

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17日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590967

研究課題名（和文） 閉塞性肺疾患における細胞間相互作用を標的とした siRNA 療法をめざす基盤研究

研究課題名（英文） Preclinical study for therapy with siRNA targeting cell-to-cell communications in obstructive lung diseases

研究代表者

松元 幸一郎（MATSUMOTO KOICHIRO）

九州大学病院・呼吸器科・講師

研究者番号：60325462

研究成果の概要（和文）：COPDや喘息などの閉塞性肺疾患へのsiRNA療法をめざす研究を遂行した。標的細胞はCD86を高発現する樹状細胞である。マウス骨髄から分化誘導した樹状細胞のCD86発現をsiRNAは抑制し、Th2活性化によるIL-5、IL-13の産生を抑制した。さらにマウス喘息モデルにおいてsiRNAの気道内投与は好酸球性炎症を抑制しIL-5、IL-13の産生を抑制した。またsiRNAは気道反応性を抑制し、血清中の抗原特異的IgE上昇を有意に抑制した。気道の樹状細胞を標的とするsiRNAは閉塞性肺疾患に対する核酸医学の治療的応用として有望と考えられた。

研究成果の概要（英文）：In COPD and asthma, the signalings among a variety of inflammatory cells and tissue-structural cells play a pivotal role in the development of diseases. These signalings are partly mediated via interaction with costimulatory molecules. The B7-family molecule CD86, expressed on the surface of dendritic cells (DCs), delivers costimulatory signals for the interaction with T cells. Using small interfering RNA (siRNA)-based approach, we investigated the therapeutic effect of CD86 knockdown on a mouse model of asthma. We prepared bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs). CD4⁺ cells were isolated from the spleens of DO11.10 mice by magnetic beads sorting method (MACS), cocultured with antigen-presenting cells, recombinant IL-4, and anti-IL-12 mAb, and then used as OVA-specific Th2 cells. BMDCs were transfected with CD86 siRNA or control siRNA, pulsed with OVA peptides and LPS, and then cocultured with Th2 cells for 24hr. The culture supernatant was collected for cytokine ELISA. The levels of IL-4, IL-5, and IL-13 in culture supernatant were significantly reduced by CD86 siRNA treatment of BMDCs. Next, we tested the therapeutic effects of CD86 siRNA for OVA-induced mouse model of asthma. CD86 siRNA or control siRNA was administrated via the intratracheal route during the OVA challenge. In microscopic study, The fluorescent-probed siRNA was successfully deposited beneath airway submucosa. The administration of CD86 siRNA significantly decreased eosinophil number and levels of IL-5 and IL-13 in the bronchoalveolar fluid, airway hyperreactivity to inhaled acetylcholine, and a level of OVA-specific IgE in the serum. These findings suggest that siRNA treatment targeting airway DCs might be of value in the development of new nucleic acid therapies for obstructive lung diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1600000	480000	2080000
2010年度	1000000	300000	1300000
2011年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：閉塞性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) COPDの原因は喫煙や大気汚染による有害ガスの慢性的吸引であり、末梢気道から肺胞領域にかけてを病変の主座とし、好中球・マクロファージ・CD8Tリンパ球などによる炎症と病変部の破壊的变化によって特徴づけられる。一方、喘息の原因はアトピー素因や気道過敏性であり、全気道系におよぶ好酸球・肥満細胞・CD4Tリンパ球などによる炎症と気道リモデリングによって特徴づけられる。相違点はあるものの、慢性炎症に由来する airflow 制限が症状を引き起こす点では類似している。実際、標準的治療の根幹をなすのは β 2刺激剤や抗コリン剤などの気管支拡張剤と吸入ステロイド剤を主とする抗炎症剤である。これらの薬剤を重症度に応じて段階的に使用する治療法の普及（治療ガイドラインに基づく）によって、多くの患者に症状の改善がもたらされている。

