

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791064

研究課題名 (和文) RNA 干渉を利用したアトピー性皮膚炎の新規遺伝子治療法開発

研究課題名 (英文) Approaches of the new therapy development for atopic dermatitis by using RNA interference

研究代表者

井川 健 (IGAWA KEN)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00372441

研究成果の概要 (和文) : マウスモデルにおけるアレルギー性炎症反応 (皮膚、上気道) が、Th2 型の免疫反応における重要な役割をもつ転写因子である、STAT6 の機能を阻害することによって抑制された。STAT6 の阻害は RNA 干渉を利用して行った。

研究成果の概要 (英文) : Local administration of STAT6 siRNA (siRNA for STAT6) is a promising therapeutic strategy for both Th2-mediated cutaneous diseases and allergic rhinitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：STAT6、アレルギー、治療

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は、多彩な遺伝的要因と環境要因 (後天的な増悪因子) が複雑に絡み合っ て発症し、その症状が維持されていく慢性の炎症性皮膚疾患であると考えられている。そのアトピー性皮膚炎の病態形成の基盤に Th2 型免疫反応の異常亢進が少なからず存在する可能性は以前より指摘されており、我々は、この Th2 型免疫反応の異常亢進を是正することにより AD の治療ができないだろうかというコンセプトのもと研究を行い、そ

の成果を報告してきた。まず、Th2 型免疫反応に重要な役割を果たす転写調節因子である、Signal transducer and activator of transcription (STAT) 6 をターゲットにして、その機能を阻害するために STAT6 decoy ODNs (おとり核酸) を作製した。STAT6 decoy ODNs は、アレルギー炎症のモデルマウスにおける、主に IgE を介する炎症反応を明らかに抑制し、さらには pilot-study ではあるが、成人型アトピー性皮膚炎の皮膚症状に対して治療効果を発揮した。

さて、遺伝子をターゲットとして、その機能を抑制する方法として、当初我々は上記のごとく、おとり核酸を利用したわけであるが、近年、RNA 干渉がそのような目的で広く利用されるようになってきている。RNA 干渉を利用した遺伝子治療の検討は、癌治療の分野などにおいて報告があるものの、アレルギーの分野においては未だ報告はない状況であった。

2. 研究の目的

アレルギー性炎症反応における Th2 型免疫反応の経路の重要性と、その経路を治療のターゲットとすることがどれほど有意義なことであるのか、といったことをさらに検討する目的で、引き続き、STAT6 の機能を阻害することによるアレルギー性炎症反応の抑制についての研究をおこなった。

また、今回、STAT6 の機能を抑制する方法として、RNA 干渉を用いることとし、RNA 干渉がアレルギーの分野における治療に適応可能かどうかを検討することも検討事項とした。

3. 研究の方法

まず、STAT6 に対して効果的な RNA 干渉を誘導する small RNA (short-interfering RNA; siRNA)、すなわち STAT6 siRNA を作製し、in vitro において、培養細胞を用いてその効力を検討した。

その後、効果が確認された STAT6 siRNA を用いて以下のマウスモデルを用いたアレルギー性炎症反応の抑制効果についての検討をおこなった。

- (1) 接触過敏モデルマウスを用いた、STAT6 siRNA の耳介腫脹反応抑制効果の検討
- (2) マウス接触皮膚炎症反応における

STAT6 siRNA の抑制効果機序の検討

- (3) 接触過敏モデルマウスを用いた STAT6 siRNA 含有軟膏の効果検討
- (4) 鼻炎マウスモデルに対する STAT6 siRNA の効果

4. 研究成果

まず、これまで報告されているより強い抑制効果と弱い副作用の期待される理論を用いて、STAT6 siRNA を作製した。その理論から得られた RNA の候補として 3 つの STAT6 siRNA を用意した。

初めに、これらの siRNA により、確実に STAT6 に対する RNA 干渉が誘導され、遺伝子発現の抑制がおこることを in vitro で確認した。

培養マウス皮膚線維芽細胞に STAT6 siRNA をトランスフェクトし、STAT6 の mRNA の発現ならびにタンパク発現を確認したところ、STAT6 siRNA をトランスフェクトすることによって STAT6 の発現が明らかに抑制されていた。また、この STAT6 の機能の抑制が、下流の生物学的反応をしっかりと抑制するかどうかを検討するため、STAT6 siRNA をトランスフェクトしたマウス線維芽細胞を IL-4/TNF α の刺激し、ケモカイン (CCL11) の産生を検討した。STAT6 siRNA をトランスフェクトした線維芽細胞からの CCL11 産生は、コントロールの RNA をトランスフェクトされた細胞に比して有意に減少していることが確認された。このようにして in vitro で効果を確認した 3 つの siRNA のうち、最も効果の高いと思われた siRNA を用いて、各アレルギー疾患マウスモデルにおける検討を行った。

アトピー性皮膚炎のマウスモデルは様々に報告されているが、ここでは、作製の簡便さも鑑みて、アレルギー性皮膚炎症のモデルとしてのハプテン誘導性 (TNCB や DNFB を利用し

