

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18370

研究課題名（和文）難治性敗血症に対するセンスオリゴヌクレオチドを用いた新規核酸薬の開発研究

研究課題名（英文）Development of a new sense oligonucleotide drug targeting inducible nitric oxide synthase for sepsis model rats

研究代表者

中竹 利知（NAKATAKE, Richi）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：40779401

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：細菌やウイルスの感染では、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子（TNF- α ）などの合成や誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）による一酸化窒素（NO）産生が促進し、炎症が全身におよぶ。敗血症の治療において、TNF- α やiNOSなどの発現を抑制することが重要である。報告者は、iNOS mRNA発現や安定化を促進するiNOSアンチセンス転写物と相補的な塩基配列を持つiNOSセンスオリゴヌクレオチドの効果を、ラット敗血症モデルにおいて明らかにした。今回、(1) iNOSセンスオリゴの改良、(2)「生存率をさらに上げる遺伝子」を特定し、その遺伝子mRNAをターゲットとした新規センスオリゴの開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、敗血症に関連する遺伝子の発現を制御することによって、難治性敗血症を治療する新規核酸医薬を開発した。asRNAを介する遺伝子のmRNA発現の調節は、最近明らかになってきた調節機構である。センスオリゴヌクレオチドはasRNAとmRNAとの結合を阻害して、mRNA分解を促進するという独自性を持ち、敗血症に対する革新的な治療法を創造する。本研究における動物実験での解析を基に、ヒトのmRNAに対するセンスオリゴの配列を設計して、ヒト細胞を用いたセンスオリゴの配列や修飾の最適化を行えば、ヒトへの臨床応用の基礎データが得られる。今後、実用的な新規治療薬への開発を推進していく。

研究成果の概要（英文）：Bacterial and viral infections promote the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF- α) and nitric oxide (NO) production by inducible nitric oxide synthase (iNOS), resulting in systemic inflammation. In the treatment of sepsis, it is important to inhibit the expression of TNF- α and iNOS. The applicant revealed the effects of iNOS sense oligonucleotides with a sequence complementary to iNOS antisense transcripts, which promote iNOS mRNA expression and stabilization, in a rat sepsis model. In this study, we will (1) improve iNOS sense oligos and (2) identify "genes that further increase survival" and develop novel sense oligos targeting the mRNA of these genes.

研究分野：外科学

キーワード：敗血症 核酸医薬 センスオリゴヌクレオチド 誘導型一酸化窒素合成酵素 肝細胞

1. 研究開始当初の背景

細菌やウイルスが感染すると、炎症メディエーターである腫瘍壊死因子 α (TNF- α) に引き続き、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 誘導により多量の一酸化窒素 (NO) が合成される。手術後や肝硬変を合併している場合、重篤な敗血症から多臓器不全となって死に至ることが多い。米国では年間 75 万人以上 (日本では 10 万人) が敗血症に罹患し、そのうち 22 万人が死亡している。敗血症に著効を示す薬剤はほとんどなく、治療困難なため死亡率が高く、新規治療法の開発が望まれる。

この病態の主原因は TNF- α と NO の産生の亢進である。TNF- α や iNOS の mRNA 発現を抑制し、TNF- α や NO の量を下げることが、敗血症の治療に大きく寄与する。報告者は iNOS mRNA 安定化を促進する iNOS アンチセンス転写物 (asRNA) に対して、asRNA と相補的な (つまり mRNA と同じ塩基配列を持つ) センスオリゴヌクレオチド、センスオリゴが、細胞内において mRNA 分解を促進することを明らかにした。そして肝障害敗血症モデルラット (GalN/LPS) に対し、配列と修飾の適正化を行った iNOS センスオリゴ (以下 SO1 と呼ぶ) を投与することによって、ラットの生存率が増加することを明らかにした。SO1 は肝臓内の iNOS や TNF- α の mRNA レベルを抑制し、肝病理所見を改善することで肝保護効果を示した (Nakatate et al. Nitric Oxide 72:32-40, 2018)。