(2) しかしながら、現在までの治療法では達成できていない課題も少なくない。COPDの場合、肺機能の過剰な経年変化によって把握される病変の持続的進行については、上記薬物療法のいずれも阻止できていない。これはCOPDの炎症が副腎皮質ステロイド系の薬剤のみでは制御し難い過程を多分に含んでいることを示唆している。一方、気管支喘息の炎症は副腎皮質ステロイド系の薬剤で抑制されやすいが、原因抗原に対する永続的な無反応状態を誘導（免疫学的寛容）することはできていない。さらにいずれの疾患とも、ライノウイルスや呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザウイルスなどの気道ウイルス感染による急性増悪を予防することは困難である。このようなステロイド抵抗性の炎症に関与する分子機構を解明し、特異的に障害する治療法を開発することが求められている。

(3) 以前よりわれわれはIL-13を経気道的に投与することで喘息モデルを作成し、ステロイド抵抗性に関わる病態の解明をすすめてきた。また、免疫細胞や組織構成細胞上に発現する共刺激分子とよばれる機能分子に着目し、基盤研究C（課題番号16590750）の補助を受け、喘息やウイルス感染における役割について阻害抗体や遺伝子欠損マウスなどを用いて明らかにしてきた。その一部はウイルスが宿主の免疫反応を回避するエスケープ機構として機能する場合があり、その候補分子としてB7-H1を見いだしている。さらにその発現がステロイド抵抗性であることも

明らかになった。

(4) これらの炎症を検討する過程で、炎症細胞間、あるいは炎症細胞と組織構成細胞間の接触を介したシグナル伝達が重要な役割を果たしていることを認識するようになった。しかもシグナル伝達は方向性とは限らず、しばしば両方向性に機能し病態を成立させている。共刺激分子CD86の発見者である東みゆき博士は、最近、皮膚炎モデルでCD86を標的としたsiRNAを含有する軟膏の局所投与が皮膚の樹状細胞の機能制御を介して皮膚炎を改善することを報告した（Ritprajak et al. 2008, Mol Ther）。このことは、細胞間相互作用を標的にする核酸医学が有望であることを強く示唆する。

2. 研究の目的

標的分子の機能制御は全身的副作用のリスクを軽減する見地からできるだけ局所（呼吸器）に留まることが望ましい。われわれは臨床で使用されているものと同様の原理に基づいた小動物用の吸入麻酔装置を導入し、安全かつ効率的にマウスに抗原や薬剤を経気道投与する実験系を確立した。この実験系を適用し、閉塞性肺疾患の細胞間相互作用を標的とするsiRNA療法をめざし、動物実験レベルの基盤的研究を構想した。その第一候補としてCD86を選択した。

3. 研究の方法

(1) 先述した東らの論文に基づいてマウスのCD86を標的とするsiRNAとコントロールスクランブルsiRNAを作成した。siRNAの標的細胞はCD86を高発現する樹状細胞であるため、BALB/c系のマウス骨髄からGM-CSF添加培養によって分化誘導した樹状細胞をLPSで刺激してCD86発現を誘導した。発現の評価は蛍光色素をラベルした抗CD86抗体を用いたフローサイトメトリー法によった。さらに卵白アルブミン特異的T細胞受容体を強制発現させた遺伝子改変マウスであるD011.10マウスの脾臓から磁気ビーズ式細胞分離法によってCD4T細胞を分離し、おなじく脾臓から収集した抗原提示細胞存在下にIL-4、抗IL-12抗体、および卵白アルブミン刺激を繰り返すことによって卵白アルブミン特異的なTh2細胞を分化誘導し、抗原と樹状細胞と共培養する実験系を確立した。

