

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591297
 研究課題名（和文） siRNAを用いたSTAT6を標的とした皮膚アレルギー疾患の遺伝子療法
 研究課題名（英文） Gene silencing of STAT6 with siRNA ameliorates contact hypersensitivity and allergic rhinitis
 研究代表者
 横関 博雄（YOKOZEKI HIROO）
 東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授
 研究者番号：90210608

研究成果の概要（和文）：STAT6 に特異的な siRNA を用いてアトピー性皮膚炎の遺伝子多型のみられる転写調節因子の STAT6 をターゲットとした核酸医薬剤を開発した。この STAT6 siRNA を用いて接触アレルギーのモデルマウスおよびアレルギー性鼻炎のモデルマウスに試みたところ、ともに炎症反応を抑制しうることを明らかにした。STAT6 を制御する核酸医薬剤が接触アレルギー、アレルギー性鼻炎の新規治療法となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We established the gene therapy targeting for STAT6. We demonstrated that gene silencing of STAT6 with siRNA ameliorates both contact hypersensitivity and allergic rhinitis by using model mouse.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2008 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2009 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚炎症・再生学

1. 研究開始当初の背景

(1) アトピー性皮膚炎は、乳幼児に発症し、消退をくり返して難治性の成人型アトピー性皮膚炎と移行する疾患であり、まだその難治化する機序は明らかにされていない。難治化する機序として皮膚バリア機能の異常と Th2 細胞を介する異常の 2 面性がある。特に、後者の Th2 細胞を介した IgE 抗体産生異常に基づく病態形成については、環境アレルゲンの検出と除去以外方法がなく、根本的な治

療法の確立が急務となってきた。今回、本研究ではアトピー性皮膚炎の Th2 細胞を中心とする免疫学的炎症反応の解析と Th2 による IgE 産生異常をターゲットとした新しい治療法を樹立することを目的とする。現在、2%STAT6 decoy 軟膏を開発し臨床研究を施行しているが重症アトピー性皮膚炎の顔面変に有効であることが確認されている。

2. 研究の目的

(1) 近年、干渉 RNA (siRNA) が核酸医薬剤と

して種々の疾患の遺伝子療法として注目されている。siRNA は配列特異的な遺伝子発現阻害が得られ、悪性腫瘍など遺伝子発現に異常を来す疾患に対する遺伝子療法として有望であると考えられている。また siRNA はコレステロール中で非常に安定することが知られ外用剤での皮膚への導入が容易である。今回、この STAT6 に特異的な siRNA を用いてアトピー性皮膚炎の遺伝子多型のみられる転写調節因子の STAT6 をターゲットとした核酸医薬剤を開発して、アトピー性皮膚炎のモデルマウスである IgE 誘導性湿疹反応、反復ハプテン塗布マウス、抗原特異的 IgE 遺伝子導入による慢性皮膚炎症反応に試みることに、Th2 タイプサイトカインである IL-4、IL-13 の重要な転写調節因子である STAT6 を制御する核酸医薬として開発した。Th2 反応を抑制することによりアトピー性皮膚炎の皮膚病変を遺伝子治療できる可能性も検討した。

(2)本研究では、すでに樹立された皮膚アレルギー疾患のモデルマウスを解析することにより病態を解析するとともにこのモデルマウスを用いてシグナル伝達因子、レセプターなどをターゲットとして核酸医薬である siRNA の導入を用いた治療法を開発する目的である。Th2 型細胞を介する IgE 産生異常に基づいた炎症反応の遷延化にたいする治療法を開発することは難治化した本疾患患者の社会復帰を可能とすることで、国民の福祉に寄与するものである。

3. 研究の方法

(1) STAT6 抑制 siRNA の作成

リアルタイム PCR を用いた siRNA による STAT6 抑制効果の検証
実験に使用する small RNA である STAT6 siRNA はハプロファーマ社(株)との共同研究により作製した。強力かつ特異的な RNA 干渉を誘導する理論 4 を基盤として、BLAST Search を行い、さらにこの mRNA の高次構造を予測をすることにより、siRNA の候補配列を決定した。