た)のマウス接触過敏反応モデルを利用することとした。STAT6 siRNAを炎症局所の皮下に投与することにより、誘導された接触過敏反応(耳介腫脹であらわされる)が有意に減少した。この反応における炎症局所におけるサイトカインプロファイルを確認したところ、STAT6 siRNAを投与して、耳介腫脹反応の減少がみられた系においては、Th2型サイトカインあるいはケモカイン(IL-4、IL-13、CCL11、CCL17、CCL22など)の産生が有意に減少していることが確認され、STAT6 siRNAの投与は、確かにTh2型免疫反応を抑制していること、またそのことを通して局所の炎症反応を抑制している可能性を強く示唆する結果であった。

なお、STAT6の機能を抑制することによりTh2型免疫反応の抑制がおこることが確認されたが、Th2型の免疫反応の抑制が本当に皮膚炎症反応抑制に寄与したのか、ということを確認するために、同じマウスモデルを用いて、抗IL-4抗体あるいは抗IL-13抗体を投与することにより、耳介腫脹反応が有意に抑制されたことを確認している。

さらなる確認のために、蛍光色素でラベルしたSTAT6 siRNAを作製し、実際に投与した際にSTAT6が炎症局所の細胞に確実に取り込まれて、効果を発揮していることを検討している。その結果として、線維芽細胞と思われる細胞や、浸潤してきた炎症細胞の一部にSTAT6 siRNAが取り込まれていることが確認できた。

このように、接触過敏反応モデルマウスを用いた検討の結果は、STAT6 siRNAがアレルギー性炎症性皮膚反応に対して抑制効果をもつことが確認され、その抑制効果のメカニズムの一端は、Th2型の免疫反応を抑制することによるものであることが示された。

アレルギー性の炎症反応のなかでも、皮膚の炎症反応はさまざまな形態の炎症反応が混在して評価が難しいことがしばしばであるが、上気道のアレルギー性炎症反応(特に鼻炎)の場合はほぼ、Th2型のメカニズムにシフトした炎症反応であると思われる。従って、STAT6の抑制による治療効果は、鼻炎の方でより大きな成果が得られるのではないかと考え、OVAによる抗原特異的アレルギー性鼻炎のマウスモデルを用いた検討を行った。

予想通り、STAT6 siRNAの投与は、鼻炎マウスモデルにおけるくしゃみの回数や鼻引掻き動作を著明に抑制した。鼻粘膜組織に浸潤する炎症細胞について検討したところ、炎症細胞自体の浸潤を著明に抑制し、特に好酸球の浸潤を抑制することがわかった。また、鼻周辺所属リンパ節由来の細胞をとってきて、in vitroで抗原による刺激をおこなったところ、STAT6 siRNAを投与したマウス由来のリンパ節細胞からのIL-4やIL-13の産生は、有意な減少がみられた。

このように、鼻炎マウスモデルにおいてもSTAT6 siRNA投与によって、その炎症反応が有意に抑制されることが確認された。

以上、本研究の成果としてまとめると

- (1) 効果的にSTAT6の発現を抑制する新規のSTAT6 siRNAを作製した。
- (2) そのSTAT6 siRNAは、培養マウス皮膚線維芽細胞からのTh2型ケモカインであるCCL11の発現を抑制した。
- (3) STAT6 siRNAは、接触過敏反応マウスモデルにおける耳介腫脹反応を抑制した。
- (4) STAT6 siRNAによる耳介腫脹抑制反応は、STAT6 siRNAによる局所におけるTh2型免疫反応の抑制によるもの

であることが推察された。

- (5) STAT6 siRNAは、抗原特異的なアレルギー性鼻炎のモデルマウスにおける鼻炎反応を効果的に治療することが可能であった。

このように、RNA干渉を用いたSTAT6の発現阻止という方法がアレルギー性炎症反応の新しい治療法として考慮に値する、という結果が得られた。

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2件)

- ① Hosoya K, Satoh T, Yamamoto Y, Saeki K, Igawa K (10人中5番目) Gene silencing of STAT6 with siRNA ameliorates contact hypersensitivity and allergic rhinitis. *Allergy*, 66(1):124-31, 2011 査読有り
- ② 井川 健 【アトピー性皮膚炎の正しい治療】 アトピー性皮膚炎の新しい治療の展望. *医薬ジャーナル* 46 (3) : 994-998, 2010 査読有り

[学会発表] (計2件)

- ① 井川 健 重症アトピー性皮膚炎の新規治療. 第109回日本皮膚科学会総会教育講演 2010年4月16-18日 大阪
- ② Igawa K: A therapeutic effect of STAT6 inhibition in atopic dermatitis. *Yonsei Cutaneous Biology Research Institute International Symposium* 2009 September 11-12, 2009, Seoul, (招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井川 健 (IGAWA KEN)
大阪大学・医学研究科・講師
研究者番号：00372441

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：