

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20249044

研究課題名（和文）VA-Liposome-siRNAHSP47 を用いた抗線維化治療

研究課題名（英文）

Antifibrotic therapy utilizing VA-liposome-siRNAHSP47

研究代表者

新津 洋司郎 (NIITSU YOSHIRO)

札幌医科大学・分子標的探索講座・特任教授

研究者番号：10045502

研究成果の概要（和文）：

組織線維症は現在全く治療のない病態である。その責任細胞は星細胞であり、組織が傷害を受けると、それが活性化しコラーゲンを分泌するようになる。この分泌過程にはコラーゲンに特異的なシャペロン蛋白 HSP47 が補助的に関与する。本研究では siRNAHSP47 を用いる事により活性化星細胞からのコラーゲン分泌を抑制する事を意図し、ラット肝星細胞での効果を検討したところ、明確に抑制効果が確認された。次いで星細胞が Vitamin A (VA) を取り込み貯蔵するという性質を利用して、liposome に VA を結合させその中に、siRNAHSP47 (ラットでは siRNA<sub>g</sub>46) を含ませて Complex を作製し、3 種類 (DMN, CCL<sub>4</sub>, DBL) の肝硬変ラットモデルでその抗線維活性を調べたところ、いずれのモデルにおいても明確な効果が見られた。また致死的な DMN モデルでは 100% の生存率も確保できた。

さらに同様な抗線維効果は DBTC 膵炎ラットモデルに於いても確認された。

本治療効果の機序としては siRNAHSP47 によりコラーゲン分泌が抑制されると同時に組織中のコラゲナーゼ（一部は活性化星細胞からも分泌される）により既沈着のコラーゲンが分解される事によると考えられる。以上により本研究での開発された臓器線維症の治療法は、今後臨床への展開が多いに期待されることである。

研究成果の概要（英文）：

There is no clinically approved treatment modality for organ fibrosis. The stellate cells which is widely distributed in organs strong vitamin A (VA) are considered to be responsible for this pathological condition. Upon tissue damage, the stellate cells start to proliferate and secrete collagen. Prior to the secretion, heart shocks protein 47 plays a critical role intracellularly in helix formation of collagen.

In this research we intended to inhibit collagen secretion from stellate cells by applying siRNA against HSP47, and indeed confirmed this effect by in vitro transfection experiment.

We then constructed a complex which was composed of VA coupled liposome and siRNA HSP47 in it.

By injecting this complex into the tail vein. We were able to successfully demonstrate the significant resolution of extracellular matrix in three different cirrhosis models (DMN, CCL<sub>4</sub>, BDL) of rats. Further in DMN model (lethal model), significant prolongation of survival (100% survival rate) was attained. In addition, similar antifibrotic effect was observed in chronic pancreatitis model of rat. The mechanism underlying this in vivo effect was proven to be, in addition to the inhibition of collagen secretion from stellate cells by siRNA HSP47, resolution of predeposited collagen by tissue collagenase. Thus,

with such significant antifibrotic effect, present approach is considered to be promising for future clinical application.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	23,000,000	6,900,000	29,900,000
2009年度	13,700,000	4,110,000	17,810,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	38,100,000	11,430,000	49,530,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学

#### 1. 研究開始当初の背景

慢性肝障害の終末像である肝線維症は、しばしば予後を左右する要因とともに肝癌を促進する可能性も指摘されている。肝線維化を治療しようとする試みは、国の内外を問わず古くからなされて来たが、いまだ臨床応用にまで至っているものは皆無である。肝線維化は、様々な慢性肝障害や慢性肝炎の結果、局所で活性酸素や TGF $\beta$  などの線維化を治療しようとする試みは、国の内外を問わず古くからなされて来たが、いまだ臨床応用にまで至っているものは皆無である。肝線維化は、様々な慢性肝障害や慢性肝炎の結果、局所で活性酸素や TGF $\beta$  などの線維化促進因子に慢性的に曝された肝星細胞(HSC)が過剰なコラーゲンを産生することによって起こる。HSCがコラーゲンを分泌する際、その立体構造を正しく保たせるために Heat shock protein 47(HSP47)が分子シャペロンとして働く。このHSP47はコラーゲン分子にきわめて特異的であるので、それを抑制することができれば、コラーゲンの分泌を阻害することが出来ることになる。事実我々はこれまでヒト線維芽細胞をヒトHSP47のライボザイムで処理し間違いなくコラーゲンの分泌いつが抑制されることを確認し報告した(J Gene Med. 2003)。一方、HSCの正体(肝)における重要な機能の一つとして血中の Vitamin A(VA)を蓄え、必要に応じて様々な組織にそれらを分与することが想定されている。

