

機関番号：20101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790777

研究課題名 (和文) 肺筋線維芽細胞に HSP47siRNA 特異的導入による肺線維症治療薬の開発

研究課題名 (英文) Effect of HSP47siRNA targeting to the lung myofibroblast on bleomycin-induced pulmonary fibrosis

研究代表者

大塚 満雄 (MITSUO OTSUKA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10398323

研究成果の概要 (和文)：

筋線維芽細胞での HSP47 の発現を特異的にブロックするために、VitaminA を用いたドラッグデリバリシステムを開発した。本ドラッグデリバリシステムを用いて HSP47siRNA を肺筋線維芽細胞に特異的に導入させ、肺線維症治療効果があるかどうか検討した。ラット肺線維症モデルに対して HSP47siRNA の投与により、肺線維化抑制効果を確認した。その線維化抑制メカニズムは、直接的なコラーゲン産生抑制だけではなく、サイトカイン産生抑制や筋線維芽細胞のアポトーシス誘導も関与していることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Expression of HSP47 increases in parallel with expression of collagens during the progression of lung fibrosis. Myofibroblasts are increased in active lung fibrotic areas and overexpress of the HSP47. It is expected that to control of the expression of the HSP47 in the myofibroblasts may reduce of the lung fibrosis. To investigate whether inhibition of HSP47 of the myofibroblasts with siRNA could have beneficial effects in rat bleomycin lung fibrosis models. We made rat bleomycin lung fibrosis models and injected of vitaminA-coupled liposomes carrying HSP47siRNA in rat tail vein. In rats treated with vitaminA-coupled liposomes carrying siRNA, lung fibrosis was significantly improved morphological changes and the increase of the contents of the lung hydroxyproline. Furthermore the increase of the inflammatory cytokines was reduced and the myofibroblasts were induced to apoptosis. These results suggest that HSP47siRNA improves bleomycin lung fibrosis and this drug delivery system using the vitaminA are useful methods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
平成 22 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：肺線維症、HSP47、siRNA

1. 研究開始当初の背景

肺線維症の病理変化は概ね非可逆的な病態であり、最終的には呼吸不全にいたる予後不良な疾患である。しかし現在のところ線維化を強力に抑制する治療薬は無く、今後更なる画期的新規治療法の開発が渴望されている。

筋線維芽細胞は肺線維化促進の根幹的細胞であると考えられている。肺線維化の初期段階においては、正常肺にみられない筋線維芽細胞が増殖し、活発にコラーゲン線維を産生、線維化病巣の形成に中心的な役割を果たしている。

HSP (Heat Shock Protein) 47 は、細胞小胞体内でコラーゲン合成に関与する重要な分子シャペロンである。組織線維化を起こす疾患では、過剰な HSP47 の発現が確認されており、HSP47 の過剰発現がコラーゲンの異常蓄積を促進すると考えられる。事実、各種慢性線維化疾患において、HSP47 とコラーゲンの異常発現亢進が同時に観察されるとの既報告がある。したがって、過剰発現する HSP47 を強く抑制できれば、線維化疾患の新たな治療戦略への道が開ける。しかし、現在のところ、HSP47 を特異的に抑制可能な薬剤は開発されていない。この研究分野の方向性として、HSP47 遺伝子レベルで発現を直接制御する手法に関心が集まっている。

肺線維症においても、HSP47 の過剰発現が報告されている。ブレオマイシン肺線維症動物モデル、肺線維症患者の肺組織では、増殖した筋線維芽細胞に HSP47 の過剰発現が認められる。HSP47 の発現抑制が肺線維化抑制に有効であると予想される。

最近、新たなドラッグデリバリシステムの開発が、本学内科学第四講座の研究チームによって達成された。肝硬変治療を目的に施行された研究であり、Vitamin A (VA) を用いて HSP47siRNA を特異的かつ効率的に肝筋線維芽細胞 (肝星細胞) に取り込ませることを可能にした。VA とリポソームの複合体を作成し HSP47siRNA を被包化してラット肝硬変モデルに投与したところ、肝星細胞に retinol binding protein receptor (RBP receptor) を介して選択的に HSP47siRNA が取り込まれ、不可逆的と考えられていた肝硬変の改善が認められた (Sato Y et. al Nat Biotechnol. 2008 Apr; 26(4): 431-42)。肝星細胞は、VA を取り込む貯蔵細胞でもあり、VA を RBP receptor を介して細胞内に取り込む特異的な性質がある。同研究チームの成果はその特性をうまく応用したものである。

