

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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590807

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Development of a new endoscopic therapy using RNAi
for intestinal fibrosis of Crohn's disease

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

研究成果の概要（和文）：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狭窄症に対する新規治療法として、究極の分子標的治療と呼ばれる RNA 干渉技術を用いた siRNA の腸管粘膜下注入療法を、動物実験モデルに対する実験により開発した。研究成果として、消化管狭窄症の原因遺伝子に対する特異的 RNA 干渉薬「STNM01」によるクローン病狭窄症新規治療法をステリック再生医科学研究所と共同で確立し、平成 24 年 1 月より第 I 相臨床試験を開始するための基礎データを得ることができた。

研究成果の概要（英文）：We have developed a new siRNA medicine, STNM-01 with Stelic Institute. In this project, we studied the therapeutic effects and the mechanism of endoscopic submucosal injection of the STNM-01 for the treatment of intestinal fibrosis using animal models. We have successfully developed a novel endoscopic injection therapy of STNM-01 for the treatment of intestinal fibrosis of Crohn's disease. Using this technique, we have started a phase I clinical trial for patients with Crohn's disease in Japan since January, 2012.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学、消化器内科学・下部消化管学

キーワード：炎症性腸疾患・クローン病・線維化・siRNA・RNAi・内視鏡・糖鎖

1. 研究開始当初の背景

クローン病と潰瘍性大腸炎からなる炎症性腸疾患は原因不明の難治性慢性腸管障害をもたらす疾患である。患者数は従来欧米に多く、日本では少ないとされてきたが、食餌の欧米化などに伴い近年我が国でも患者数は増加し続けている。現在およそクローン病で 3 万人、潰瘍性大腸炎で 10 万人超の患者

が厚労省の特定疾患患者として登録されている。炎症性腸疾患特異性のある薬剤としてサラゾスルファピリジンが 1930 年頃に初めて使用されてから、抗生剤、副腎皮質ステロイド、そして 1960 年台にアザチオプリンや 6-メルカプトプリンなどの免疫調節剤が使用されるようになり、炎症性腸疾患に対する治療法はいったん確立した。しかし、その後

は治療薬開発の停滞期が30年間続いた。特にクローン病においては、このような従来型の治療を行う限り、個々の患者は発症から30年以内に最終的に手術を受けざるを得ない状況であった。1990年後半になり抗TNF α 抗体製剤レミケードに代表される生物学的製剤の出現によりクローン病治療成績が格段に向上した。

しかし、レミケード登場後もクローン病の最大の合併症である消化管狭窄に関しては外科的切除などの侵襲的な治療法しかなく、患者は入退院を繰り返している。

このように、クローン病の患者の生活の質(QOL)向上には、クローン病の線維性消化管狭窄に対する従来の治療法とは異なった画期的新規治療法の開発が急務である。

一方で、炎症性腸疾患に対する特異的治療薬の歴史について先にふれたが、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、ヘンチら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・臨床応用である。また、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を見た際に、新薬開発に決定的に重要な革新的技術として現在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。

2. 研究の目的

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狭窄症に対する新規治療法開発のために、究極の分子標的治療と呼ばれるRNA干渉技術を用いる。

我々はこれまで、ステリック再生医科学研究所と共同で、クローン病の消化管線維化狭窄の原因として、線維化狭窄病変部位における腸管肥満細胞の発現する消化管線維化狭窄の責任糖鎖関連遺伝子(G#1)を明らかにした。さらにG#1に選択的なRNA干渉を発現するsiRNA医薬「STNM-01」を作成し、マウス急性デキストラン硫酸(DSS)腸炎モデルにおける治療効果を確認した。これらの研究成果を臨床に還元し、これまで著しく損なわれ