敗血症に対する更なる治療成績向上を考え、以下の考察を行った。

- (1) iNOS センスオリゴ SO1 には iNOS mRNA の分解促進に効果的な様々な化学修飾の適正化を行った。さらに、肝細胞に取り込まれやすく化学修飾し (その結果、低用量で効果を発揮する)、投与量を減らすという改良が行えるのでは？
- (2) iNOS センスオリゴ SO1 では、肝障害敗血症モデルラットの生存率が 58% しか改善していない。「生存率をさらに上げる遺伝子」を特定し、その遺伝子 mRNA をターゲットとした新規センスオリゴを開発すれば、100% に押し上げられるのでは？

以上の学術的問いとともに、本研究を取り組むことで、革新的かつ実用的な新規治療の開発を推進し社会的に貢献したいと考えた。

2. 研究の目的

敗血症に対する更なる効果を目指し、(1) iNOS センスオリゴ SO1 の改良、(2) 「生存率をさらに上げる遺伝子」 mRNA をターゲットとした新規センスオリゴの開発、(3) 別機序で効果を示す薬物などの薬剤との併用効果検討を行う。

3. 研究の方法

ラット初代培養肝細胞と肝障害敗血症モデルラットを用いて、以下の計画を立案した。

(1) 初代培養ラット肝細胞と肝障害敗血症モデルラットを用いた SO1 の改良

SO1 に、新たな難分解性の化学修飾 (S 化、LNA、2'-O-メチル化など) や肝細胞に取り込まれやすい化学修飾 (修飾の結果、低用量でセンスオリゴが効くと予想する) をした改良型を作成する。初代培養ラット肝細胞を用いて iNOS mRNA を効率良く阻害するか否かを検討する。続いて肝障害敗血症モデルラットを用いて効果を確認する。

肝障害敗血症モデルは、Sprague-Dawley ラットにガラクトサミン (GalN) とリポ多糖 (LPS) を陰茎静脈より投与して作製する。センスオリゴを投与し、生存率への影響および至適濃度を調べる。肝臓を中心に total RNA を抽出し、TNF- α や iNOS などの関連 mRNA 量を測定する。血清を用いて、ELISA 法によりサイトカインなどタンパク質発現を確認する。

(2) 「生存率をさらに上げる遺伝子」の mRNA をターゲットとした新規センスオリゴの開発

科学研究費 基盤研究 (C) (一般) (H27~H29、研究課題名：新しい核酸医薬で敗血症を治療するための分子基盤の構築、15K08602) において、肝障害敗血症モデルラットの肝臓を摘出して全 RNA を取り、陰性対照ラットの RNA とともにマイクロアレイ解析を行った。代表的な炎症性サイトカインやケモカインなどの mRNA 発現を比較し、顕著に mRNA 量の変化がある

遺伝子を特定することができた（未発表データ）。この中には、TNF- α などの炎症性サイトカインの他、エンドセリンを含む血管拡張物質をコードする遺伝子が含まれている。これらを「障害に関連する候補遺伝子」とした。

前述の如く、SO1の投与によって、肝障害敗血症モデルラットの生存率が58%しか改善していない。マイクロアレイ解析で特定した「障害に関連する候補遺伝子」の発現を抑制することで、100%に生存率を押し上げる可能性を考えた。この候補遺伝子から「生存率をさらに上げる遺伝子」を特定する。

まず、候補遺伝子のasRNAを確認し、asRNAに対するセンスオリゴを設計して、ラット培養肝細胞（IL-1 β 刺激）に導入し、標的候補遺伝子のmRNA量の増減を指標としてセンスオリゴの効果を判定し「生存率をさらに上げる遺伝子」を特定する。そのセンスオリゴをラット敗血症モデルに投与し、効果を確認する。単独投与で効果が十分でなかった場合には、SO1と「生存率をさらに上げる遺伝子」のセンスオリゴのカクテルを検討する。