#### 2. 研究の目的

このような知見に基づき本研究では、肝線維

化を治療する戦略として、まず、HSP47を siRNA で抑制することを計画した。次いで、この siRNA を liposome 包埋し、その liposome に VA を結合させることで STRA6 を介して HSC に特異的に取り込ませることを考案した。すなわち、siRNA HSP47 と VA-liposome という二種の方策により、これまでの報告になかったきわめて高いと特異性を持つ肝線維化治療法を確立し、臨床応用へのトランスレーションを行おうというのが本研究の目的である。

#### 3. 研究の方法

(1) ラット肝硬変モデルにおける抗線維効果の検討

1) 胆管結紮 (BDL) 肝硬変モデル (Bile duct ligation induced liver cirrhosis) の作成: Kountouras. J, (Br J Exp Pathol. 1984 Jun;65(3):305-11.)の方法に基づき行う。すなわち、SD ラットの総胆管を結紮し、2から3週間で線維化が形成され8週間肝硬変のピークが得られるモデルであるため、組織で肝硬変が確認された時点から、週1回から5回程度の感覚での投与を検討する。

2) 四塩化炭素モデルの作成: Issa R et al (Gastroenterology 126. 2004)の方法に従う。すなわち、SD ラットに olive oil に溶解した CCl<sub>4</sub> を 1:1[V/V]kg で投与する。5週間で肝硬変のピークが得られるモデルであるため、組織で肝硬変が確認された時点から、週1回から5回程度の間隔での投与を検討する。線維化の評価は、Azan-Malloy 染色、SMA 染色をおこない、これらの定量化は NIH image を利用する。さらに、hydroxyproline の定量も行う。また、ビリルビン、albumin、ALT、AST、ヒアルロン酸等の肝機能も検討す

る。

#### (2) 線維化改善のメカニズムの検討

##### 1) siRNA 導入による肝星細胞 (HSC) および肝組織内の遺伝子発現変化の検討

Primary activated HSC に対し siRNA Random 導入 HSC から RNA を抽出し DNA

microarray (Affymetrix GeneChip) を用い発現の変動している遺伝子を検索する。また、DMN 肝硬変ラットに対して PBS 投与群、siRNAHSP47 投与群より肝組織を採取し、そこから RNA を抽出し同様に Affymetrix Gene Chip により発現変動する遺伝子、例えばコラーゲン、HSP47、MMPs、TIMP-1、またはアポトーシス関連遺伝子、細胞増殖シグナル関連遺伝子などを中心に検討する。

##### 2) HSP47siRNA 導入による HSC のアポトーシス誘導機序の検討

まず、siRNA による活性化 HSC の増殖抑制の検討を行うため、24well で培養した  $5 \times 10^4$  個の活性化 HSC に上記 siRNA を導入して培養後 24 時間で  $^3\text{H}$  thymidine assay を行う。さらに Apoptosis 誘導の検討として、上述のように処理した HSC の生存曲線を WST-1 により検討する。また apoptosis を tunel 法ならびに annexin V-FITC を用いた FACS で検討する。

##### 3) HSC の生存シグナルの検討

HSP47siRNA 導入 primary cultured HSC と無処置細胞におけるインテグリン由来の細胞増殖シグナル、生存シグナルとして FAK (focal adhesion kinase), FAK-P13K-AKT pathway や ILK (integrin-linked kinase) pathway ならびに I $\kappa$ B $\alpha$  の発現を比較検討する。すなわち、細胞 lysate に対して P13K (p85 subunit)、AKT (Ser473)、I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化をそれぞれの特異抗体を用いた Western blotting 法で経時的なリン酸化状態の変動についても検討する。また、それぞれの特異的

inhibitor (LY294002, AKT-in, BAY11-7082) を用いた検討も行う。

#### (3) ラット膵線維化抑制療法の開発

1) ラット PSC における HSP47 発現の解析とコラーゲン抑制の検討: 5 週齢の Lewis ラットに対し Gibo らの方法に従い、ラット PSC を分離する (Laboratory Investigation 2005;85:75-89) VA-lip-siRNAHSP47 を用いて PSC に導入後、HSP47 およびコラーゲン発現の低下を検討する。すなわち、これらをラット PSC に導入後 24、48、72 時間培養後、抗 HSP47 抗体を用い Western blot 法で検討する。2. proline incorporation 法によるラット HSC におけるコラーゲン産生量測定。

