

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461189

研究課題名(和文) RNAiを用いた難治性呼吸器疾患治療への創薬の研究

研究課題名(英文) RNAi for the treatment of refractory pulmonary diseases

研究代表者

小林 哲 (Kobayashi, Tetsu)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20437114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：核酸創薬は難治性疾患に対しての可能性を持ったものとして期待されている。我々は本邦オリジナルの独自の核酸を作成し、経気道的投与による呼吸器疾患への創薬を目指している。マウス疾患モデルを用いて核酸をデザインし、投与実験を行った結果、経気道的な核酸投薬によって疾患病態の制御が可能な事が分かった。今後日本発信の創薬開発につなげたい。

研究成果の概要(英文)：The nucleic acid innovative drug development is expected as a new therapeutic method for the refractory disease. We make the original nucleic acid as Japan original and aim at the innovative drug development to respiratory disease with the administration of the trans-airway. As a result of designing a nucleic acid using a mouse disease model, and having tested it, control of the disease clinical condition was found to be possible by a trans-airway nucleic acid medication. These results suggest that intra-tracheal instillation of RNAi agents may be useful for the therapy of pulmonary diseases.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：siRNA RNAi TGF 肺線維症

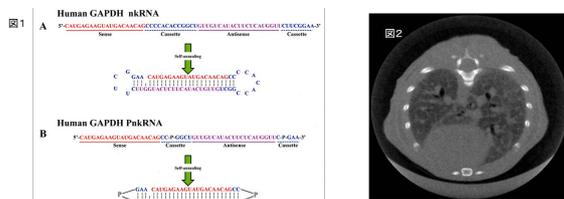
### 1. 研究開始当初の背景

2006年のノーベル賞の受賞対象となった siRNA は RNAi (RNA 干渉) を人工的に起こそうとするものである。その機構は、人工的に二本鎖 RNA を導入することによって、その相補的な mRNA を分解し、結果として目的遺伝子の発現のみを抑制することが出来る現象である。つまり、ある疾患に関して病態の原因となる遺伝子またはタンパク質などが判明した場合、それに対して RNAi を起こさせることでその疾患をコントロールできる可能性がある。

### 2. 研究の目的

RNAi を使った医薬品が完成すれば、特に、今までコントロール困難であった難治性疾患において画期的な創薬となる可能性を秘めている。本研究は、RNAi を用い、"日本独自の創薬"を目指すものである。

### 3. 研究の方法



国際的な競争の中、日本の siRNA 創薬は困難に直面している。まずその原因の一つとしては、siRNA に関する基本特許は欧米をはじめとする海外にことごとく先行されてしまっていることが挙げられる。その結果、日本における siRNA 創薬は根本的に困難な状況に陥っていると思われる。欧米からの特許クレームを回避すべく、日本独自の創薬を目指すために RNA の構造開発を行い、RNAi を引き起こすことが可能な新規構造 RNA (図 1) の開発に成功し、発表した (PLoS One.7:e42655,2012)。この新規構造 RNA の特徴は、従来の二本鎖短鎖 RNA (siRNA) とは異なる、一本鎖長鎖 RNA という分子構造であり、self annealing によって 3'末端部分が分子内結合により折り返される特徴を持つ。その結果、RNAse などでの分解がされにくくなり、従来型の siRNA より生体内での安定性が保たれる。その構造上の特徴から Toll like Receptor3 (TLR3) などの活性化が起きにくく、siRNA の重大な副作用とされる非特異的炎症誘導が起きにくい、などのメリットが考えられた。また、世界で初めてヒト TGF- $\beta$  gene の全長をマウス肺に発現させた Transgenic mouse (TG マウス) を作成した。その結果、自然発症肺線維症モデルの作成に成功した (図 2)。これらを用い疾患モデルとして投薬実験を行った。

### 4. 研究成果

(1) このオリジナル核酸は、Interferon 反応や TLR34 などの非特異的な反応を起こさ

なかった。

(2) 肺線維症のみならず、急性肺障害をも抑制可能であった。

(3) さらに、originality の高い核酸構造を開発し、図 1 の核酸よりも効果の程度が高く安定していることを確認した。

(4) 肺線維症には発癌が合併することがあるが、その抑制効果に関しては現在検討中である。

### 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)

[雑誌論文](計 13 件)

1: Kobayashi H, Naito M, Masuya M, Maruyama M, Urata K, Takahashi Y, Tomaru A, Fujiwara K, Ohnishi M, Takagi T, Kobayashi