(3)別機序の効果のある薬物などの薬剤との併用

SO1と従来の別機序の効果のある薬物（例、遺伝子組換えトロンボモデュリン製剤）などの薬剤との併用も視野に入れ、開発を進める。

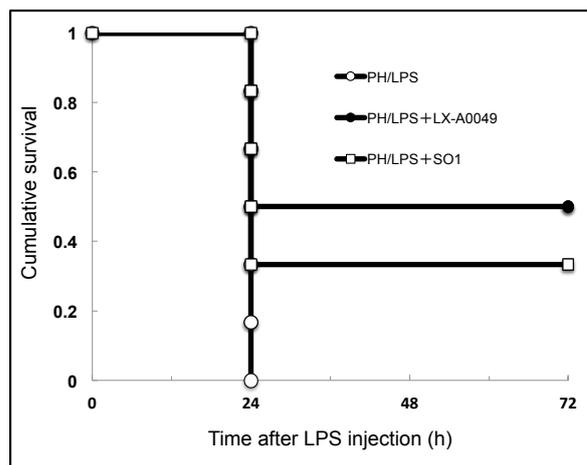
4. 研究成果

(1)iNOSセンスオリゴ（SO1）の改良

SO1の核酸修飾及び肝臓細胞集積能が期待される修飾を搭載し、肝臓に取り込まれやすく改良したセンスオリゴ（LX-A0049と命名）を開発して効果検討した。LX-A0049（8 mg/kg 体重）

はSO1（8 mg/kg）に対して効果が強く現れる可能性が高く、まず低用量（4 mg/kg）の効果検討をラット肝障害敗血症モデルにおいて行った。しかしLX-A0049の効果は認められなかった。GalNは肝臓以外の臓器にも傷害をきたすため、LX-A0049の効果は認めなかったのは、肝臓集積による肝特異性が高くなったと予想された。そこで、肝臓でのLX-A0049の効果を検討するため、肝臓のみを切除し肝不全とした70%肝切除後敗血症ラットモデル（PH/LPS）を用いて検討を行った。

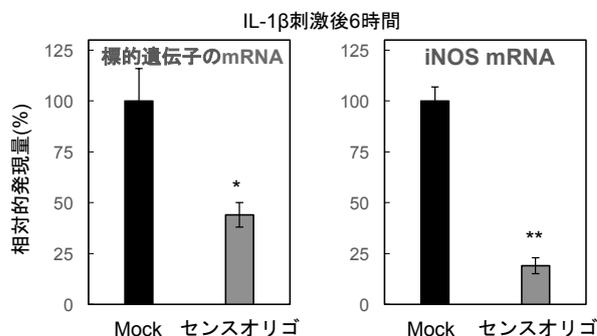
70%の肝臓切除後にLPS（25 μ g/kg）を投与して敗血症状態を作成した。LPSと同時にSO1（8 mg/kg）ならびにLX-A0049（4 mg/kg）を投与して72時間生存率を確認し、LX-A0049の生存率の延長効果を優位に認めた（右図）。



(2)他の新規センスオリゴの開発

まずTNF- α mRNAに対するセンスオリゴを作成した。ラット初代培養細胞でのiNOSやTNF- α などの標的候補遺伝子のmRNA量の増減を指標として効果を判定して、最も効果のあった配列のセンスオリゴを確認した。最適化を行ったTNF- α に対するセンスオリゴ（8 mg/kg）を、ラット肝障害敗血症モデルに投与し生存実験を行ったが、改善傾向は見られたものの有意な効果を認めなかった。またSO1とTNF- α のセンスオリゴをカクテル投与するも、こちらも効果は認めなかった。