ウエスタンブロット法を用いた siRNA による STAT6 抑制効果の検証
マウス脾細胞においてすでにリアルタイム PCR で抑制効果のみられた、siRNA をマウス脾細胞に導入して蛋白レベルでも STAT6 が抑制できるか検証。細胞からのタンパク抽出後に電気泳動し、Hybond-P 膜に転写。1 次抗体として、抗 β -actin 抗体と抗 STAT6 抗体を用いた。

線維芽細胞による eotaxin (CCL11)、eotaxin-3 (CCL26) 産生の誘導
STAT6 siRNA 導入 24 時間後に recombinant mouse IL-4 と recombinant mouse TNF-alpha を添加(ヒト正常線維芽細胞では recombinant human IL-4 のみ)、24 時間後に

上清を回収。上清中の eotaxin (CCL11)、eotaxin-3 (CCL26)濃度は ELISA 法により測定した。

(2)アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いた STAT6 siRNA 投与による遺伝子治療の開発
我々はすでに確立したアトピー性皮膚炎のモデルマウスとして湿疹反応が生じる抗原特異的 IgE 誘導性の遅発反応を用いて核酸医薬である STAT6 デコイが有効であることはすでに確認した。本研究では、さらにアトピー性皮膚炎のモデルマウスとして抗原特異的 IgE 遺伝子導入マウス、ハプテン連続塗布マウスを用いて核酸医薬である STAT6 siRNA の効果を解析する。さらに核酸医薬の siRNA 投与により各種のアトピー性皮膚炎モデルマウスの炎症反応が抑制ことが確認されているため、この抑制機序の解析。

(3) STAT 6 siRNA の導入方法の確立
STAT6 siRNA は線維芽細胞に導入した。Lipofectamine™ 2000 を OPTI-MEM® I 245 μ L と混合して、これを STAT6 siRNA と混合。さらに 20 分間静置後に細胞に添加した。

(4) 接触皮膚炎モデルマウスを用いて siRNA の抑制効果の検討
Day 0 に 5% 2,4,6-trinitrochlorobenzene(TNCB)、0.5% 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)、または 5%

4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolone (Oxazolone) を塗布して感作した。その後、Day 5 で耳介に 1% TNCB、0.2% DNFB、または 1% Oxazolone をそれぞれ耳介に 20 μ L 塗布して惹起。接触過敏反応の指標として耳介腫脹を測定した。この接触皮膚炎モデルを用いて siRNA の効果を検証した。

(5) 鼻炎モデルマウスでの検証
Days 0, 7, 14, 21 に ovalbumin (albumin from chicken egg white, Grade V) (OVA) 0.1mg、aluminum hydroxide 1mg (alum)を腹腔内投与して感作。Days 21 から 27 にかけて 0.2mg/day の OVA を連日鼻腔内に吸入させて惹起した。鼻炎の症状の指標として、Day 27 の最終惹起直後に 5 分間あたりのくしゃみと鼻掻き行動の回数をカウントした。鼻炎モデルマウスに siRNA を投与、抑制効果を確認した。

(6) siRNA 外用剤の開発
各種の濃度の siRNA を親水ワセリン剤に 2% に希釈後、アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚に外用。

4. 研究成果

(1) マウス STAT6 siRNA が正常線維芽細胞の STAT6 発現に及ぼす in vitro 効果
今回作成を試みたマウス STAT6 siRNA の候補配列を以下に示す。3 種類の候補、すなわち STAT6 siRNA 1, 2, 3 の全てに線維芽細胞の STAT6 蛋白発現を抑制する効果が見られた

(Fig. 1A)。本研究では3種類の中で最も効率よく STAT6 発現を抑制した STAT6 siRNA 3 を STAT6 siRNA として以後の検討に用いた。まず線維芽細胞を IL-4/TNF- \cdot で刺激した際の eotaxin (CCL11) 産生に対する in vitro 効果を観察した。その結果、STAT6 siRNA は強い抑制効果を示した (Fig. 1B)。マウス STAT6 siRNA 1

5' - GCCGAGGCACCCUGUAUAUCC sense strand
 GACGGCUCCUGGGACAUAUA - 5' anti-sense strand
 マウス STAT6 siRNA 2
 5' - CCUGGUUCUGUAAGGAUUA sense strand
 GGGGACCAAGACAUAUCCUAA - 5' anti-sense strand

