

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09662

研究課題名(和文) TLR制御分子としての肺サーファクタントおよびHSP47抑制による肺線維化治療

研究課題名(英文) Pulmonary fibrosis treatment with pulmonary surfactant as a TLR regulatory molecule and HSP47 inhibition

研究代表者

高橋 弘毅 (Takahashi, Hiroki)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：60231396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：目的：サーファクタント蛋白質(SP)-A補充とHSP47のsiRNAが肺の炎症・線維化を抑制するとの仮説の下、特発性肺線維症の新たな治療法を開発することである。方法：SP-A(-/-)及び野生種マウスにBLMを経気道投与し肺傷害・肺線維化モデルを作成、siRNA HSP47を経静脈投与した。結果：SP-A欠損マウスでは野生種に比べ、炎症・線維化が増強した。また、siRNA HSP47は肺傷害を軽減し、BLM誘導気道炎症を抑制した。結論：SP-Aの補充、及びsiRNA HSP47は肺傷害/肺線維化病変の形成を抑制し、両者の併用が肺線維症の新たな治療法のひとつになりうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症は予後が三年程度の難治性疾患であり、自然免疫の破綻と線維の過剰産生が悪化のメカニズムに関与している。肺線維症の動物モデルで検討した結果、自然免疫調整因子であるサーファクタント蛋白質(SP)-Aが欠損すると病変が悪化し、また、siRNA HSP47で線維生成を抑制することによって悪化が抑制された。したがって、両者の併用が肺線維症の新たな治療法のひとつになりうることを示された。

研究成果の概要(英文)：Objective: To develop a new therapeutic method for idiopathic pulmonary fibrosis under the hypothesis that surfactant protein (SP) -A supplementation and HSP47 siRNA suppress lung inflammation and fibrosis. Method: BLM was intratracheally administered to SP-A (-/-) and wild-type mice to prepare a lung injury / fibrosis model, and siRNA HSP47 was intravenously administered. Results: Inflammation and fibrosis were enhanced in SP-A deficient mice compared to wild type. In addition, siRNA HSP47 reduced lung injury and suppressed BLM-induced airway inflammation. Conclusion: SP-A supplementation and siRNA HSP47 suppressed the formation of lung injury / fibrotic lesions, and it was shown that the combination of both could be one of the new treatments for pulmonary fibrosis.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺サーファクタント 肺傷害 間質性肺炎 内科 免疫学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症(IPF)に代表される難治性肺線維症に対する治療法として、昨今、2種類の抗線維化薬が臨床で使用可能となった。それらはTGF, PDGF, FGFなど増殖因子の産生やそのレセプターへの結合を阻止する薬理効果をもつ。しかし、その効果は限定的であり、IPF患者の予後を劇的に改善するほどの臨床的効果は期待できない。したがって、本疾患が難治性の域を脱するには、新たな新規治療法の開発が必要である。IPFの病理組織像は通常型間質性肺炎(UIP)であり、その特徴の一つとされる筋線維芽細胞の増殖は本疾患の病態進展のKeyと考えられる。

申請者らは、筋線維芽細胞を標的とする新たな治療法として、short interference RNA (siRNA)を用いHeat shock protein (HSP) 47をノックダウンし、同細胞内でのコラーゲン過剰産生を抑制する方法を考案した。さらに筋線維芽細胞をアポトーシスへ誘導し、UIP病変の進行を根底から抑制することが可能と考えた。また、臨床応用を視野に入れた際、正常組織の線維芽細胞などの標的細胞以外への作用(有害事象)を防ぐ方策も欠かせない。

IPFと同様、肝硬変もまた線維化病変の進行を特徴とする難治性疾患である。肝臓の線維化の中心的細胞は星細胞と呼ばれる筋線維芽細胞であり、ビタミンA(VA)結合蛋白結合レセプターをもつ。このユニークな特徴を利用して、VAを結合させたリポソームにHSP47 siRNA 内在させ肝硬変を治療する、画期的なデリバリーシステムが開発されている(Sato Y et al. Nat Biotechnol. 2008)。

一方、肺サーファクタント蛋白質(SP)-Aは、TLRを介する自然免疫機構の調整を司っており、細菌、ウイルス、真菌など種々の病原体と結合し、肺胞マクロファージとの相互作用を通して、恒常的に生体から外来因子を排除する働きを持っている。また、肺移植に関する臨床研究では肺内SP-Aが低値であると拒絶反応が亢進し生存率を低下させることを明らかにし(D'Ovidio F, Takahashi H, et al. J Biol Chem 2013)、SP-Aが生理的恒常性の維持に不可欠であることを示唆した。

2. 研究の目的

SP-A補充とHSP47ノックアウトを併用し、II型肺胞上皮細胞のアポトーシスと炎症・線維化を病態の主座とする特発性肺線維症に対する新たな治療戦略を開発することである。そのために先ず、SP-Aがノックアウトされた動物モデルにおいて、肺線維化が増強されること、及び、それがexogenous SP-A投与によって軽減されることを明らかにする。また、HSP47 siRNAを装填したVA結合リポソーム(VA-lip-HSP47 siRNA)を動物モデルに投与し、その治療的効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) endogenous SP-Aが肺傷害及び肺線維化の抑制作用をもっていることの検証

