

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591128

研究課題名(和文) RNA干渉を応用した慢性閉塞性疾患の新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic strategies for chronic obstructive diseases using RNA interference

研究代表者

Gabazza Esteban (Gabazza, Esteban)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00293770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では全身にヒトmetalloproteinase-(MMP-)2を発現するトランジェニック(TG)マウスを作製し、タバコ煙抽出物の吸引投与により、3週間程度の短期間で慢性閉塞性肺患(COPD)を高い確率で発症することが確認できた。本TGマウスを用いることにより、COPDに関する研究を飛躍的に発展させられる。また、本研究では、COPDの発症に及ぼすNF-kappaB siRNAの吸入の効果を検討した。その結果、非投与のMMP-2 TGマウス群に比べ、NF-kappaB siRNAを投与したTGマウス群では気管支肺洗浄液中の総細胞数、肺組織中の炎症性サイトカインの発現が有意に高値を示した。

研究成果の概要(英文)：In the present research project, we developed a novel metalloproteinase-(MMP-)2 transgenic mouse that showed characteristic findings of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) after short-term exposure to inhaled cigarette smoke extracts. Wild type mice usually required exposure to cigarette smoke extracts of more than half-a-year to develop COPD typical findings in the lungs. In addition, this study evaluated the therapeutic usefulness of NF-kappaB siRNA in COPD using our present mouse model. Compared to control, intranasal administration of NF-kappaB siRNA significantly suppressed lung pathological changes, cell inflammation and inflammatory cytokines. The results of this study suggest the potential therapeutic usefulness of siRNA against NF-kappaB signal pathways in COPD.

研究分野：免疫学

キーワード：肺気腫 細胞内伝達機構 NF-kappaB RNA干渉 プロテアーゼ MMP-2 煙草 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

呼吸器科領域では、慢性炎症を来す疾患および病態は治療抵抗性及び難治性に結びつく。その中、慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease、以下 COPD) は、極めて予後不良の疾患であり、また決定的な治療法も無く、その治療法はほぼ対症療法に留まる。COPD は主として喫煙によって発生する慢性炎症性肺疾患であり、近年、その罹患率は世界的に増加しており、日本においてもその傾向が著しい。世界保健機構の報告では COPD が世界の死亡原因の第 5 位にのぼり、日本でも 2001 年の疫学調査によれば COPD の患者数は 40 歳以上の成人の中で約 530 万人と推定され、日本も欧米と同様に高い COPD の有病率を示す。2020 年には世界の死因別死亡率の 3 位になることが推測されており、医療経済的にも負担の大きな疾患である。一方、COPD において、NF- κ B の活性化による TNF α 、IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカインがその病態形成に重要な役割を果たしていることが報告されている。

2. 研究の目的

COPD の治療薬としては、現在、気管支拡張剤、ステロイド剤などの対症的な治療薬が用いられているが、根本的な治療薬が確立されていない。COPD の主な原因は喫煙であり、タバコ消費量が高い我が国では COPD は既に増加傾向にあり、21 世紀において COPD は更に大きな社会問題となる可能性がある。従って、特に日本では、新しいより有効な治療法の開発が急務である。我々はこれまでに、肺線維症や気管支喘息などの慢性炎症性肺疾患モデルマウスを用いて、吸入 NF- κ B 阻害剤が肺実質と気道の炎症を抑制することを見だし、吸入 NF- κ B 阻害剤が慢性炎症性肺疾患の治療に有効であることを明らかにし報告してきた (Crit Care Med 2004)。本研究ではこれまでの研究成果をふまえて、基本的にはタバコ煙暴露マウスを用いて COPD モデルを作製し、NF- κ B 経路の細胞内シグナル伝達機構に着目して、COPD の発症に及ぼす NF- κ B の吸入 siRNA の効果を検討することとした。