2) 膵線維化モデルラットの作成: Sparmann らの方法に基づき (Gastroenterology 1997;112:1664-72)、Lewis ラット (5 週齢) に対し、

Dibutyltin dichloride (DBTC) 6mg/kg を尾静

脈より 1 回投与し、膵線維化モデルラットを作成する。実際に膵の線維化が得られたか確認するため Day7、14、21、28、56 に麻醉下に剃毛後開腹し、灌流固定した膵組織を取り出しパラフィン包埋したのち薄切し H.E. 染色に加え SMA、Azan、Gitter 染色法を行い、さらに Weidenbach らの方法に基づき膵組織中の hydroxyproline を測定し膵線維化の検討を行う (Digestion 1997;58:50-57)。また同時期に血清 amylase, lipase 値を測定する。

3) PSC 選択的 siRNA 導入法の検討: (1) HSP47 の siRNA がラット膵 PSC に選択的に度王乳されるか検討するために、FAM を標識した siRNA を有する VA-lip-siRNA-HSP47-FAM を尾静脈から投与し、導入後 24 時間でラット膵組織を採取し凍結切片を作成し抗  $\alpha$  SMA-Cy3 抗体による蛍光免疫染色を施行することで in vivo 導入発現効率を検討する。

4) 実験的膵線維化 (DBTC induced pancreatic fibrosis) をモデルとした抗線維化作用の検討: (1) Lewis ラット (5 週齢) に対し、DBTC を用い前述の方法で膵線維化モデルラットを作成する。Day14 より VA-lip-siRNAHSP47 を尾静脈から週 1 ~ 3 回、2 週間投与し day28 に膵を取り出し抗線維化作用が得られるかの検討を行う。膵線維化モデルに対する治療効果の評価方法: day28 の膵組織を H.E 染色に加え Azan、Gitter 染色法を行う。NIH image で治療前後における膵臓の線維化の定量化を試みる。また治療前後の膵組織中の hydroxyproline を測定し膵線維化改善の検討を行う。膵炎の改善をみるため各種膵酵素、血統マーカーなども採血する。

#### 4. 研究成果

##### 1) VA-liposome-siRNAg46 の肝星細胞への特異的運搬

まず、in vitro での実験として VA-liposome-siRNAg46 (ヒト HSP47 に対するラットの homologue は gp46 である) をラット肝から抽出した活性型 HSC に加え、そのコラーゲン分泌抑制作用を確認した。同時にその作用が RBP 抗体によりブロックされることも証明した。次いで siRNAg46 を蛍光 (FAM) 標識し、VA-lip に含有させた薬剤を DMN 肝硬変ラットの尾静脈に投与したところ、FAM 蛍光は肝の星佐相棒 ( $\alpha$  SMA 陽性) に特異的に分布していた。(図 1)

##### 2) VA-liposome-siRNAg46 の肝硬変に対する治療効果

3 種の肝硬変ラットモデルを (DMN, CCL<sub>4</sub>, 胆管結紮) を作成し、VA-liposome-siRNAg46 の治療効果 (肝硬変を作成した後治療を始める) を検討した。その結果いずれのモデルに於いても明確な組織線維症の改善が認められた (図 2)。また致命的なモデルとされている DMN モデルでは生存率の有意な延長が認

められた。

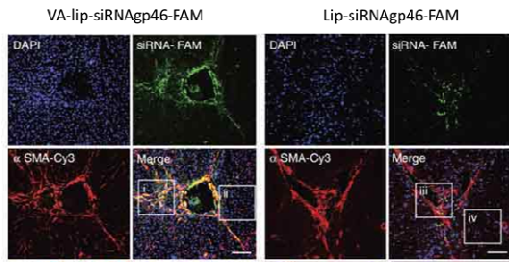


図1: siRNAHSP47 を VA が表面に露出しているリポソームに内包させ静脈内に投与(全身投与)したところ aHSC に特異的に運搬された

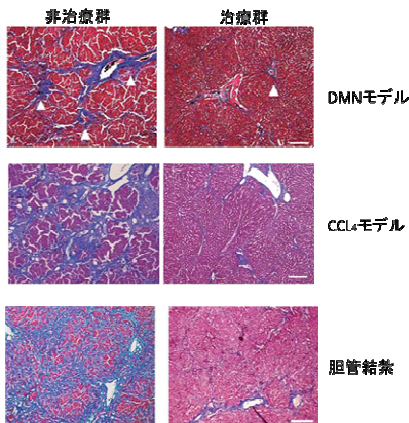


図2: 組織線維症の改善

### 3) 治療効果のメカニズム

DMN ラットの治療後の肝組織の  $\alpha$  SMA 抗体(活性化星細胞を検出)で染色したところ、予期に反して、染色度が極端に低下していた。つまり、活性化星細胞が消失していた。さらにアポトーシスのマーカーである Tunnel 染色を行ったところ、消失しつつある星細胞が陽性になった。そこで活性化星細胞がアポトーシスに陥る機序を in vitro での様々な実験により検討したところ、図3 a), b)に示す様な結論が得られた。