(2) BALB/cマウスに高純度に精製した卵白アルブミンを抗原、水酸化アルミニウムゲルを

アジュバントとして2回にわたり腹腔内投与し、卵白アルブミンに対するTh2タイプの感作を成立させた。感作2週間後に卵白アルブミンを超音波ネブライザーで計3日間吸入曝露し、アレルギー性気道炎症を惹起させた。抗原の吸入曝露期間の直前とその途中に吸入麻酔下でsiRNAを気道内投与し、気管支肺細胞洗浄液中の炎症細胞分画の解析やELISAによるサイトカインの測定、吸入アセチルコリンに対する気道反応性の評価、血清中の抗原特異的IgEの測定などを実施し、喘息反応への影響を検討した。これらの検討は卵白アルブミン最終曝露から36時間後におこなった。アレルギー性炎症による気道リモデリングはMUC5AC発現のRT-PCRによる解析およびPAS染色法による杯細胞過形成の半定量的評価によって検討した。蛍光プローブ標識siRNAの気管内投与により標識siRNAの気道粘膜への沈着を検討した。また気道粘膜内のCD86陽性細胞の数量的評価については蛍光顕微鏡下の盲検式形態計測法を採用した。

4. 研究成果

(1)マウス骨髄由来樹状細胞のLPS刺激により、CD86の発現が増強することをフローサイトメトリーにて確認した。このCD86誘導をCD86siRNA処置は有意に抑制したがコントロールであるスクランブルsiRNAは影響を与えなかった。樹状細胞とTh2細胞との抗原添加共培養系においてCD86siRNAはTh2の活性化によるIL-5、IL-13の産生を有意に抑制した。これらのことから作成したCD86siRNAがCD86発現抑制によってTh2細胞の活性化を抑制しうることをin vitroで明らかにすることができた。

(2)蛍光プローブ標識したダミーのsiRNAの気管内投与により標識siRNAが気道粘膜上皮直下へ数時間にわたって沈着・滞留することを確認することができた。CD86siRNA投与によって気道粘膜組織内でのCD86陽性細胞は有意に減少した。コントロールスクランブルsiRNAは影響を与えなかった。CD86siRNA気管内投与は卵白アルブミン吸入曝露によって生じる好酸球性気道炎症を抑制し、IL-5、IL-13の産生を抑制したが、Th1サイトカインであるIFN-gammaの産生には影響を与えなかった。さらに、siRNAは吸入アセチルコリンに対する気道反応性を部分的に抑制し、血清中の卵白アルブミン特異的IgE上昇をも有意に抑制した。一方、杯細胞過形成やMUC5ACmRNA発現で評価した気道リモデリングへの影響は明らかではなかった。

以上の成果に基づき、気道の樹状細胞を標的とするsiRNA投与は、閉塞性肺疾患に対する核酸医学の治療的応用として有望と考えら

れた。今後は他の共刺激分子を標的としたsiRNAを作成し、各種呼吸器疾患モデルにおける有効性を検証する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件) 現在、peer reviewerによる査読制度を有する国際学術誌への投稿を準備中

[学会発表] (計3件)

①浅井友香里 (代表)、マウスアレルギー性喘息モデルに対するCD86siRNA療法の検討、第60回日本アレルギー学会秋季学術講演会、2010年11月25日、東京国際フォーラム

②Asai Yukari (代表)、Small interfering RNA against CD86 attenuates allergic airway inflammation、第61回日本アレルギー学会秋季学術講演会、2011年11月10日、東京都グランドプリンスホテル新高輪

③浅井友香里 (代表)、マウスアレルギー性喘息モデルに対するCD86siRNA療法の検討、第52回日本呼吸器学会学術講演会、2012年4月22日、神戸国際展示場

[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:特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

松元 幸一郎 (MATSUMOTO KOICHIRO)

九州大学病院・呼吸器科・講師

研究者番号：60325462

(2)研究分担者

福山 聡 (FUKUYAMA SATORU)
九州大学病院・呼吸器科・助教

研究者番号：50380536

井上 博雅 (INOUE HIROMASA)
鹿児島大学大学院医歯薬総合研究科・呼吸器
内科学・教授

研究者番号：30264039

(3)連携研究者：なし