てきたクローン病消化管線維性狭窄患者QOL改善を目指すために、本研究ではSTNM-01の抗線維化効果を慢性線維化DSS腸炎モデルで検証する。次に理想的Drug Delivery Systemと考えられるSTNM-01の内視鏡的粘膜下注入療法を実験腸炎モデルラットで検討することで、クローン病狭窄症に対する新規治療法としてのSTNM-01の内視鏡的粘膜下注入療法を開発することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1)平成21~22年度は、慢性線維化腸炎ラットをマウスおよびラットで独自に作成し、Atellocollagen-STNM01腹腔内投与実験を行い治療効果判定を行った。

まず、クローン病の線維化狭窄病変に類似した病変を生じ、新薬の治療実験を行うのに適切な動物実験モデルが存在しなかったため、独自に慢性線維化腸炎モデルを作成することにした。

具体的には、マウス(C57BL/6)およびラットにデキストラン硫酸(DSS;分子量5万)の3~5%水溶液を1週間自由飲水させ、その後は水道水に変更継続飼育することで慢性線維化腸炎を作成した。体重減少率、下痢、下血状態などをスコア化した臨床活動度指数を経時的に計測し臨床的な治療効果を判定した。経時的に実験動物を安楽死させ腸管を摘出し、大腸の線維化病変の形成状態を病理組織学的に解析した。また、免疫組織学的解析により腸管病変形成細胞の種類や線維成分であるコラーゲンなども解析した。摘出腸管組織よりmRNAを抽出し、定量RTPCR法により発現サイトカイン、ECM、などの発現状態も解析した。

上記慢性線維化DSS腸炎マウス(ラット)に対し、Atellocollagen-STNM01をDSS投与後8日後に腹腔内投与し、経時的に、上記内容の解析により薬剤治療効果判定を行った。

(2)平成23年度は慢性線維化腸炎をマウスでないラットで作成し、STNM01を内視鏡的粘膜下注入投与実験を行い治療効果判定を行った。

上記方法で作成したマウスおよびラットにケタミンとキシラジンの腹腔内投与により全身麻酔を加え、その後ヒト医療用の極細径内視鏡を経肛門的に挿入し、注射用チューブよりSTNM01を大腸粘膜下に注入した。その後、経時的に実験動物を安楽死させ、大腸を摘出し、上述の各種解析を加えることで治療効果判定を行った。

4. 研究成果

(1)平成21~22年度の研究成果の一つとして、クローン病の線維化腸炎マウスを独自に開発し確立したことである。即ち、慢性線維化DSS腸炎モデルは単純な炎症惹起方法で再現性良く大腸線維化腸炎を発症させることを明らかにした。さらに、この腸管線維化発症機序に関しては、ヒトのクローン病消化管線維化病変局所で報告されているのと同様に、慢性線維化腸炎モデルの大腸においても活性型線維芽細胞と筋線維芽細胞が増加し、これらが腸管組織の線維化に重要な働きをしていることを明らかにした (K Suzuki et al. Pathol Int 2011;61:228-238.)

さらに上記慢性線維化DSS腸炎モデルに対するAtellocollagen-STNM01腹腔内投与により臨床スコアおよび慢性線維化病変が改善、各種のサイトカインや線維化関連分子の発現も低下することが明らかとなった。

(2)平成23年度には慢性線維化DSS腸炎マウスないラットにSTNM-01の大腸内視鏡下粘膜下注入を行い、臨床スコアおよび慢性線維化病変が改善、各種のサイトカインや線維化関連分子の発現も低下することが明らかとなった。特に注目すべきこととして、STNM01の粘膜下注入療法は、大腸局所において線維化形成の責任細胞と考えられる線維化促進間葉系細胞が減少させることで慢性線維化腸炎を改善したことを明らかとした。

また、大腸内へのSTNM01局注箇所はマウスで最大2箇所、ラットで4箇所程度と限局的であるにも関わらず、腸炎および線維化治療効果はほぼ大腸全域におよぶという意外な効果が見られたことである。その機序に関しては不明な点が多いが、臨床応用を考える場合、局所注射箇所より離れた部位の病変に対する治療効果も期待できる点で注目すべき所見が得られた。