週齢8週の野生型マウス(C57BL/6)またはSP-A(-/-)マウスにマイクロスプレイヤーを用い、プレオマイシン(10mg/kg)を経気道的に単回投与して肺傷害及び線維化肺を作成し、生存期間肺、及び気管支肺胞洗浄液(BALF)の諸成分を比較した。

(2) exogenous SP-Aの経気道的投与が肺傷害及び肺線維化の抑制効果をもつことの検証

C57BL/6マウスを用い、その野生型およびSP-A(-/-)型に肺傷害/肺線維化を作成し、さらに肺コレクチン(SP-A)を経気道投与し、回収されたBALFの諸成分を非投与群と比較した。

(3) VA-lip-siRNA HSP47によるHSP47ノックアウトが肺傷害及び肺線維化の抑制効果を示すことの検証

Sprague-Dawleyラットにマイクロスプレイヤーを用いてBLMを経気道的に単回投与し、同時にVA-lip-siRNA HSP47を週3回経静脈的に投与した。VA-lip-siRNA HSP47を1日目から21日目まで投与し、その効果を病理組織所見、及びBALF諸成分の比較を行った。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスと SP-A(-/-) マウスにブレオマイシン(BLM)を投与されたマウスでは、投与 14 日後の生存率が各々、60%と 0%であった(図1)。また、BLM 投与 7 日目での BALF の検討で、好中球数と TNF- α が有意に増加し、その程度は野生型マウスに比較し SP-A(-/-) マウスにおいて顕著であった。以上の結果から、内因性 SP-A の存在は BLM 肺傷害に対して防御的作用を担っていることが示唆された。

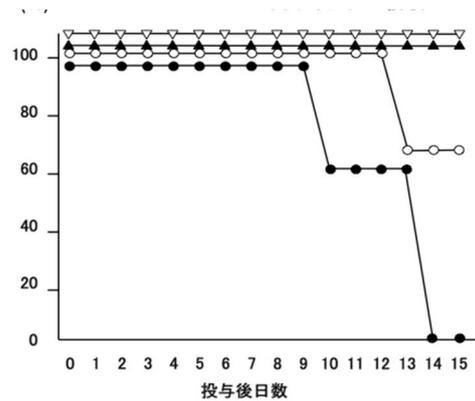


図1. 肺線維症モデルでの生存曲線. 野生型マウス: BLM 投与群(●), コントロール群(○), SP-A(-/-)マウス: BLM 投与群(▲), コントロール群(△)

(2) 野生型および SP-A(-/-)型のいずれにおいても、BALF 中の好中球数増加と TNF- α 増加は、経気道的に SP-A を投与によって抑制された。したがって、SP-A の補給は肺障害/肺線維化を軽減させる可能性のあることが示された。

(3) VA-lip-siRNA HSP47 の投与は明らかに HSP47 発現を抑制し、BLM 単独投与群の肺における筋線維芽細胞のアポトーシスを誘導した。VA-lip-siRNA HSP47 併用投与群は BLM 単独投与群に比較して、肺組織傷害が明らかに軽減した(図2)。また、Hydroxyproline(図3)と炎症性サイトカイン、および BLM 処理群の BALF 中の炎症性細胞数も治 VA-lip-siRNA HSP47 併用により有意に抑制された。

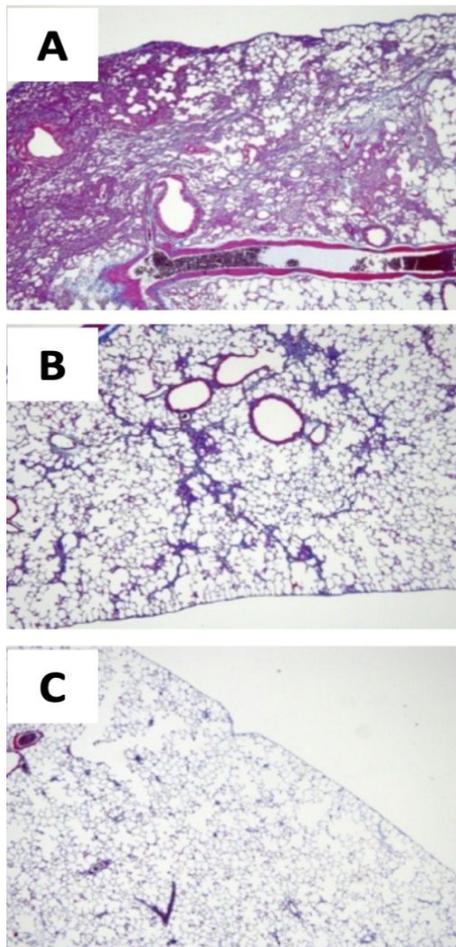


図2. ラット BLM 肺線維症における病理組織所見. BLM 単独 (A) BLM と VA-lip-siRNA HSP47 の併用 (B) コントロール (C)