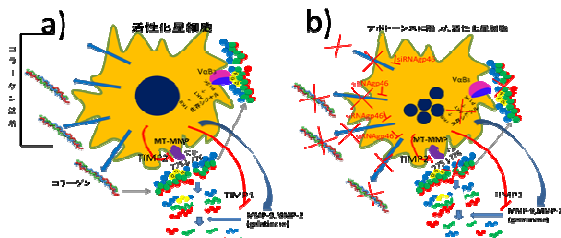


図3 治療効果のメカニズム

- a) 活性化星細胞の生存シグナル
- b) siRNAp46 によるアポトーシスの誘導

すなわち、活性化星細胞はコラーゲンを分泌し組織にそれを沈着させるが、その一部を膜型コラーゲナーゼで分解する事により、コラー

ゲン分子内部の RGD モチーフを露出させ、そのモチーフを  $\alpha V \beta_3$  受容体で認識する事で生存シグナル ( $PI_3/AKT/1KB$ ) を導入し、自らを増殖させる。siRNAp46 でコラーゲン分泌を阻害すると、この生存シグナルが効かなくなり、アポトーシスに陥る。つまり、我々の方法はコラーゲン分泌の抑制とコラーゲナーゼによる即沈着コラーゲンの融解に加えて、活性化星細胞のアポトーシス誘導により効果を発揮するものと考えられた。

### 4) 慢性膵炎モデルにおける VA-liposome-siRNAp46 の治療効果

膵、肺、骨、大腸等にも星細胞が存在する事が知られているため我々のアプローチが肝硬変以外にも有効であるか否かをしらべる目的で DBTC 膵炎をラットに作成し、治療効果を検討した。図4に示すように肝硬変同様、組織線維症の改善と、組織ハイドロキシプロリンの正常化が確認された。なお本治療実験に先立ち膵星細胞を分離し、VA-liposome-siRNAp46 を RBP を介して取り込むこと、コラーゲン分泌を抑制する事等を in vitro で確認するとともに、DBTC モデルで、VA-liposome-siRNAp46 が膵星細胞に特異的に運搬される事も確かめた。

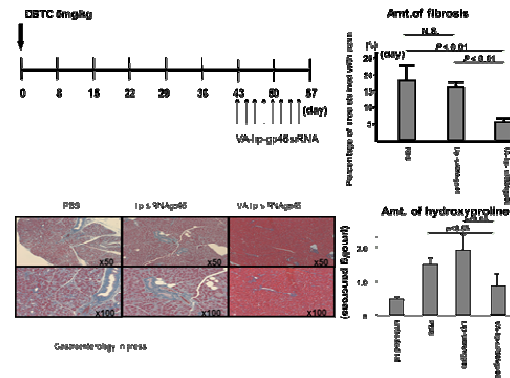


図4: DBTC 膵炎モデルでの治療効果

### 結論

以上から本研究で開発した線維症の治療法は肝硬変はもとより、膵炎を含む他の臓器線維症にも有効である可能性が示唆され、今後臨床応用に向けてのさらなる改良を行うつもりである。