マウス STAT6 siRNA 3
 5' - CGAAUGUGAUACAACUGUAUC sense strand
 GAGCUUACACUAUGUUGACAU - 5' anti-sense strand

A

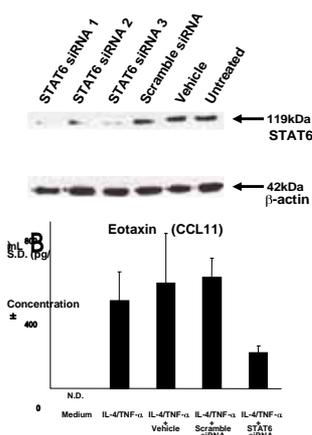


Figure 1: マウス正常線維芽細胞に対する STAT6 siRNA の効果

A) 候補 siRNA による STAT6 タンパク発現の抑制を Western blot 法にて確認した。

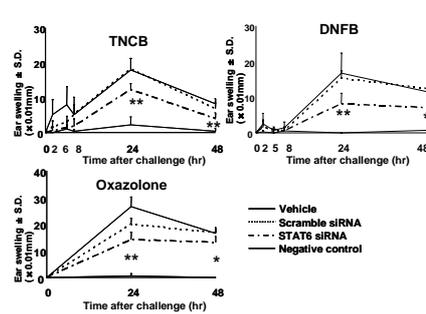
B) IL-4 (10ng/mL) と TNF- \cdot (40ng/mL) の共刺激により産生される eotaxin 濃度を ELISA 法にて定量した。* p<0.01

(2) 接触過敏反応における STAT6 siRNA の in vivo 効果

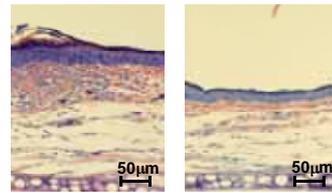
TNCB による接触過敏反応は、STAT6 siRNA の耳介への皮下投与により有意に抑制された (Fig. 2A)。同様の抑制は DNFB や oxazolone に対する接触過敏反応においても認められた。TNCB に対する接触過敏反応を病理標本で検討したところ、STAT6 siRNA は真皮浮腫と細胞浸潤を顕著に抑制していた (Fig. 2B)。

そして単核細胞、好酸球、好中球、脱顆粒している肥満細胞のいずれの細胞数も減少していた (Fig. 3C)。

A



B ギムザ染色所見



Scramble siRNA STAT6 siRNA

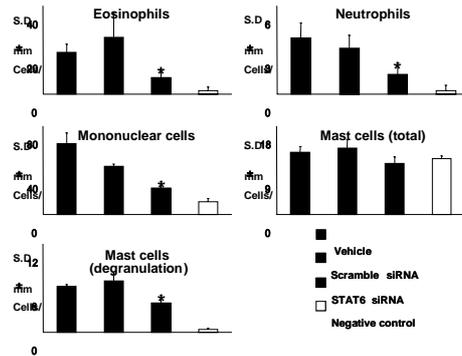


Figure 2: 接触過敏反応に対する STAT6 siRNA の効果

A) 各種ハプテンによるマウス接触過敏反応に対する STAT6 siRNA の抑制効果。* p<0.05, ** p<0.01 B, C) TNCB 接触過敏反応における病理組織学的検討。(ギムザ染色) * p<0.01

(3) STAT6 siRNA 含有軟膏の接触過敏反応への効果

次に STAT6 siRNA 含有軟膏を作成し、外用薬としての効果を検討した。FITC で標識した STAT6 siRNA 軟膏を塗布して惹起から 24 時間後の皮膚の観察により浸潤細胞への STAT6 siRNA の取り込みを確認した (Fig. 3A)。そして STAT6 siRNA 軟膏塗布による効果をみるとコントロール群と比較して耳介腫脹に有意な抑制が得られた (Fig. 3B)。

