



肺線維症に対する線溶系を応用した遺伝子治療の開発

(課題番号 17590809)

平成 17 年度—18 年度科学研究費補助金

(基盤研究 (C) 研究成果報告書)

平成 19 年 4 月

研究代表者： 服部 登

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科 分子内科学)



研究組織

研究代表者：服部 登（広島大学大学院医歯薬学総合研究科 講師）

研究分担者：三宅正幸（財団法人田附興風会医学研究所第5研究部 部長）

研究分担者：横山彰仁（広島大学大学院医歯薬学総合研究科 助教授）

研究分担者：河野修興（広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授）

交付決定額

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	2,300	0	2,300
平成18年度	1,300	0	1,300
総計	3,600	0	3,600

はじめに

間質性肺炎や急性呼吸促迫症候群 (ARDS) などを含むいろいろな炎症性肺疾患の最終段階には肺の線維化が引き起こされる。この現象は正常な組織修復がうまく遂行されず、線維芽細胞を中心とする間葉系細胞の浸潤増殖による過修復が進行し、組織の線維化が発生してしまうためと理解される。

この線維化の過程に関与する因子については精力的な研究がなされ、数多くの研究成果が発表されてきており、MCP-1 や MIP-1 $\alpha$ などのケモカイン、TGF- $\beta$ , Connective tissue growth factor (CTGF), PDGF などのサイトカイン、ロイコトリエン、活性化酸素代謝物 (reactive oxygen species: ROS), そしてプロテアーゼ、アンチプロテアーゼなどが密接に関わっていることがわかってきた。さらに、それぞれの関連因子は、相互作用を有しながら線維化過程に影響を及ぼしていることも示されてきたのである。

この肺の線維化をきたす炎症性肺疾患においては、肺胞内や間質に異常にフィブリンの沈着を認めることが組織学的な顕著な特徴として挙げられてきた。肺に傷害が引き起こされることにより、炎症の誘発、毛細血管の透過性亢進が惹起され、血漿の血管外漏出が起こり、凝固系の亢進ともあいまってフィブリンの沈着を認めるのであるが、元来線溶系優位である肺組織にフィブリンが沈着しつづけること自体が異常であり、これらの炎症性肺疾患においては肺組織内の線溶系が高度に抑制されているのであらうと考えられていた。1980年代後半から1990年前半にかけてこの線溶系抑制に最も重要な役割を果たしているのが Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) であることが証明された。研究代表者の服部 登は、この PAI-1 と肺線維症の関係のより詳しい解析を加える目的で、PAI-1 ノックアウトマウスに対して、ブレオマイシンによる肺傷害を誘発し、PAI-1 による肺の線溶系抑制が肺線維化の鍵となる要素の一つであることを示

した。また、フィブリノゲン・ノックアウトマウスに対してもプレオマイシンによる肺傷害を誘発し、コントロール群と同程度の肺線維症を惹起できることも示し、フィブリン沈着が肺の線維化に必須ではないことも証明した。これら一連の実験結果より、線溶系はフィブリン溶解以外の作用をもって、肺の線維化を制限する可能性が示されたのである。その機序解析の中で、線溶系が肺内 **Hepatocyte growth factor (HGF)** の生物学的有効性を制御していることを見出し、**HGF** を介して肺線維化を抑制している可能性も指摘した。さらに、遺伝子治療、蛋白直接投与、あるいはトランスジェニックマウスの作製といった種々の手法を用いて肺内ウロキナーゼ活性を亢進させることに成功し、いずれの方法もが肺の線維化を抑制しうることも明らかにしてきた。

これらの研究成果は、肺内の線溶系抑制が肺線維症進展に強く関与しており、肺内線溶系活性を亢進させることにより肺の線維化を抑制しうる事が証明するものであるが、臨床応用への道筋をつけるまでには至っていない。本研究は、1) 遺伝子治療により肺内線溶系活性を亢進させる、2) 肺線維化の鍵となる分子である **PAI-1** の発現を抑制する、いうアプローチにより、線溶系を中心とした観点からの臨床応用可能な肺線維症治療戦略を開発への道標を作ることを目的として開始した。

その研究成果について、当初計画に対比しながら以下に挙げる。

## 研究成果

### 1) 遺伝子治療による線溶系活性の亢進

線溶系活性を直接的に亢進させる方法として、ウロキナーゼをコードするアデノウイルス（ウロキナーゼ・アデノウイルス）を使用した実験を遂行した。

（当初計画）

ブレオマイシンの気管内投与3-4日目に、ウロキナーゼ・アデノウイルスを再度気管内に投与する。DEAE-Dextranとの複合体形成により投与ウイルス量を減じた群、さらにデキサメサゾン腹腔内投与を行う群を設定する。