3. 研究の方法

a) MMP-2 トランジェニックマウスの作製：C57BL/6J マウスから受精卵を採取し、マイクロインジェクション法により CAG-MMP2 発現コンストラクトを導入した。発現コンストラクトをマイクロインジェクションした受精卵を、偽妊娠処置を受けたマウスの卵管に移植した。その結果、合計 266 個の受精卵にマイクロインジェクション法で発現コンストラクトを注入したところ、注入操作によるダメージもなく、合計 210 個の注入胚を偽妊娠マウスに移植することができた。そして、発現コンストラクトを注入した受精卵から

産子を得て、生後 3 週齢まで育成した後に離乳し、サザン解析によるジェノタイプングを行い、CAG-MMP2 トランスジェニックマウス、ファウンダー個体を同定した。

b) 喫煙誘発 COPD マウスの作製と解析：

C57BL/6 野生型マウス及び MMP-2 トランジェニックマウスに毎日 30 分、一日 1 回、3 週間間喫煙を暴露させ、肺気腫モデルを作製した。Whole body plethysmography (Buxco 社製) を用いて呼吸機能を測定し、血液、気管支肺胞洗浄液、肺組織を採取する。血液、気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン量、好中球、肺胞マクロファージの数、組織学的変化で急性肺傷害の程度を評価した。

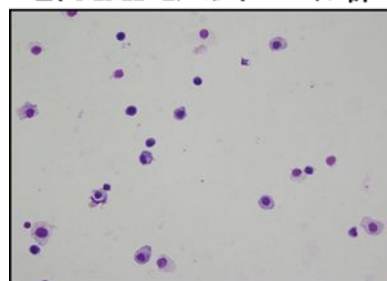
c) 喫煙誘発 COPD に対する NF- κ B siRNA の抑制効果の検討：C57BL/6 野生型マウス及び MMP-2 トランジェニックマウスに喫煙を暴露させる前に p65NF- κ B siRNA を投与し、3 週間後に血液、気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン量、好中球、肺胞マクロファージの数、組織学的変化で肺気腫の程度をグループ間に比較検討する。

4. 研究成果

a) 開発した COPD マウスモデルの特徴：

図 1 の如く、生理食塩水を吸入させたマウスに比べ、タバコ煙抽出物を吸入させたヒト MMP2 発現 TG マウスでは気管支肺胞洗浄液中の炎症性細胞の増加 (図 1A) と肺組織の気腫性変化 (図 2) が認められた。

A ヒトMMP-2/コントロール群



B ヒトMMP-2/タバコ群

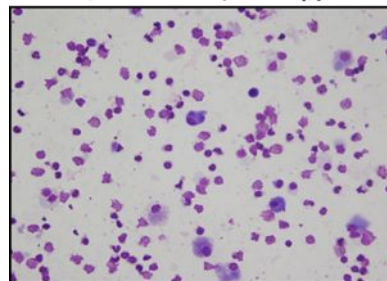


図 1. 生理食塩水を吸入させたマウスと、タバコ煙抽出物を吸入させたヒト MMP2 発現 TG マウスにおいて、気管支肺胞洗浄液 (BALF) の白血球数を比較したグラフである。