Figure 3A

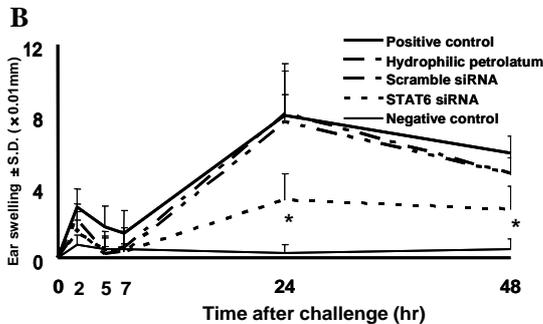
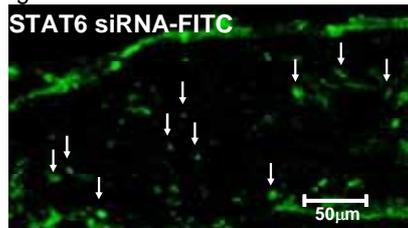
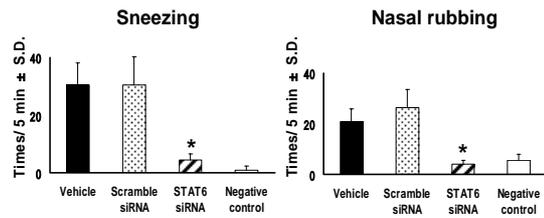


Figure 3: STAT6 siRNA 軟膏の in vivo 効果
 A) FITC 標識 STAT6 siRNA 軟膏の経皮吸収。
 B) TNCB 接触過敏反応に対する STAT6 siRNA 軟膏の抑制効果。* $p < 0.01$

(4) 鼻炎モデルに対する STAT6 siRNA の効果
 OVA 感作マウスの鼻腔に Days 21 から 27 にかけて連日 OVA を吸入させて鼻炎反応を誘発。そして、惹起開始翌日から 3 日間連続して (Days 22, 23, 24) PBS に溶解した STAT6 siRNA (3nmol/day) を鼻腔内に投与して、その治療効果を検討した。その結果、STAT6 siRNA の投与により、くしゃみと鼻かき運動の回数が著明に減少した (Fig. 4A)。炎症反応の抑制は好酸球を含めた細胞浸潤の減少によっても確認された (Fig. 4B)。さらに、鼻炎モデルマウスの頸部リンパ節細胞を in vitro にて OVA で刺激しサイトカイン産生を観察したところ、STAT6 siRNA 投与群で IL-4 と IL-5 産生が低下していた。一方、IFN- γ に関しては有意な差は得られなかった (data not shown)。

A



B

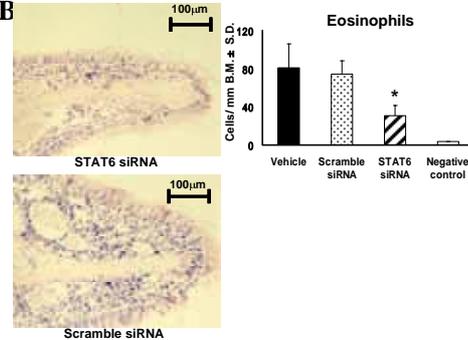


Figure 4: 鼻炎モデルマウスに対する STAT6 siRNA の治療効果

A) 鼻炎モデルマウスのくしゃみと鼻かき運動回数。* $p < 0.00001$ B) 鼻粘膜におけるギムザ染色所見と浸潤好酸球数。* $p < 0.02$

(5) 考案

今回作成を試みたマウス STAT6 siRNA 配列はいずれも in vitro で線維芽細胞の eotaxin 産生を抑制した。そして in vivo でも接触過敏反応の惹起相を減弱させた。その際、耳介組織における Th2 型サイトカイン・ケモカイン産生量も減少していた。このことは作成した STAT6 siRNA が Th2 型反応抑制に特異的であったこと、さらに接触過敏症惹起相において Th2 型サイトカインが重要であることを示している。また、siRNA 軟膏の経皮吸収が可能であった理由は、ハプテンの溶媒 (アセトンなど) や惹起された炎症により角質層にダメージが生じたためと推測される。アレルギー性鼻炎患者病変部での STAT6 発現と症状が相関することも確認されている。そこで OVA を用いたマウスアレルギー性鼻炎モデルにおける STAT6 siRNA の治療効果についても検討を加えた。その結果、STAT6 siRNA の鼻腔内投与は好酸球を含めた粘膜への細胞浸潤を非常に有効に抑制した。さらに非常に興味深いことに惹起 5 分以内に生じるくしゃみや鼻掻き行動も顕著に抑制した。通常、くしゃみや鼻掻き行動は肥満細胞に由来するヒスタミンを介した反応とされており、STAT6 を介した経路とは直接の関連はないと考えられる。しかし、STAT6 siRNA は炎症担当細胞の浸潤を抑制することで、結果的にヒスタミンなどのメディエーターに対する閾値の低下を回避し、くしゃみや鼻掻き行動といった症状を軽減したものと考えられた。以上の結果より、STAT6 siRNA の生体への局