一方、肺筋線維芽細胞に RBP receptor が存在するかどうかはいまだ明らかではないが、肺筋線維芽細胞においても VA が貯蔵さ

れることが報告されており、肺筋線維芽細胞にも RBP receptor が存在していると考えられる。同手法を用いることで肺筋線維芽細胞にも特異的に HSP47siRNA を導入することが可能と考えられ、肺線維症においても線維化抑制効果が期待できる。

2. 研究の目的

HSP47 は、コラーゲン合成に必須の分子であり、その過剰発現が肺線維化に促進的に働いているとされる。肺線維症では線維化の強い部位に筋線維芽細胞の増加が見られ、その筋線維芽細胞では活発にコラーゲン線維を産生している。そのため、肺筋線維芽細胞での HSP47 の発現を抑制することにより肺線維化を抑制することができると予想される。本研究の目的は、1) HSP47 の発現を siRNA を用いた遺伝子ノックアウト法を用いて抑制し、肺線維症動物モデルを用いて肺線維化抑制効果を確認すること、2) 標的細胞である肺筋線維芽細胞の細胞特異性に着目し、選択的に siRNA を導入するためのドラッグデリバリシステムを確立する、ことである。

3. 研究の方法

(1) ラットブレオマイシン肺線維症モデルの作成

S-D 雄性ラットに対して、ブレオマイシン 0.5mg を 0.5cc の生理食塩水に溶解し経気管的に肺内投与し、ブレオマイシン肺線維症モデルを作成する。

(2) ラット肺線維症モデルにおける筋線維芽細胞、HSP47 の発現状況の検討

作成したラット肺線維症モデルのホルマリン固定肺、凍結肺を用いて、筋線維芽細胞マーカーである α -smooth muscle actin

(SMA) と HSP47 の発現状況の変化を免疫染色法を用いて筋線維芽細胞と HSP47 の発現と分布状況を検討する。

(3) HSP47siRNA による肺線維化抑制効果の検討

Sato らの報告と同じ、ヒト HSP47 のラットホモログである gp46 を標的とする siRNA を作成した。VA とカチオニックリポソームである LipotrustTM をモル比 2 : 1 で混合し、VA とリポソームの複合体を作成した。これに siRNA を被包化させた (VA-siRNA)。0.75mg / kg の siRNA を含む VA-siRNA をブレオマイシン投与と同時に週 3 回尾静脈より投与した。BLM 投与 VA-lip-siRNA 投与群

(BLM-VA-HSP47siRNA) の他、コントロールとして、PBS-PBS 群、BLM-PBS 群、

BLM-HSP47siRNA 群、BLM-VA-randomRNA 群で評価した（プロトコール 1）。21 日目に屠殺し肺を摘出した。ホルマリン固定により HE 染色を行い、線維化抑制効果を確認した。さらに摘出した肺中の肺ヒドロキシプロリン量を測定し、膠原線維の産生抑制効果を確認した。次に肺線維化が完成した 15 日目より VA-HSP47siRNA 経静脈的に週 3 回 3 週間投与し、肺線維化改善効果があるかどうかを確認した（プロトコール 2）。

HSP47 の産生抑制状況の確認のため、免疫染色法を用いての肺組織での HSP47 の発現状況の変化、ホモジナイズした肺組織中に含まれる HSP47 を Western blot 法を用いての発現状況の経時的変化を確認した。

さらに、 α -SMA に対する免疫染色を行い、筋線維芽細胞の増殖に与える変化を検討した。

（4）HSP47 抑制による急性肺障害に与える影響の検討

気管支肺胞洗浄液をサンプリングし、肺胞洗浄液中に含まれる炎症細胞数の計測、肺胞洗浄液中の TGF- β 1、肺組織中の IL-1 β を ELISA にて測定し、急性肺障害に与える影響について検討した。