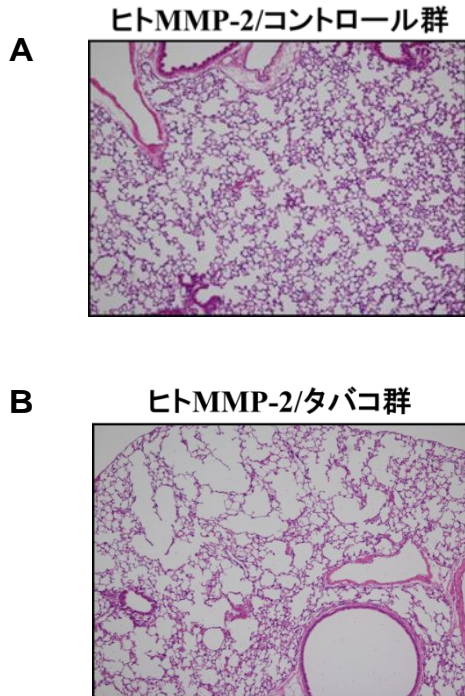


図2. ヒトMMP2発現TGマウスにタバコ煙抽出物を吸入させた後の肺の顕微鏡写真図である。

b)喫煙誘発COPDに対するNF- κ B siRNAの抑制効果の検討：非投与のMMP-2 TGマウス群に比べ、NF κ B siRNAを投与したMMP-2マウス群では肺気腫と炎症(COPD)の変化が有意に低下した(図3)。

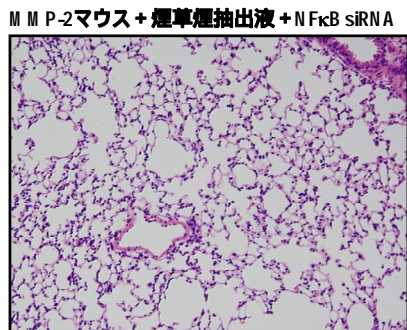


図3 非投与のMMP-2 TGマウス群に比べ、NF κ B siRNAを投与したMMP-2マウス群では肺気腫と炎症(COPD)の変化が有意に低下した。

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 25 件)

1. Horiki N, Furukawa K, Kitade T, Sakuno T, Katsurahara M, Harada T, Tano S, Yamada R, Hamada Y, Inoue H, Tanaka K, Gabazza EC, Ishii N, Fukuda K, Omata F, Fujita Y, Tachibana H, Takei Y. Endoscopic findings and lesion

distribution in amebic colitis. *J Infect Chemother.* 2015 Jun;21(6):444-448. 査読有り

2. Roen Z, Toda M, D'Alessandro-Gabazza CN, Onishi M, Kobayashi T, Yasuma T, Urawa M, Taguchi O, Gabazza EC. Thrombomodulin inhibits the activation of eosinophils and mast cells. *Cell Immunol.* 2015 Jan;293(1):34-40. 査読有り

3. Joos GF, Gabazza EC. Is there still hope for single therapies: how do we set up experimental systems to efficiently test combination therapies? *Respirology.* 2015 Jan;20(1):15-23. 査読有り

4. Chelakkot-Govindalayathil AL, Mifuji-Moroka R, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Matsuda Y, Gil-Bernabe P, Roen Z, Yasuma T, Yano Y, Gabazza EC, Iwasa M, Takei Y. Protein S exacerbates alcoholic hepatitis by stimulating liver natural killer T cells. *J Thromb Haemost.* 2015 Jan;13(1):142-154. 査読有り

5. Wu W, Ichihara G, Hashimoto N, Hasegawa Y, Hayashi Y, Tada-Oikawa S, Suzuki Y, Chang J, Kato M, D'Alessandro-Gabazza CN, Gabazza EC, Ichihara S. Synergistic effect of bolus exposure to zinc oxide nanoparticles on bleomycin-induced secretion of pro-fibrotic cytokines without lasting fibrotic changes in murine lungs. *Int J Mol Sci.* 2014 Dec 30;16(1):660-676. 査読有り

6. Yamanaka K, Nakanishi T, Saito H, Maruyama J, Isoda K, Yokochi A, Imanaka-Yoshida K, Tsuda K, Kakeda M, Okamoto R, Fujita S, Iwakura Y, Suzuki N, Ito M, Maruyama K, Gabazza EC, Yoshida T, Shimaoka M, Mizutani H. Persistent release of IL-1s from skin is associated with systemic cardio-vascular disease, emaciation and systemic amyloidosis: the potential of anti-IL-1 therapy for systemic inflammatory diseases. *PLoS One.* 2014 Aug 13;9(8):e104479. 査読有り