続いてIL-1シグナル伝達系のセンスオリゴを見出した（右図）。今後、PH/LPSラットモデルへ投与し、生存実験を行う。

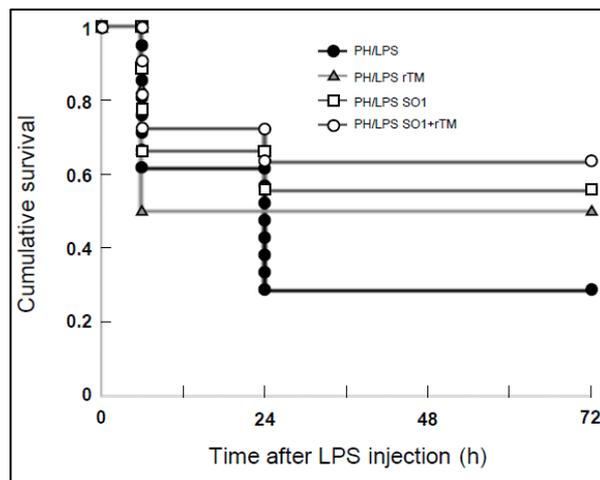


IL-1シグナル伝達系遺伝子を標的とするセンスオリゴの効果

(3)別機序の効果のある薬物などの薬剤との併用

ヒト敗血症領域で、汎発性血管内血液凝固症に対して使用される遺伝子組換えトロンボモジュ

リン製剤(rTM)とSO1の併用効果を検討した。rTMはトロンビンによる血液凝固作用を調節する薬剤であり、加えて多様な機序で抗炎症作用も発揮する。PH/LPSラットモデルを用いて相乗効果の検討を行った。70%の肝臓切除後にLPS(25 µg/kg)を投与して敗血症状態を作成した。LPSと同時にSO1(8 mg/kg)ならびにrTM(0.02 mg/kg)を投与して72時間生存率を確認し、併用群の生存率の延長効果を優位に認めた。今後、メカニズムの解析を行い、他モデルへの応用実験も行う。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Liu Wen-Jia, Ernst Lisa, Doorschodt Benedict, Bednarsch Jan, Becker Felix, Nakatake Richi, Masano Yuki, Neumann Ulf Peter, Lang Sven Arke, Boor Peter, Lurje Isabella, Lurje Georg, Tolba Ren?, Czigan Zoltan	4. 巻 162
2. 論文標題 Orthotopic Kidney Auto-Transplantation in a Porcine Model Using 24 Hours Organ Preservation And Continuous Telemetry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e61591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/61591	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 Matsushima Hideyuki, Hishikawa Hidehiko, Miki Hirokazu, Hatta Masahiko, Nakatake Richi, Okumura Tadayoshi, Nishizawa Mikio, Kaibori Masaki, Sekimoto Mitsugu	4. 巻 7
2. 論文標題 Cinnamomi Cortex and Scutellariae Radix in the Japanese herbal medicine Kampo saireito inhibit expression of iNOS through different mechanisms in hepatocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Traditional & Kampo Medicine	6. 最初と最後の頁 38 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tkm2.1241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 中竹 利知・奥山 哲矢・小塚 雅也・西澤 幹雄・関本貢嗣	4. 巻 2
2. 論文標題 センスオリゴヌクレオチドを用いた難治性敗血症に対する新規核酸薬の開発研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 39-40
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakatake Richi, Hishikawa Hidehiko, Kotsuka Masaya, Ishizaki Morihiko, Matsui Kosuke, Nishizawa Mikio, Yoshizawa Katsuhiko, Kaibori Masaki, Okumura Tadayoshi	4. 巻 64
2. 論文標題 The Proton Pump Inhibitor Lansoprazole Has Hepatoprotective Effects in In Vitro and In Vivo Rat Models of Acute Liver Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 2854 ~ 2866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-019-05622-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueyama Yosuke, Tokuhara Katsuji, Miki Hirokazu, Nakatake Richi, Sakaguchi Tatsuma, Nishizawa Mikio, Kaibori Masaki, Okumura Tadayoshi	4. 巻 243
2. 論文標題 Active Hexose Correlated Compound Has Protective Effects in Ischemia/Reperfusion Injury of the Rat Small Intestine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 265 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jss.2019.05.047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuda Takumi, Miki Hirokazu, Nakatake Richi, Sakaguchi Tatsuma, Hatta Masahiko, Okumura Tadayoshi, Nishizawa Mikio, Kaibori Masaki	4. 巻 2
2. 論文標題 Essential amino acid tryptophan inhibits induction of inducible nitric oxide synthase gene expression in interleukin-1 stimulated hepatocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioactive Compounds in Health and Disease	6. 最初と最後の頁 170 ~ 182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31989/bchd.v2i7.639	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 Matsushima Hideyuki, Kaibori Masaki, Hatta Masahiko, Ishizaki Morihiko, Nakatake Richi, Okumura Tadayoshi, Yoshii Kengo, Todo Tomoki	4. 巻 10