ブレオマイシン投与14日目の肺内コラーゲン量をヒドロキシプロリン測定により算出し、肺の線維化の程度を比較する。

（結果）

気管支肺胞洗浄液中のウロキナーゼ濃度を指標に、経気管投与を行うウイルス量を算定する実験において、DEAE-Dextranの併用により、投与ウイルス量を10分の1まで減じても、非併用群との差を認めないことを明らかにした。この結果、炎症を惹起する可能性の強いアデノウイルスベクターの使用量を減らしうることが判明し、以後のアデノウイルスの経気管投与実験はすべてDEAE-Dextran併用で行った。また、アデノウイルスが惹起する炎症を軽減させる目的で、デキサメサゾンの腹腔内投与を実施する群も準備した。

しかしながら、ブレオマイシン経気管投与後、DEAE-Dextran併用により投与量を減じ得たアデノウイルスによっても激しい炎症が惹起されることが判明し、同時に、ウロキナーゼ・アデノウイルス投与によって肺内コラーゲン量を低下させることが出来ないこともわかった。さらに、ブレオマイシンの経気管投与後に、アデノウイルスの経気管投与によって惹起される肺内の炎症は、デキサ

メサゾンの大量投与によってもコントロールできないことも判明した。

すなわち、アデノウィルスをベクターとして、ウロキナーゼを肺において過剰発現させることを目標とした、肺線維症の遺伝子治療は、その炎症惹起によって実施不可能であることが証明された。残念な結果ではあったが、炎症性肺疾患に対するアデノウィルスによる遺伝子治療は、困難であろうとする教訓が得られたと考えている。

## 2) PAI-1 発現の抑制実験

(当初計画)

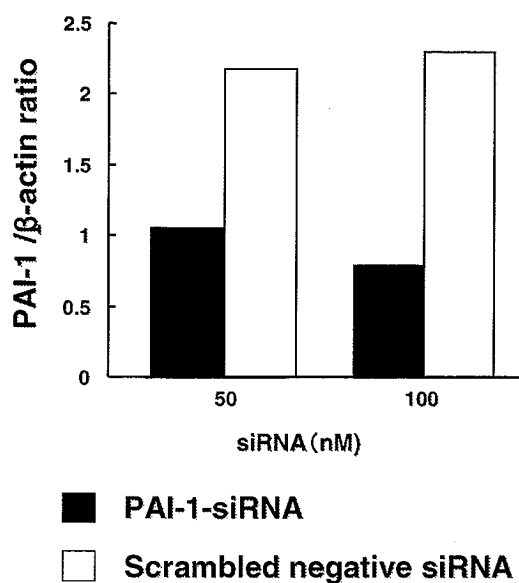
マウス PAI-1 に対する siRNA の配列を決定し、それにコードする発現プラスミドの作製、さらにそのプラスミドを用いて、PAI-1 に対する siRNA を発現するアデノウィルスベクターを作製する。

ブレオマイシンの経気管投与後、マウス PAI-1 に対する siRNA を発現するベクターを経時的に投与し、肺内における PAI-1 の発現が抑制されていることを確認する。その後に、肺内のコラーゲン量を測定し、肺線維症の程度に影響があるかについても検討する。

(結果)

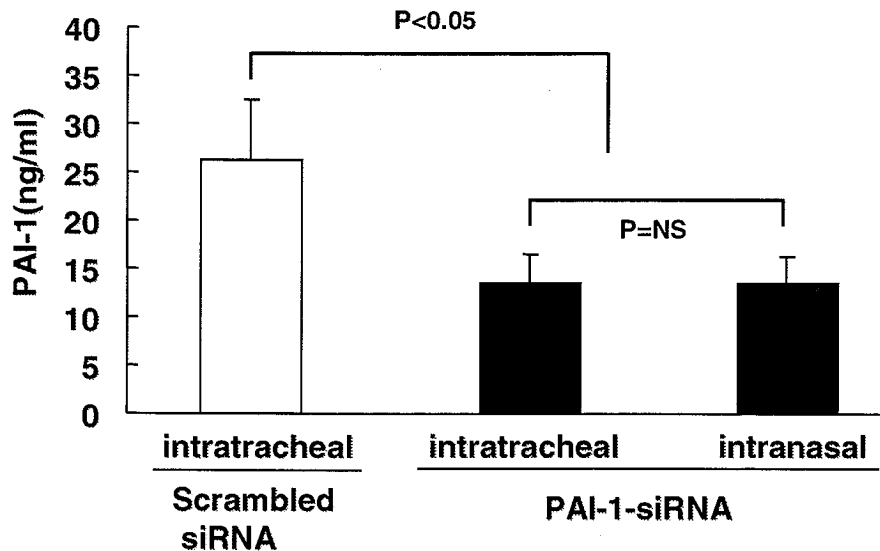
マウス PAI-1 に対する siRNA をいくつか作製し、NIH-3T3 細胞に対してトランスフェクションを行った。その中で、PAI-1 の発現抑制を認めたものを一つ選んで、以後の実験に使用した。リアルタイム RT-PCR を用いて測定した、NIH3T3 細胞における PAI-1 の mRNA 抑制は以下の図に示すとおりである。