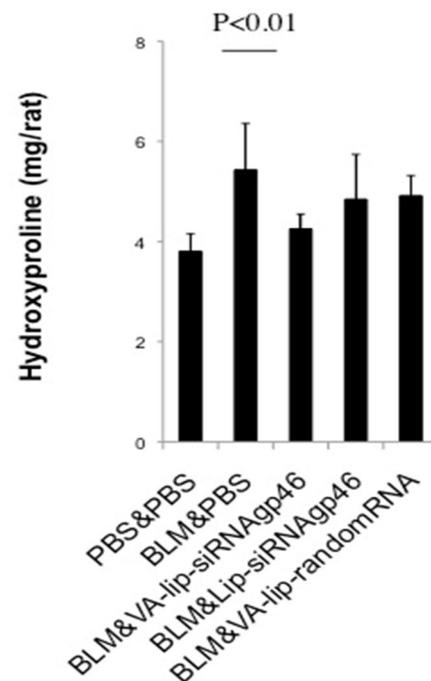


図3. BLM 肺線維症モデルにおける VA-lip-HSP47siRNA の効果

以上より、我々は、SP-A ノックアウトマウスを用いた BLM 肺線維症実験によって、endogenous SP-A が生体内の抗炎症・抗線維化のメカニズムに重要な防御因子として機能していることを明らかにした。さらに exogenous SP-A の補充がそれらの障害を軽減することを示した。一方、肺筋線維芽細胞内の HSP47 を特殊な SiRNA を体内に注入する手法によって、BLM 肺線維症の病変を軽減できることを示した。

今後、VA-lip-HSP47siRNA の効果がマウス実験でも得られることを検証し、exogenous SP-A と VA-lip-HSP47siRNA のコンビネーション投薬が、線維化の予防的効果と治療的効果をもつことをマウス BLM 肺線維症モデルで明らかにする予定である。また、ラット肺胞マクロファージや U937 細胞を用いた BLM 刺激によるサイトカインの制御機構を検討し、また、HEK293 細胞に Toll 様受容体などの遺伝子を導入し、HSP47 誘導シグナルを解明していく。最終的には、SP-A のもつ抗炎症・抗線維化作用と HSP47siRNA 導入によるコラーゲン産生抑制作用を連結させた治療法を開発し、最終的には IPF 患者を対象とする創薬への橋渡し研究へとつなげる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kuronuma K, Takahashi H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Immunogenicity of pneumococcal vaccines in comorbid autoimmune and chronic respiratory diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Vaccin Immunother	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21645515	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shioya M, Otsuka M, Yamada G, Umeda Y, Ikeda K, Nishikiori H, Kuronuma K, Chiba H, Takahashi H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Poorer prognosis of idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis compared with idiopathic pulmonary fibrosis in advanced stage.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Can Respir J	6. 最初と最後の頁 6043053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/6043053.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kuronuma K, Honda H, Mikami T, Saito A, Ikeda K, Otsuka M, Chiba H, Yamada G, Sato T, Yokota SI, Takahashi H.	4. 巻 36
2. 論文標題 Response to pneumococcal vaccine in interstitial lung disease patients: Influence of systemic immunosuppressive treatment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 4968-72.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2018.06.062.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Y, Saito A, Chiba H, Kuronuma K, Ikeda K, Kobayashi T, Arika S, Takahashi M, Sasaki Y, Takahashi H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Impaired diversity of the lung microbiome predicts progression of idiopathic pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respir Res	6. 最初と最後の頁 34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12931-018-0736-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Chiba H, Otsuka M, Takahashi H.	4. 巻 56
2. 論文標題 Significance of molecular biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis: A mini review.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respir Investig	6. 最初と最後の頁 384-391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2018.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda K, Shiratori M, Chiba H, Nishikiori H, Yokoo K, Saito A, Hasegawa Y, Kuronuma K, Otsuka M, Yamada G, Takahashi H.	4. 巻 131
2. 論文標題 Serum surfactant protein D predicts the outcome of patients with idiopathic pulmonary fibrosis treated with pirfenidone.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Respiratoru Medicine	6. 最初と最後の頁 184-191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Otsuka M, Shiratori M, Chiba H, Kuronuma K, Sato Y, Niitsu Y, Takahashi H.	4. 巻 43
2. 論文標題 Treatment of pulmonary fibrosis with siRNA against a collagen-specific chaperone HSP47 in vitamin A-coupled liposomes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Lung Research	6. 最初と最後の頁 271-282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 素子 (Takahashi Motoko) (00303941)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	千葉 弘文 (Chiba Hirofumi) (40347175)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究分担者	大塚 満雄 (Otsuka Mitsuo) (10398323)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
研究分担者	黒沼 幸治 (Kuronuma Koji) (40563250)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	