所導入が接触皮膚炎やアレルギー性鼻炎治療の有用な手段になりうることを示された。今後、アトピー性皮膚炎のモデルマウスである抗原特異的 IgE 誘導性遅発反応、第三相反応を用いて STAT siRAN の皮膚症状を改善できるか、さらに解析していく予定である。

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 11 件)

(1) 英文

- Igawa K, Satoh T, Yokozeki H. A therapeutic effect of STAT6 decoy oligodeoxynucleotide ointment in atopic dermatitis: a pilot study in adults. *Br J Dermatol*. 2009 May;160(5):1124-6.
- Niwa H, Satoh T, Matsushima Y, Hosoya K, Saeki K, Niki T, Hirashima M, Yokozeki H. Stable form of galectin-9, a Tim-3 ligand, inhibits contact hypersensitivity and psoriatic reactions: a potent therapeutic tool for Th1- and/or Th17-mediated skin inflammation. *Clin Immunol*. 2009 Aug;132(2):184-94.
- Tanaka T, Satoh T, Yokozeki H. Dental infection associated with nummular eczema as an overlooked focal infection. *J Dermatol*. 2009 Aug;36(8):462-5.
- Ugajin T, Kojima T, Mukai K, Obata K, Kawano Y, Minegishi Y, Eishi Y, Yokozeki H, Karasuyama H. Basophils preferentially express mouse mast cell protease 11 among the mast cell tryptase family in contrast to mast cells. *J Leukoc Biol*. 2009 Aug;18.
- Oiwa M, Satoh T, Watanabe M, Niwa H, Hirai H, Nakamura M, Yokozeki H: CRTH2-dependent, STAT6-independent induction of cedar pollen dermatitis *Clin Exp Allergy*: 38(8):1357-66.2008
- Shimura C, Satoh T, Yokozeki H: Increased expression of hematopoietic prostaglandin D synthase in CCR4-positive T cells from patients with atopic dermatitis: *Acta Derm Venereol*: 88(5):506-8.2008
- Watanabe M, Satoh T, Yamamoto Y, Kanai Y, Karasuyama H, Yokozeki H. Overproduction of IgE induces macrophage-derived chemokine (CCL22) secretion from basophils. *J Immunol*. 2008 Oct 15;181(8):5653-9.

- Yahara H, Satoh T, Hashimoto T, Yokozeki H: Transient macular erythema with eosinophilia in a patient carrying the FIP1L1-PDGFR fusion gene: *Br J Dermatol*: 157(6):1284-7.2008
- Igawa K, Nishioka K, Yokozeki H: Odontogenic focal infection could be partly involved in the pathogenesis of atopic dermatitis as exacerbating factor: *Int J Dermatol*, 46(4):376-9.2007.
- Yokozeki H, Satoh T, Katayama I, Nishioka K: Airborne contact dermatitis due to Japanese cedar pollen: *Contact Dermatitis*, 56(4):224-8.2007.
- Nishizawa A, Nakajima R, Nakano H, Sawamura D, Takayama K, Satoh T, Yokozeki H: A de novo missense mutation in the keratin 13 gene in oral white sponge naevus: *Br J Dermatol*: 159(4):422-3.2008

(2) 和文 (8 件)