7. Hosoki K, Kainuma K, Toda M, Harada E, Chelakkot-Govindalayathila AL, Roegen Z, Nagao M, D'Alessandro-Gabazza CN, Fujisawa T, Gabazza EC. Montelukast suppresses epithelial to mesenchymal transition of bronchial epithelial cells induced by eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Jul 4;449(3):351-356. .査読有り
8. Noro Y, Omoto Y, Umeda K, Tanaka F, Shiratsuka Y, Yamada T, Isoda K, Matsubara K, Yamanaka K, Gabazza EC, Nishikawa M, Mizutani H. Novel acoustic evaluation system for scratching behavior in itching dermatitis: rapid and accurate analysis for nocturnal scratching of atopic dermatitis patients. *J Dermatol*. 2014 Mar;41(3):233-238. .査読有り
9. Toda M, D'Alessandro-Gabazza CN, Takagi T, Chelakkot-Govindalayathila AL, Taguchi O, Roegen Z, Munesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Gabazza EC, Morser J. Thrombomodulin modulates dendritic cells via both antagonism of high mobility group protein B1 and an independent mechanism. . *Allergol Int*. 2014 Mar;63(1):57-66. .査読有り
10. Akeda T, Yamanaka K, Tsuda K, Omoto Y, Gabazza EC, Mizutani H. CD8+ T cell granzyme B activates keratinocyte endogenous IL-18. *Arch Dermatol Res*. 2014 Mar;306(2):125-130. .査読有り
11. Maruyama T, Fujisawa T, Okuno M, Toyoshima H, Tsutsui K, Maeda H, Yuda H, Yoshida M, Kobayashi H, Taguchi O, Gabazza EC, Takei Y, Miyashita N, Ihara T, Brito V, Niederman MS. A new strategy for healthcare-associated pneumonia: a 2-year prospective multicenter cohort study using risk factors for multidrug-resistant pathogens to select initial empiric therapy. *Clin Infect Dis*. 2013 Nov;57(10):1373-1383. .査読有り
12. Miyake Y, D'Alessandro-Gabazza CN, Takagi T, Naito M, Hataji O, Nakahara H, Yuda H, Fujimoto H, Kobayashi H, Yasuma T, Toda M, Kobayashi T, Yano Y, Morser J, Taguchi O, Gabazza EC. Dose-dependent differential effects of thrombin in allergic bronchial asthma. *J Thromb Haemost*. 2013 Oct;11(10): .査読有り
13. Naito M, Taguchi O, Kobayashi T, Takagi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Matsushima Y, Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, Matsumoto T, Chelakkot-Govindalayathil AL, Toda M, Yasukawa A, Hataji O, Morser J, Takei Y, Gabazza EC. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor protects against acute lung injury by inhibiting the complement system. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 Oct;49(4):646-653. .査読有り
14. Toda M, Shao Z, Yamaguchi KD, Takagi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Taguchi O, Salamon H, Leung LL, Gabazza EC, Morser J. Differential gene expression in thrombomodulin (TM; CD141)(+) and TM(-) dendritic cell subsets. *PLoS One*. 2013 Aug 23;8(8):e72392. .査読有り
15. Hataji O, Naito M, Ito K, Watanabe F, Gabazza EC, Taguchi O. Indacaterol improves daily physical activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2013;8:1-5. .査読有り
16. Iwasa M, Kobayashi Y, Mifuji-Moroka R, Hara N, Miyachi H, Sugimoto R, Tanaka H, Fujita N, Gabazza EC, Takei Y. Branched-chain amino acid supplementation reduces oxidative stress and prolongs survival in rats with advanced liver cirrhosis. *PLoS One*. 2013 Jul 25;8(7):e70309. .査読有り
17. Hamasaki T, Matsumoto T, Sakamoto N, Shimahara A, Kato S, Yoshitake A, Utsunomiya A, Yurimoto H, Gabazza EC, Ohgi T. Synthesis of ¹⁸O-labeled RNA for application to kinetic