（5）HSP47 抑制におけるアポトーシスに与える影響

HSP47 を抑制することによるアポトーシスへ与える影響を検討するため、TUNEL 染色を行い組織学的にアポトーシス誘導について評価した。

4. 研究成果

（1）肺組織中の HSP47 の発現を確認するために、抗 HSP47 抗体を用いて ABC 法で免疫染色を行った。正常肺では、HSP47 の発現は肺胞 II 型上皮細胞に弱く発現を認めた。ブレオマイシン肺線維症モデルを作成し、ブレオマイシン投与後 21 日目の線維化が完成した時期では、HSP47 は線維化巣に強く発現を認め、肺胞 II 型上皮細胞のほか線維芽細胞での発現を認めた。 α SMA との 2 重染色を行ったところ、HSP47 と α SMA と共発現している紡錘状の細胞を認め、筋線維芽細胞にも HSP47 が発現していることを確認した。

（2）ブレオマイシン肺線維症モデルにおける HSP47siRNA の肺線維化抑制効果を検討した。プロトコール 1 のブレオマイシン投与後 21 日目の肺組織は、BLM-VA-HSP47siRNA 群では他の群と比べて明らかに線維化巣の軽減、胞隔の肥厚の軽減、炎症細胞浸潤の減少を認めた。肺組織中のヒドロキシプロリン量は、BLM-VA-HSP47siRNA 群では増加は認めず

BLM-PBS 群と比べて有意な差を認めた。

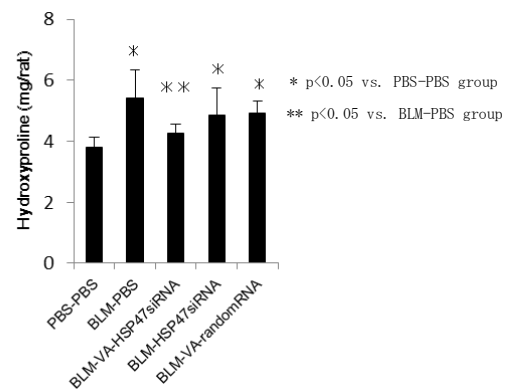


図 1 プロトコール 1 におけるブレオマイシン投与 21 日目の肺組織中のヒドロキシプロリン量。

肺組織を抗 HSP47 抗体で免疫染色を行ったところ、BLM-VA-HSP47siRNA 群の肺組織では線維化巣における HSP47 の発現は減少していた。肺ホモジネート中の HSP47 の発現を western blot 法でも評価したが、BLM-VA-HSP47siRNA 群は発現の減少が認められた。

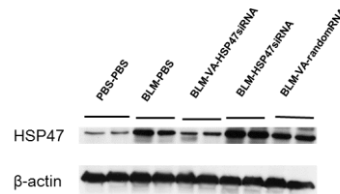


図 2 プロトコール 1 における肺組織中 HSP47 の発現。

プロトコール 2 では、肺組織では、BLM-PBS 群と比べて BLM-VA-HSP47siRNA 群では線維化巣の縮小を認めた。肺組織中のヒドロキシプロリン量も、BLM-PBS 群と比べて有意な増加の抑制が見られた。

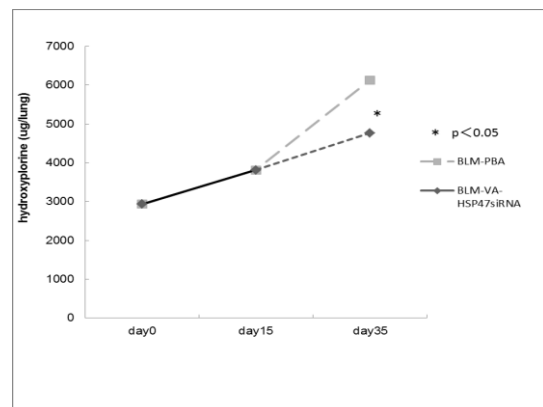


図 3 プロトコール 2 における肺組織中ヒドロキシプロリン量の推移

(3) プロトコル1における気管支肺胞洗浄中の炎症細胞数を計測した。肺障害が顕著であるプレオマイシン投与後7日目の炎症細胞数は投与前に比べ有意に増加していたが、BLM-VA-HSP47siRNA 群では他の群と比べて炎症細胞数特に好中球数は有意に増加が抑制されていた。線維化期にある21日目ではマクロファージ数が有意に増加が抑制されていた。