- 横関博雄:新しい皮膚科治療 核酸医薬とアトピー性皮膚炎:日皮会誌, 118(13):2892-4.2008
- 横関博雄:発症因子,要因の除去による皮膚症状の改善と予防効果:皮膚の科学, 7(sup10):56-61.2008
- 横関博雄:【復活した好塩基球】好塩基球とは? 好塩基球の最新知見:皮膚アレルギーフロンティア, 6(2):85-90.2008
- 横関博雄:【免疫臓器としての皮膚】皮膚アレルギー疾患としてのアレルギー性接触皮膚炎:アレルギー・免疫, 15(4):502-509.2008
- 横関博雄:皮膚疾患 アトピー性皮膚炎:病期・病態・重症度からみた疾患別看護過程 (医学書院):1558-1574.2008.12月
- 横関博雄:アトピー性皮膚炎,湿疹;接触皮膚炎,湿疹,ステロイド薬が分かる本(宮坂信之編),法研:140-153,2008.6月
- 横関博雄:皮膚疾患、皮膚疾患の診断学,臨床病態学(杉浦雅人編),医歯薬出版:306-312,2008.4月
- 横関博雄:スギ花粉性皮膚炎:総合臨牀, 56(3):627-629.2007.

[学会発表](計 9 件)

- Igawa K, Satoh T, Yokozeki H: A therapeutic effect of STAT6 decoy oligodeoxynucleotides ointment in atopic dermatitis 5th Georg Rajka International Symposium on Atopic Dermatitis: 京都, 2008/05/13

Ugajin T, Kojima T, Obata K, Tsujimura Y, Mukai K, Kawano Y, Satoh T, Minegishi Y, Yokozeiki H, Karasuyama H: Basophils involved in cutaneous allergic responses, detected by newly established mAbs specific to basophil granular enzymes mMCP-8 and mMCP-11: 第5回国際研究皮膚科学会 (IID), 京都, 2008/05/17

Otani S, Satoh T, Yamamoto Y, Hirai H, Narumiya S, Yokozeiki H, Nakamura M: Deficiency of PGD2 receptors, DP and CRTH2, enhances contact hypersensitivity: 第5回国際研究皮膚科学会 (IID), 京都, 2008/05/15

Niwa H, Satoh T, Hosoya K, Hirashima M, Yokozeiki H: The stable form of galectin-9, a ligand for Tim-3, as a novel therapeutic tool for Th1-and/or Th17-mediated skin inflammation: 第5回国際研究皮膚科学会 (IID), 京都, 2008/05/15

Hosoya K, Igawa K, Satoh T, Yokozeiki H: Treatment of the allergic cutaneous inflammation in mouse model by STAT6 inhibition with RNA: 第5回国際研究皮膚科学会 (IID), 京都, 2008/05/15

Watanabe M, Satoh T, Oiwa M, Niwa H, Nakamura M, Yokozeiki H: CRTH2-dependent, STAT6-independent induction of cedar pollen dermatitis: International Investigative Dermatology (IID), Kyoto, 2008/05/15-17

Hosoya K, Satoh T, Yokozeiki H: Therapeutic potential of STAT6 siRNA in contact hypersensitivity: 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 2008/12/01

Igawa K, Yahara H, Kanai Y, Sumi K, Satoh T, Nishioka K, Yokozeiki H: A therapeutic effect of STAT6 decoy oligodeoxynucleotides ointment in atopic dermatitis. 36th Annual European

Igawa K, Yahara H, Kanai Y, Sumi K, Satoh T, Nishioka K, Yokozeiki H: A therapeutic effect of STAT6 decoy oligodeoxynucleotides ointment in atopic dermatitis. 36th Annual European

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: アレルギー疾患の有効な核酸医薬
発明者: 横関博雄、細矢一輝、佐藤貴浩、八

プロファーマ

権利者: 横関博雄、細矢一輝、佐藤貴浩、八
プロファーマ

種類:

番号: 特願 2008-237007

出願年月日: 2008年10月14日

国内外の別: 国内

名称: アレルギー疾患の治療のための核酸医薬

発明者: 横関博雄、細矢一輝、佐藤貴浩、八
プロファーマ

権利者: 横関博雄、細矢一輝、佐藤貴浩、八
プロファーマ

種類:

番号: PCT/JP2009/055383

出願年月日: 2009年3月12日

国内外の別: 国際

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横関 博雄 (YOKOZEKI HIROO)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 90210608

(2) 研究分担者

佐藤貴浩 (SATO H TAKAHIRO)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・准教授(平成21年3月31日まで)

研究者番号: 30235361

(3) 連携研究者

なし