- studies and imaging. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jul;41(12):e126. [査読有り](#)
18. Yasukawa A, Hosoki K, Toda M, Miyake Y, Matsushima Y, Matsumoto T, Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, Nagao M, Sugimoto M, Hiraguchi Y, Tokuda R, Naito M, Takagi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Suga S, [Kobayashi T](#), Fujisawa T, Taguchi O, [Gabazza EC](#). Eosinophils promote epithelial to mesenchymal transition of bronchial epithelial cells. *PLoS One.* 2013 May 21;8(5):e64281. [査読有り](#)
19. Relja B, Lustenberger T, Puttkammer B, Jakob H, Morser J, [Gabazza EC](#), Takei Y, Marzi I. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) is enhanced in major trauma patients without infectious complications. *Immunobiology.* 2013 Apr;218(4):470-476. [査読有り](#)
20. Iwasa M, Mifuji-Moroka R, Kobayashi Y, Takei Y, D'Alessandro-Gabazza C, [Gabazza EC](#). Comment on serum FGF21 and RBP4 levels in patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol.* 2013 Feb;48(2):252-253. [査読有り](#)
21. Tsuda K, Yamanaka K, Kondo M, Matsubara K, Sasaki R, Tomimoto H, [Gabazza EC](#), Mizutani H. Ustekinumab improves psoriasis without altering T cell cytokine production, differentiation, and T cell receptor repertoire diversity. *PLoS One.* 2012;7(12):e51819. [査読有り](#)
22. Hamasaki T, Suzuki H, Shirohzu H, Matsumoto T, D'Alessandro-Gabazza CN, Gil-Bernabe P, Boveda-Ruiz D, Naito M, [Kobayashi T](#), Toda M, Mizutani T, Taguchi O, [Morser J](#), Eguchi Y, Kuroda M, Ochiya T, Hayashi H, [Gabazza EC](#), Ohgi T. Efficacy of a novel class of RNA interference therapeutic agents. *PLoS One.* 2012;7(8):e42655. [査読有り](#)
23. Fujiwara A, Kobayashi H, Masuya M, Maruyama M, Nakamura S, Ibata H, Fujimoto H, Ohnishi M, Urawa M, Naito M, Takagi T, Kobayashi T, [Gabazza EC](#), Takei Y, Taguchi O. Correlation between circulating fibrocytes, and activity and progression of interstitial lung diseases. *Respirology.* 2012 May;17(4):693-698. [査読有り](#)
24. Fujiwara A, Taguchi O, Takagi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Boveda-Ruiz D, Toda M, Yasukawa A, Matsushima Y, Miyake Y, Kobayashi H, [Kobayashi T](#), Gil-Bernabe P, Naito M, Yoshida M, [Morser J](#), Takei Y, [Gabazza EC](#). Role of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in allergic bronchial asthma. *Lung.* 2012 Apr;190(2):189-198. [査読有り](#)
25. Eagan TM, [Gabazza EC](#), D'Alessandro-Gabazza C, Gil-Bernabe P, Aoki S, Hardie JA, Bakke PS, Wagner PD. TNF- α is associated with loss of lean body mass only in already cachectic COPD patients. *Respir Res.* 2012 Jun 18;13:48. [査読有り](#)
- 〔学会発表〕(計 10 件)
- 1.O.Hataji,A.L.Chelakkot-Govindalayathil, C.N.D'Alessandro-Gabazza, M. Onishi, K. Fujiwara, M.Toda, [T.Kobayashi](#), [E.C.Gabazza](#), O. Taguchi.: A novel and short-term mouse model of chronic obstructive pulmonary disease 2014 ERS Munich, Germany (September 6-10, 2014)
- 2.O. Hataji, M. Naito, [E. Gabazza](#), O. Taguchi.: Usefulness of daily physical activity for monitoring therapeutic response in COPD 2013 ERS Barcelona, Spain (September 7-11, 2013)
- 3.T. Takagi, M. Urawa, A. Tomaru, K. Fujiwara, M. Onishi, [T. Kobayashi](#), H. Kobayashi, M. Toda, C. D'Alessandro-Gabazza, [E. Gabazza](#), O. Taguchi.: The immunomodulatory effect of protein S in pulmonary fibrosis 2013 ERS Barcelona, Spain (September 7-11, 2013)
4. M. Onishi, A. Tomeru, K. Fujiwara, M. Urawa,