プロトコル2における35日目の気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数も有意な差は認めなかったが抑制傾向が見られた。

プロトコル2において、35日目の肺組織中に含まれるIL-1 β と気管支肺胞洗浄液中のTGF- β 1は、BLM-VA-HSP47siRNA 群では有意に増加は抑制されていた。VA-HSP47siRNA 投与により、炎症性サイトカインの産生抑制も認め、HSP47は炎症にも関与していることが明らかとなった。

(4) プロトコル2において、35日目の肺組織における筋線維芽細胞の発現を免疫染色を行い検討した。 α SMAの発現は、BLM-VA-HSP47siRNA 群において明らかに減少していた。肺組織中のアポトーシスの誘導を確認するためにTUNEL染色を行った。BLM-VA-HSP47siRNA 群では、BLM-PBS 群と比較して有意にアポトーシス細胞が増加していた。Satoらの報告では、筋線維芽細胞のアポトーシスが誘導されていたことが証明されており、本結果も筋線維芽細胞のアポトーシス誘導が起きていると考えられた。

(5) 今回、本研究においてHSP47の発現をsiRNAで抑制することで肝硬変と同様に肺線維症においてもその抑制効果を確認することができた。さらにHSP47siRNAをVAトリポソームの複合体に被包化することで、線維化を特異的に抑制することが確認できた。この複合体を用いることで、肺線維症においても、肝硬変と同様なメカニズムで線維化を抑制することが可能であった。

今回のこのドラッグデリバリシステムは、肝星細胞へ特異的に導入するその細胞特異性を利用した方法である。今回の課題は、この方法を肺線維化においても適応できるかどうかである。肺における肝星細胞に相当する細胞は肺筋線維芽細胞と考えられている。肺筋線維芽細胞は肺線維化の過程で、線維芽細胞が性質が変化し増殖してくる。肺筋線維芽細胞に肝星細胞と同様にVAを貯蔵する作用があるかどうか明確には明らかとなっていないが、今回の検討結果よりその作用があることが十分に推測される。今後in vitroでの確認が必要である。

今後、肺線維症などの難治性疾患の治療には、病態生理が解明されていくなかで分子標的

治療が選択されていくものと考えられる。そのひとつとして遺伝子治療が注目されている。しかし、遺伝子治療を臨床応用していく過程には多くの難題が山積している。本法のようなアンチセンス、siRNAなどを遺伝子治療が実用化される際の問題点として、1) 遺伝子自体がもつ物質としての不安定性、2) 高額な作成費用、3) 全身投与時の副次的作用の発現である。そのため、遺伝子導入治療においては、siRNAによる遺伝子ノックアウトによる効果だけではなく、今後実用化を考慮した場合、いかに遺伝子を安定した状態で投与できるか、さらに副作用や使用量を考えた場合、いかに選択的に標的臓器、細胞に導入できるか、そのドラッグデリバリシステムの選択が重要な鍵となる。今回の検討で本手法はその細胞特異性を利用した有効な手法であり、今後臨床応用する過程において重要な課題を克服したと考えられる。

今回肺線維化の抑制が確認できたが、今後更に肺筋線維芽細胞のVA貯蔵作用、コラーゲン産生抑制などのin vitroでの分析、臨床応用などを検討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)

[学会発表] (計1件)

大塚 満雄

<演題>肺筋線維芽細胞にHSP47siRNA特異的導入による肺線維化抑制効果の検討
第50回日本呼吸器学会学術講演会
平成22年4月24日 国立京都国際会館(京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 満雄 (MITSUO OTSUKA)
札幌医科大学 医学部 助教
研究者番号: 10398323