2. 論文標題 Efficacy of a third-generation oncolytic herpes simplex virus in neuroendocrine tumor xenograft models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 7132 ~ 7141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27391	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Richi Nakatake, Hidehiko Hishikawa, Masaya Kotsuka, Katsuhiko Yoshizawa, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura, Rene H. Tolba and Mitsugu Sekimoto
2. 発表標題 Protective effect of the proton pump inhibitor lansoprazole in lethal acute liver failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in rats.
3. 学会等名 55th Congress of the European Society for Surgical Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Richi Nakatake, Tetsuya Okuyama, Masaki Kaibori, Tadayoshi Okumura, Mitsugu Sekimoto, Rene H. Tolba and Mikio Nishizawa.
2. 発表標題 The protective effects of a sense oligonucleotide drug targeting inducible nitric oxide synthase for a rat model of acute liver injury.
3. 学会等名 International Liver Congress 2020. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tetsuya Okuyama, Airi Ihara, Richi Nakatake, Masaki Kaibori, Tadayoshi Okumura, Mitsugu Sekimoto, Yukinobu Ikeya and Mikio Nishizawa.
2. 発表標題 Effects of a Citrus fruit extract on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interleukin-1-treated rat hepatocytes
3. 学会等名 42th ESPEN Congress on Clinical Nutrition and Metabolism. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 M. Kotsuka, M. Hatta, H. Matsushima, H. Hishikawa, H. Miki, R. Nakatake, T. Okumura, M. Nishizawa, M. Kaibori and M. Sekimoto.
2. 発表標題 Cinnamomi Cortex and Scutellariae Radix in Japanese herbal medicine Kampo saireito inhibit expression of iNOS through different mechanisms in hepatocytes.
3. 学会等名 42th ESPEN Congress on Clinical Nutrition and Metabolism. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中竹利知、菱川秀彦、奥山哲矢、小塚雅也、西澤幹雄、海堀昌樹、奥村忠芳、関本貢嗣
2. 発表標題 ラット肝障害敗血症モデル (in vitro and in vivo) を用いたプロトンポンプ阻害薬 lansoprazol 肝保護効果の検討
3. 学会等名 第57回日本外科代謝栄養学
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Richi Nakatake, Takumi Tsuda, Hirokazu Miki, Tatsuma Sakaguchi, Masaya Kotsuka, Masaki Kaibori, Tadayoshi Okumura, Mikio Nishizawa, and Mitsugu Sekimoto.
2. 発表標題 Essential amino acid tryptophan has a liver-protective effect through the suppression of inducible nitric oxide synthase in primary cultured rat hepatocytes.
3. 学会等名 41th Espen Congress on Clinical Nutrition & Metabolism. (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Masaya Kotsuka, Richi Nakatake, Yuki Hashimoto, Masahiko Hatta, Terufumi Yoshida, Masaki Kaibori, Mikio Nishizawa and Mitsugu Sekimoto.
2. 発表標題 Omeprazole Inhibits a Production of Proinflammatory Biomarker Nitric Oxide in Interleukin-1 Stimulated Hepatocytes
3. 学会等名 41th Espen Congress on Clinical Nutrition & Metabolism. (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

〔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
研究協力者	西澤 幹雄 (NISHIZAWA Mikio) (40192687)	立命館大学・生命科学部・教授 (34315)	
研究協力者	奥山 哲矢 (OKUYAMA Tetsuya) (80614966)	関西医科大学・医学部・博士研究員 (34417)	
研究協力者	小塚 雅也 (KOTSUKA Masaya)	関西医科大学・医学部・大学院生 (34417)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	奥村 忠芳 (OKUMURA Tadayoshi) (80113140)	関西医科大学・医学部・研究補助員 (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関