これらの実績をもとにSTNM01の非臨床試験結果をまとめ、クローン病消化管線維化病変に対するSTNM01の内視鏡的粘膜下注入臨床応用試験をPMDAに申請し、認可を受けることができた。平成24年からステリック再生医科学研究所との共同研究でSTNM01のヒトでの臨床試験が開始されることになった。

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 25 件)

- ① Yamaguchi H, Suzuki K, et al, Irsogladine maleate ameliorates inflammation and

fibrosis in mice with chronic colitis induced by dextran sulfate sodium. Medical Molecular Morphology 2012 in press.

- ② Kiryu H, Terai G, Imamura O, Yoneyama H, Suzuki K, Asai K, A detailed investigation of accessibilities around target sites of siRNAs and miRNAs., Bioinformatics 2011, 27:1788-1797.
- ③ Suzuki K, et al., Analysis of intestinal fibrosis in chronic colitis in mice induced by dextran sulfate sodium. Pathol Int 2011, 61:228-238.
- ④ Saito A, Miyauchi N, Hashimoto T, Karasawa T, Han GD, Kayaba M, Sumi T, Tomita M, Ikezumi Y, Suzuki K, Koitabashi Y, Shimizu F, Kawachi H. Neurexin-1, a presynaptic adhesion molecule, localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocyte in kidneys.. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2011, 300:R340-R348.
- ⑤ Nagata M, Nuckolls GH, Wang X, Shum L, Seki Y, Kawase T, Takahashi K, Nonaka K, Takahashi I, Noman AA, Suzuki K, Slavkin HC. The primary site of the acrocephalic feature in Apert syndrome is a dwarf cranial base with accelerated chondrocytic differentiation due to aberrant activation of the FGFR2 signaling. Bone 2011, 48:847-856.
- ⑥ Mito S, Watanabe K, Harima M, Thandavaarayan RA, Veeraveedu PT, Sukumaran V, Suzuki K, Kodama M, Aizawa Y. Curcumin ameliorates cardiac inflammation in rats with autoimmune myocarditis. Biol Pharm Bull 2011, 34:974-979.
- ⑦ Mito AS, Thandavarayan RA, Ma M, Lakshmanan A, Suzui K, Kodama M, Watanabe K. Inhibition of cardiac oxidative and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis by curcumin treatment contributes to protection against acute myocarditis. Free Radical Research 2011, 45:1223-1231.
- ⑧ Sukumaran V, Watanabe K, Veeraveedu PT, Ma M, Gurusamay N, Rajavel V, Suzuki K, Ymaguchi K, Kodama M, Aizawa Y. Telmisartan ameliorates experimental autoimmune myocarditis associated with inhibition of inflammation and oxidative stress. Eur J Pharmacol 2010, 652:126-135.
- ⑨ Sun X, Suzuki K, et al., Rectal administration of tranilast ameliorated acute colitis in mice through increased expression of heme oxygenase-1. Pathol Int 2010, 60:93-101.

- ⑩ Sukumaran V, Watanabe K, Veeraveedu PT, Thandavarayan RA, Gurusamy N, Ma M, Yagamaguchi K, Suzuki K, Kodama M, Aizawa Y. Telmisaratan, an angiotensin-II receptor blocker ameliorates cardiac remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. Hypertension Res 2010, 33:695-702.

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

[学会発表] (計 5 件)

- ① 鈴木 健司、新薬はどのように開発するか？クローン病に対する世界初の siRNA 干渉薬開発の試み、第 672 回新潟医学会シンポジウム、平成 23 年 11 月 19 日、新潟大学医学部有壬記念館。
- ② 鈴木 健司、RNA 干渉によるクローン病腸狭窄症治療薬開発、第 96 回日本消化器病学会総会、平成 22 年 4 月 23 日、新潟市朱鷺メッセ。

[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

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