## Expression level of PAI-1 mRNA in NIH-3T3 cells



当初は、PAI-1 への抑制効果を示す siRNA を発現するベクターを使用した実験を行う予定であったが、マウス肺内への siRNA の直接投与にて遺伝子発現のノックダウンが認められるという報告が相次いだため、我々も発現ベクターを使用するのではなく、siRNA 溶液を経気道的あるいは経鼻投与する方法を選択した。この方法によって、実際に PAI-1 に対する siRNA の経気管及び経鼻投与にてブレオマイシン投与 1 週間目における気管支肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度を抑制しうることも、以下の図に示すように明らかとなった。

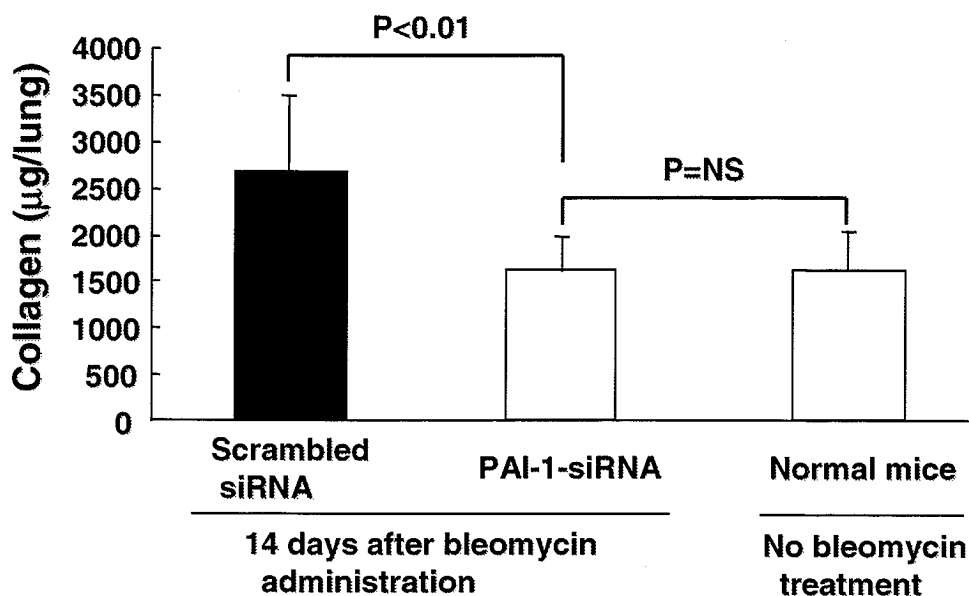
## PAI-1 concentration in BAL fluid



この結果を受けて、ブレオマイシンの経気管投与後の PAI-1 に対する siRNA の経鼻的投与が、肺内コラーゲン量に影響を及ぼすのかについて、実際に肺内のコラーゲン量を Sircol collagen 測定キットを用いて測定した。以下の図に示すように、PAI-1 に対する siRNA の投与により、肺内コラーゲン量の低下を認め、ブレオマイシンによる肺の線維化を抑制しうることが判明した。



## Collagen contents in the lungs



### まとめ

ブレオマイシンの経気道投与後に、アデノウィルスベクターを用いた遺伝子導入を試みたが、DEAE-Dextranの併用によるアデノウィルス投与量の低量化、さらにデキサメサゾン投与による抗炎症治療によっても、その炎症惹起性を軽減することが出来なかった。この結果は、炎症性肺疾患に対する遺伝子治療ベクターとしてアデノウィルスを使用することに大きな制限を加えるものと考えられる。

今回、PAI-1に対するsiRNA溶液の肺内への直接投与により、肺内のPAI-1の発現を抑制しうることが判明した。さらに、siRNA 1によるPAI-1の発現抑制

によって、ブレオマイシン肺線維症を抑制しうることも明らかとなった。これらのデータは、肺線維症治療の標的遺伝子として PAI-1 が非常に有望であることを示し、さらにその手段として siRNA を利用する可能性を示唆するものである。現在これらのデータをまとめた論文を投稿中である。

次ページ以降、本研究費補助期間に発表した論文，総説を添付する。