T. Takagi, T. Kobayashi, H. Kobayashi, Y. Miyake, M. Toda, C. D'Alessandro-Gabazza, E. Gabazza, O. Taguchi.: Dose-dependent differential effect of thrombin in allergic bronchial asthma 2013 ERS Barcelona, Spain (September 7-11, 2013)

5. Corina D'Alessandro-Gabazza, Y. Matsushima, A.L. Chelakkot Govindalayathil, Z. Roegen, T. Takagi, T. Yasuma, T. Kobayashi, M. Toda, E.C. Gabazza.: Dose-dependent differential effects of thrombin in allergic bronchial asthma 2013 ICI Milano, Italy (August 22-27, 2013)

6. Takehiro Takagi, Masahiro Onishi, Ayshwarya Chalakkot-Govindalayathil, Masaaki Toda, Kobayashi Tetsu, Corina D'Alessandro-Gabazza, Osamu Taguchi, E.C. Gabazza.: Protective effect of thrombomodulin in murine asthma is dose dependent 2013 ISTH Amsterdam, Netherlands (June 29-July 4, 2013)

7. Takehiro Takagi, Masahiro Onishi, Ayshwarya Chalakkot-Govindalayathil, Koa Hosoki, Kobayashi Tetsu, Corina D'Alessandro-Gabazza, John Morser, Osamu Taguchi, E. Gabazza.: Role of protein S in murine model of allergic asthma 2013 ISTH Amsterdam, Netherlands (June 29-July 4, 2013)

8. T. Kobayashi, E.C. Gabazza, T. Okano, A. Tomaru, K. Fujiwara, M. Onishi, T. Takagi, H. Kobayashi, C.N. D'Alessandro-Gabazza, S.I. Rennard, O. Taguchi.: RNA Interference For The Treatment Of Intractable Pulmonary Diseases 2013 ATS Philadelphia, USA (May 17-22, 2013)

9. M. Naito, E.C. Gabazza, T. Kobayashi, K. Ito, F. Watanabe, O. Hataji, C.N. D'Alessandro-Gabazza, K. Fujiwara, M. Onishi, T. Takagi, H. Kobayashi, O. Taguchi. :The Clinical Significance Of Protein S In Patients With Sarcoidosis 2013 ATS Philadelphia, USA (May 17-22, 2013)

10. T. Takagi, K. Fujiwara, M. Onishi, M. Naito, H. Fujimoto, T. Kobayashi, H. Kobayashi, C. DAlessandro-Gabazza, E. Gabazza, O. taguchi.:Dose dependent Effect of Thrombomodulin in a Murine Model of Allergen-induced Asthma 2012 ERS Vienna, Austria (September 1-5, 2012)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称：ヒト MMP2 を発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物
発明者：ガバザ・エステバン、田口修、小林哲
権利者：国立大学法人三重大学
種類：特許
番号：2013-256900
出願年月日：平成 25 年 12 月 12 日
国内外の別：国内

取得状況(計1件)

名称：ヒト TGF- β 1 を発現するトランスジェニックマウス
発明者：ガバザ・エステバン、小林哲
権利者：国立大学法人三重大学
種類：特許
番号：5696991
出願年月日：平成 23 年 10 月 28 日
取得年月日：平成 27 年 2 月 20 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等：<http://www.mie-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ガバザ・エステバン (GABAZZA ESTEBAN)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号：00293770

(2) 研究分担者

小林哲 (KOBAYASHI TETSU)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20437114

(3) 連携研究者

ジョン モーサー (John Morser)
三重大学・医学系研究科・客員教授
研究者番号：40571625