### 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9件)

1. Takayama T, Niitsu Y. Randomized double blind trial of sulindac and etodolac to eradicate aberrant crypt

- foci and to prevent sporadic colorectal polyps. Clin Cancer Res. 査読有 2011 Mar 8
2. Saito Y, Niitsu Y. Phase II study of S-1, docetaxel and cisplatin combination chemotherapy in patients with unresectable metastatic gastric cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 査読有 2010 66(4)721-728
  3. Saito Y, Niitsu Y. Apoptotic death of hematopoietic tumor cells through potentiated and sustained adhesion to fibronectin via VLA-4. J Biol Chem. 査読有 2010 Mar 5;285(10):7006-15.
  4. Kuribayashi K, Niitsu Y. Pure red cell aplasia associated with good's syndrome accompanied by decreased stem cell factor production in the bone marrow. Intern Medicine. 査読有 2010 49(5):377-382
  5. Sato Y, Niitsu Y. Phase II study of S-1, docetaxel and cisplatin combination chemotherapy in patients with unresectable metastatic gastric cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 査読有 2009 49 (5) 30-35
  6. Nishihori Y, Niitsu Y. Interleukin-2 gene transfer potentiates the alpha-galactosylceramide-stimulated antitumor effect by the induction of TRAIL in NKT and NK cells in mouse models of subcutaneous and metastatic carcinoma. Cancer Biol Ther. 査読有 2009 8 (18) 1763-1770
  7. Hayashi T, Niitsu Y. Suppressive effect of sulindac on branch duct-intraductal papillary mucinous neoplasms. J Gastroenterol. 査読有 2009 44 (9) 964-975
  8. Kobune M, Niitsu Y. Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells. Cancer Sci. 査読有 2009 100 (5) 948-955
  9. Sato Y, Kato J, Takimoto R, Niitsu Y. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. Nat Biotechnol. 査読有 2008 Apr;26(4):431-442.
- [学会発表] (計 15 件)
1. 新津洋司郎、Overcome of cell adhesion mediated drug resistance by anti-integrin Ab or Rho kinase inhibitor in haematological malignancies. Albert Einstein College 2010 年 11 月 3 日、Albert Einstein College:New York
  2. 新津洋司郎、がん薬物療法の進歩、日本肝臓医生物学研究会 特別講演、2010 年 9 月 2 日、札幌医科大学
  3. 新津洋司郎、Reversal of liver fibrosis with VA-liposome siRNAHSP47 targeting hepatic stellate cells. ISHSR 15th. 2010 年 8 月 30 日パサディナ(アメリカ)
  4. 新津洋司郎、Treatment of Organ Fibrosis by siRNAHSP47. LLMB 2010 (Lipids, Liposomes& Membrane Biophysics) 2010 年 8 月 5 日 Vancouver (カナダ)
  5. 新津洋司郎、肝線維化治療の新しい展開、第 9 回肝疾患フォーラム学術集会「肝発癌機構と発癌予防」、2009 年 10 月 10 日、大阪 ホテルグランヴィア大阪
  6. 新津洋司郎、Treatment of organ fibrosis by siRNAHSP47, CSSI(Cell Stress Society International)、2009 年 10 月 9 日、北海道 ガトーキングダム札幌
  7. 新津洋司郎、線維症に対する新しい治療戦略、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業特発性造血障害に関する調査研究 第 1 回合同班会議総会、2009 年 7 月 24 日、東京 アステラス製薬本社
  8. 新津洋司郎、臓器線維症治療の新展開、第 49 回日本呼吸器学会学術講演会、2009 年 6 月 12 日、東京フォーラム
  9. 新津洋司郎、床家の取り組む“橋渡し研究”～肝硬変の治療開発を例示して～、2009 年 5 月 26 日、東京 文部科学省第 2 講堂
  10. 新津洋司郎、星細胞のアポトーシス誘導

による肝硬変の治療 第4回大阪肝臓病ワークショップ、2009年01月20日、大阪府

11. 新津洋司郎、肝線維症の治療による肝再生、肝再生研究会 特別講演、2008年12月13日、東京都
12. 新津洋司郎、VA-liposome-siRNAHSP47を用いた肝硬変の治療、日本肝臓学会東部会 特別講演、2008年12月03日、東京都
13. 新津洋司郎、VA-liposome-siRNA HSP47を用いた肝硬変の治療、日本レチノイド研究会学術集会、2008年11月21日、東京都
14. 新津洋司郎、Treatment of liver cirrhosis with siRNAHSP47 encapsulated in VA coupled liposome, RNAi-The RIGHT Track to Therapy. 2008年11月4日、Brussel (ベルギー)
15. 新津洋司郎、A novel treatment modality for organ fibrosis. Stony Brook University, special lecture. 2008年10月23日、NewYork (アメリカ)

[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1件)

名称：線維化抑制のための薬物担体および薬物担体キット  
発明者：新津洋司郎、加藤淳二、佐藤康史  
権利者：日東電工株式会社  
種類：特許権  
番号：4121537  
取得年月日：2008年5月9日  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新津 洋司郎 (NIITSU YOSHIRO)

札幌医科大学分子標的探索講座・特任教授  
研究者番号：10045502

(2) 研究分担者

佐藤 康史 (SATO YASUSHI)

札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80343383

瀧本 理修 (TAKIMOTO RISYU)

札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10336399

加藤 淳二 (KATO JYUNJI)

札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20244345

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：