

平成25年1月25日

平成24年度独立行政法人日本学術振興会
藤田記念医学研究振興基金研究助成事業研究概要報告書

独立行政法人日本学術振興会理事長殿

研究者所属・職 慶應義塾大学医学部呼吸器外科研究室 助教
氏 名 高橋 祐介

本助成事業による研究について、次のとおり報告します。

1. 研究課題名 肺特異的遺伝子翻訳阻害モデルを用いた肺気腫の病態解明と治療開発 (英文名) Pathophysiologic analyses of pulmonary emphysema mice model using gene-specific siRNA
2. 研究実施期間 平成24年4月1日～平成25年3月31日
3. 助成金額 1,000,000円
4. 研究の目的 肺疾患の中には病態の解明が十分になされていないものが多数存在している。特に肺気腫は罹患数、死亡数ともに増加の一途をたどっており、公衆衛生上の問題となっている一方、 <u>肺気腫の病態の全容は分かっておらず、特に発症と進行のメカニズムの解明はあまり進んでいない。</u> 従来、特定遺伝子のノックアウトマウスが多く研究されてきた。肺領域においては、肺の発生やメンテナンスに重要な因子のノックアウトマウスでは、呼吸不全によってマウスが生存しないことも多く、その解析が難しい。出生直後の解析は可能であるが、成熟マウスにおける解析が難しく、成人に起こる疾患の病態を正確に表しているのかという大きな問題が残る。もうひとつの遺伝子ノックアウト技術である、 <u>Cre-loxP システムは標的遺伝子を任意の時期と場所でノックアウトできるものの、技術的に非常に煩雑であり、いくつかの標的遺伝子の阻害を行う実験モデルに用いることは困難である。</u> 近年普及しつつある RNA 干渉技術は、特定遺伝子の相補的な配列の短い二本鎖 RNA (si RNA) によって翻訳阻害して特定遺伝子をノックダウンする技術である。従来、尾静脈注射などの全身投与が主に行われていたが、それでは肺特異的に特定遺伝子をノックダウンすることにはならず、肺疾患の病態解明という意味では不十分であった。 <u>肺特異的な RNA 干渉モデルによって形態的・機能的変化の詳細を検討した報告はない。</u> われわれは、肺に親和性の高い担体を用いた siRNA の経気道的投与により特定遺伝子を肺特異的にノックダウンすることで肺疾患モデルマウスを確立することを計画した。 Vascular endothelial growth factor(VEGF) は内皮細胞の生存に欠かせない因子であり、 <i>in vivo</i> 、 <i>in vitro</i> の双方で内皮細胞の増殖を誘導する。(Gerber HP et al.(1998) J Biol Chem.)重度の肺気腫の患者においては肺組織における VEGF が減少していることが数多く報告されている。(Kanazawa H (2007) Med Sci Monit.)動物実験では VEGF 受容体チロシンキナーゼの特異的阻害剤である SU5416 の全身投与によって肺胞上皮細胞のアポトーシスと肺気腫の形成が起こることが示されている。(Kasahara Y et al.(2000) J Clin Invest.)ラット喫煙肺気腫モデルでは VEGF ₁₆₅ と VEGF 受容体の複合体形成によるシグナル伝達の阻害が報告されている。しかし、 <u>VEGF そのものを直接的に、また肺特異的に阻害したモデルの検討は行われていない。</u> 今回の肺特異的 VEGF 阻害モデルを用いて肺気腫の病態における VEGF の関与を考察することを目標とした。 われわれは、予備実験において近似した組織像を得ることができた肺気腫について、その因子の解析のみでなく、リコンビナント蛋白や誘導因子の投与による救済実験を行い、治療法の開発の可能性に繋がる病態、とくに VEGF との関連について明らかにすることを目標とした。

5. 研究概要報告

平成22年度は肺気腫モデルの確立を目指し、VEGFのノックダウンをc57/BL6マウスに対して、VEGF遺伝子に対するsiRNAをInfasurfと混合したのちマウス鼻腔より投与した。H. E. 標本を作製し、組織学的変化の詳細を画像解析ソフトを用いた morphometry を行ってその経時的変化を検討した。また、siRNAの作用期間と考えられる48-72時間と形態学的変化が合致するか否かを検討し、またInfasurf単独投与群をコントロールとして、その比較によって肺特異的遺伝子翻訳阻害モデルとしての妥当性を評価した。その結果、肺気腫に類似する形態学的変化、つまり肺胞壁の破壊と気腔拡大が起きていることが明らかとなった。一方で、組織学的には炎症は起こっておらず、その原因が炎症によるものではないと考えられた。さらに、肺気腫に類似する形態学的変化が一過性のものであり、その経時的変化がsiRNAの作用期間とほぼ一致していること、Infasurf単独ではこれらの形態学的変化が起こりえないことが明らかとなった。

平成23年度は各因子のmRNA量およびタンパク発現量と形態像との経時的変化を解析した。Western blotting法を用いた解析によって、VEGFタンパク発現と形態学的変化の時間的な相関が明らかとなった。DCI (dexamethason, c-AMP, isobutylmethylxanthine) またはレチノイン酸や投与を同時に行うことによって形態学的変化を抑制できるかの救済実験を試みた。上記と同様のmorphometryによってDCI投与群ではVEGFsiRNA投与群で起こる形態学的変化が起こらないことが分かった。これらの知見は肺気腫の病態におけるVEGFの役割や肺気腫治療開発の第一歩となる研究と成り得ると考えられた。

平成24年度はこれらの結果を再度解析し、英字論文作製を行った。American Journal of Physiology, Respiratory Researchなどに投稿・再投稿を試みたがacceptされなかったため、査読者からのコメントにからも発表方法や表現方法の再検討が必要と考えられ、現在再投稿へ向けて準備中にある。なお、同時期に論文作製した、

Distinctive histopathological features of lepidic growth predominant node-negative adenocarcinomas 3-5 cm in size. (次項参照)

についてはLung Cancerに掲載されている。

6. 研究成果の発表について

独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業の英文称：
「JSPS Fujita Memorial Fund for Medical Research」

研究者所属・職 慶應義塾大学医学部呼吸器外科研究室 助教
氏 名 高橋 祐介

○論文発表 発表者名、テーマ名、発表誌名・巻号、発刊年月を記入してください。
また、別刷り2部を必ず添付してください。

Y. Takahashi et al. Distinctive histopathological features of lepidic growth predominant node-negative adenocarcinomas 3-5 cm in size Lung Cancer 79(2): 118-124, February 2013

○口頭発表 発表者名、テーマ名、会合名、発表年月日を記入してください。

高橋祐介、縦隔原発非セミノーマ性胚細胞腫瘍切除例の検討、第53回日本肺癌学会総会、平成24年11月9日

○著 書 著者名、出版社名、刊行年月日、共著または単著の別を明記してください

注：

- (1) 研究成果を学会誌等で発表する場合には、独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業による助成を受けた旨を必ず明記して下さい。
また、その別刷り2部を「研究概要報告書」と共に必ず提出して下さい。
- (2) 本基金の助成に係る代表的な論文、口頭発表及び著書にはタイトルの前に○を付けて下さい。