e166-70, 2013 査読有り
- Boveda-Ruiz D, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Takagi T, Naito M, Matsushima Y, Matsumoto T, Kobayashi T, Gil-Bernabe P, Chelakkot-Govindalayathil AL, Miyake Y, Yasukawa A, Morser J, Taguchi O, Gabazza EC. Differential role of regulatory T cells in early and late stages of pulmonary fibrosis. *Immunobiology* 218:245-54, 2013 査読有り
- Toda M, Shao Z, Yamaguchi KD, Takagi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Taguchi O, Salamon H, Leung LL, Gabazza EC, Morser J. Differential gene expression in thrombomodulin (TM; CD141)(+) and TM(-) dendritic cell subsets. *PLoS One*

## 〔学会発表〕(計 15 件)

1. Tomaru A, Gabazza E, Kobayashi T, Kobayashi H, Taguchi O, Takagi T, Onishi M, Fujiwara K, D'Alessandro Gabazza C, Takahashi Y, Urata K. Matrix metalloproteinase-2 is protective in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. International Conference of the European Respiratory Society, Amsterdam (Netherlands), September 26-30, 2015
2. Fujiwara K, Urata K, Tomaru A, Takahashi Y, Onishi M, Takehiro Takagi, Kobayashi H, D'Alessandro Gabazza CN, Gabazza EC, Taguchi O, Kobayashi T. Lung overexpression of matrix metalloproteinase-2 protects against bronchial asthma. International Conference of the European Respiratory Society, Amsterdam (Netherlands), September 26-30, 2015
3. Takahashi Y, Urata K, Tomaru A, Fujiwara K, Onishi M, Takagi T, Kobayashi H, D'Alessandro-Gabazza C, Gabazza E, Taguchi O, Kobayashi T. The immunomodulatory activity of protein S protects against allergic airway inflammation. International Conference of the European Respiratory Society, Amsterdam (Netherlands), September 26-30, 2015
4. Sakaguchi T, Hataji O, Saiki H, Gabazza EC, D'Alessandro-Gabazza C, Nishii Y, Kobayashi T, Taguchi O. Clinical significance of transcutaneous PCO2 in patients with obstructive sleep apnea syndrome. International Conference of the European Respiratory Society, Amsterdam (Netherlands), September 26-30, 2015
5. Saiki H, Hataji O, Sakaguchi T, Gabazza EC, Nishii Y, D'Alessandro-Gabazza C, Kobayashi T, Taguchi O. Clinical severity of chronic obstructive pulmonary disease is associated with bone mineral density. International Conference of the European Respiratory Society, Amsterdam (Netherlands), September 26-30, 2015
6. Gabazza EC, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Roen Z, Takahashi Y, Fujiwara K, Hinneh JA, Yasuma T, Taguchi O. Targeting Periostin for the Treatment of Pulmonary Fibrosis. 9th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2015) 三重大学 (三重県・津市) December 10-12, 2015
7. Hataji O, Chelakkot-Govindalayathil AL, D'Alessandro-Gabazza CN, Onishi M, Fujiwara K, Toda M, Kobayashi T, Gabazza EC, Taguchi O. A novel and short-term mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. International Conference of the European Respiratory Society, Munich, Germany, September 6-10, 2014
8. Naito M, Gabazza EC, Kobayashi T, Ito K, Watanabe F, Hataji O, D'Alessandro-Gabazza CN, Fujiwara K, Onishi M, Takagi T, Kobayashi H, Taguchi O. The Clinical Significance of Protein S In Patients with sarcoidosis. American Thoracic Society International Conference, Philadelphia, USA, May 17-22, 2013.
9. Kobayashi T, Gabazza EC, Okano T, Tomaru A, Fujiwara K, Onishi M, Takagi T, Kobayashi H, D'Alessandro-Gabazza CN, Rennard SI, Taguchi O. RNA Interference For The Treatment Of Intractable Pulmonary Diseases. American Thoracic Society International Conference, Philadelphia, USA, May 17-22, 2013.
10. Takagi T, Onishi M, Chalakkot-Govindalayathil A, Hosoki K, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza C, Morser J, Taguchi O, Gabazza E. Role of protein S in murine model of allergic asthma. International Conference of the International Society for Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam (Netherlands), June 29-July 4, 2013
11. Onishi M, Tomaru A, Fujiwara K, Urawa M, Takagi T, Kobayashi T, Kobayashi H, Miyake Y, Toda M, D'Alessandro-Gabazza C, Gabazza E, Taguchi O. Dose-dependent differential effect of thrombin in allergic bronchial asthma. International Conference of the European Respiratory Society, Barcelona, Spain, September 7-11, 2013
12. Takagi T, Urawa M, Tomaru A, Fujiwara K, Onishi M, Kobayashi T, Kobayashi H, Toda M, D'Alessandro-Gabazza C, Gabazza E, Taguchi O. The immunomodulatory effect of protein S in pulmonary fibrosis. International Conference of the European Respiratory Society, Barcelona, Spain, September 7-11, 2013
13. Hataji O, Naito M, Gabazza E, Taguchi O. Usefulness of daily physical activity for monitoring therapeutic response in COPD. International Conference of the European Respiratory Society, Barcelona, Spain, September 7-11, 2013
14. Kobayashi T, N D'Alessandro-Gabazza CN, Takagi T, Matsushima Y, Chelakkot Govindalayathil AL, Toda M, Yasukawa A, Urawa M, Onishi M, Yasuma T, Taguchi O, Gabazza EC. RNA interference for the treatment of intractable pulmonary disease. 第42回日本免疫学会学術集会・幕張メッセ(千葉県・千葉市)2013年12月11日 - 13日
15. Takagi T, Tomaru A, Takahashi Y, Fujiwara K, Onishi M, Urawa M, Chelakkot Govindalayathil AL, Yasukawa A, Toda M, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Taguchi O, Gabazza E. Protective effect of thrombomodulin in murine model of allergic asthma is dose dependent. 第42回日本免疫学会学術集会・幕張メッセ(千葉県・千葉市)2013年12月11日 - 13日

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
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

田口 修 (Taguchi, Osamu)  
三重大学・保健管理センター・教授  
研究者番号：90197244

##### (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

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：