I, D'Alessandro-Gabazza C, Urawa M, Gabazza EC, Taguchi O, Takei Y. Circulating fibrocytes correlate with the asthma control test score. Allergol Immunopathol (Madr). 2016 Jan 13.

pii:S0301-0546(15)00152-4. doi:

10.1016/j.aller.2015.09.007. [Epub ahead of print] (査読あり)

2: Matsumoto T, Matsushima Y, Toda M, Roehn Z, D'Alessandro-Gabazza CN, Hinneh JA, Harada E, Yasuma T, Yano Y, Urawa M, Kobayashi T, Taguchi O, Gabazza

EC. Activated protein C modulates the proinflammatory activity of dendritic cells. J Asthma Allergy. 2015 May 7;8:29-37. doi: 10.2147/JAA.S75261.

eCollection 2015. (査読あり)

3: 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):660-76. doi:  
10.3390/ijms16010660. ( 査読あり )
- 4: Roeen 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.  
doi:10.1016/j.cellimm.2014.11.005. ( 査読あり )
- 5: Hosoki K, Kainuma K, Toda M, Harada E, Chelakkot-Govindalayathila AL, Roeen 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.  
doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.033. ( 査読あり )
- 6: Toda M, D'Alessandro-Gabazza CN, Takagi T, Chelakkot-Govindalayathila AL, Taguchi O, Roeen 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. doi:  
10.2332/allergolint.13-OA-0595. ( 査読あり )
- 7: 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. doi:  
10.1371/journal.pone.0072392. ( 査読あり )
- 8: 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. doi:  
10.1093/cid/cit571. ( 査読あり )
- 9: 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):1903-1915.  
doi:10.1111/jth.12392. ( 査読あり )
- 10: Naito M, Taguchi O, Kobayashi T, Takagi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Matsushima Y, Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, Matsumoto T, Chelakkot-Govindalayathila 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. doi:  
10.1165/rcmb.2012-04540C. ( 査読あり )
- 11: 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. doi: 10.1371/journal.pone.0064281. ( 査読あり )

12: 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. doi:10.2147/COPD.S38548. ( 査読あり )

13: Boveda-Ruiz D, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Takagi T, Naito M, Matsushima Y, Matsumoto T, Kobayashi T, Gil-Bernabe P, Chelakkot-Govindalayathil AL, Miyake Y, Yasukawa A, Morser J, Taguchi O, Gabazza EC. Differential role of regulatory T cells in early and late stages of pulmonary fibrosis. Immunobiology. 2013Feb;218(2):245-254. doi: 10.1016/j.imbio.2012.05.020. ( 査読あり )

[学会発表](計6件)

1,2013年8月24日第16回間質性肺炎細胞分子病態研究会(ベルサール九段、東京)  
演題名:呼吸器疾患におけるRNAiを用いた創薬の研究  
発表者: 小林哲

2,2014年2月22日第38回吸入療法研究会(大手町サンケイプラザ、東京)  
演題名:吸入による核酸創薬の可能性  
発表者: 小林哲

3,2014年7月19日第88回閉塞性肺疾患研究会(大手町サンケイプラザ、東京)  
演題名:COPD治療における可逆性の可能性  
発表者: 小林哲

4,2014年11月29日第11回呼吸器バイオマーカー研究会(都市センターホテル、東京)  
演題名:マウス疾患モデルを用いた線維化マーカーの探索  
発表者: 小林哲

5,2015年4月18日第55回日本呼吸器学会総会(国際フォーラム、東京)  
演題名:IPFに対するRNAi創薬の可能性  
発表者: 小林哲

6,2015年11月28日第12回呼吸器バイオマーカー研究会(大手町サンケイプラザ、東京)  
演題名:RNA新時代

発表者: 小林哲  
〔図書〕(計1件)  
1、IPFに対するRNAi創薬の可能性  
小林哲、ガバザ・エステバン  
Annual Review2016呼吸器、中外医学社

〔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

6.研究組織  
(1)研究代表者  
小林哲(KOBAYASHI TETSU)  
三重大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号:20437114

(2)研究分担者  
Gabazza Esteban(GABAZZA ESTEBAN)  
三重大学・医学系研究科・教授  
研究者番号:00293770

田口 修(TAGUCHI OSAMU)  
三重大学・保健管理センター・教授  
研究者番号:90197244