

Heat Shock Protein 47(HSP47)siRNAを用いた肺線維症治療薬の開発

大塚 満雄 [札幌医科大学 内科学第三講座/助教]
白鳥 正典 [札幌医科大学 内科学第三講座/講師]
高橋 弘毅 [札幌医科大学 内科学第三講座/教授]

背景・目的

HSP(heat shock protein)47はコラーゲン合成に必須の分子であり、その過剰発現が肺線維化に促進的に働いているとされる。肺線維症では線維化の強い部位に筋線維芽細胞の増加が見られ、その筋線維芽細胞ではHSP47を過剰発現している。肺筋線維芽細胞でのHSP47の発現を抑制することにより肺線維化を抑制することができることが予想される。また、肺筋線維芽細胞はVitamin A(VA)を取り込む性質を有すると報告されている。siRNAによる筋線維芽細胞でのHSP47の抑制がラットブレオマイシン肺線維症モデルに有効か検討した。

内容・方法

本研究では、ラットブレオマイシン肺線維症モデルを作成し、リポソーム VitaminA 複合体で封入したHSP47 siRNAを経静脈的に投与し、肺線維化抑制効果を確認した。

1) ブレオマイシン(BLM)肺線維症動物モデルの作成

7週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットに対して、深麻酔下に経気道的にBLM 0.5mgを単回投与し肺線維症モデルを作成した。対照群には経気道的に生理食塩水のみを投与した。

2) HSP47 siRNA の投与

ヒト HSP47のラットホモログである gp46を標的とする siRNA を作成した。VA と cationic liposome(lip)である Lipotrust™ をモル比2:1で混合してVA とリポソームの複合体を作成し siRNA を被包化した(VA-lip-siRNA)。0.75mg/kgの siRNA を含むVA-lip-siRNA を週3回尾静脈より投与した(BLM & VA-lip-siRNA 群)。また、対照としてPBS & PBS 群、無治療群としてのBLM & PBS 群、VAを除いたBLM & lip-siRNA 群、機能を有さないRNAを用いたBLM & VA-lip-random RNA 群の5群を作成して比較検討を行った。

3) 肺線維化の評価

ブレオマイシン投与後21日目に肺を摘出し、ホルマリン固定後、hematoxylin-eosin 染色により組織学的に線維化を評価した。肺組織のホモジネートを作成し、肺組織中のハイドロキシプロリン量を測定した。また、肺洗浄を行ない、洗浄液中の炎症細胞数を計測した。

結果・成果

1) ブレオマイシン投与後21日目の肺組織

肺組織所見では、BLM & PBS 群と比べてBLM & VA-lip-siRNA 群で明らかに線維化の軽減、炎症細胞浸潤の抑制が見られた。同様にBLM投与を行ったBLM & lip-siRNA 群、BLM & VA-lip-random RNA 群と比較しても組織学的変化は軽微であり、siRNAのみならずVAも効果発現に必要であった。

2) 肺組織中のハイドロキシプロリン量(図1)

PBS & PBS 群と比べ、BLM & PBS 群では21日目にハイドロキシプロリン量は有意に増加していたが、BLM & VA-lip-siRNA 群ではその増加は有意に抑制された($p<0.05$)。他のBLM & lip-siRNA 群、BLM & VA-lip-random RNA 群では有意な抑制を認めず、効果発現にはsiRNAおよびVAの両者の存在が必要であることが明らかになった。

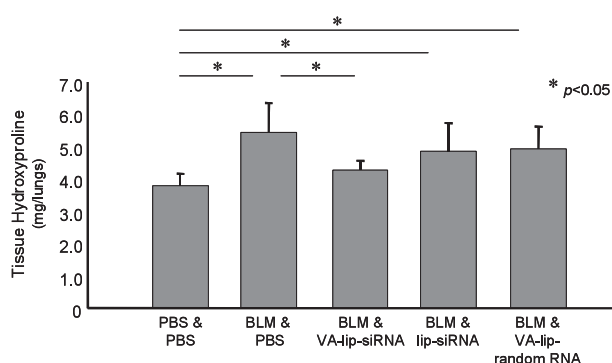


図1

3) 肺洗浄液中の炎症細胞(図2)

肺洗浄液中の総細胞数はPBS & PBS 群と比較し、BLM & PBS 群、BLM & lip-siRNA 群、BLM & VA-lip-random RNA 群で有意に増加したが、BLM & VA-lip-siRNA 群ではその増加が有意に抑制された($p<0.05$)。細胞分画ではほとんどがマクロファージであった。

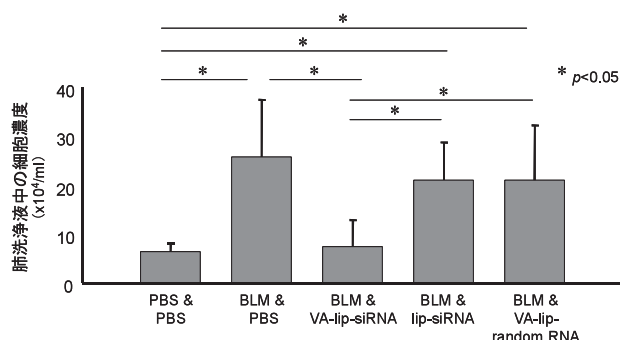


図2

今後の展望

今回、HSP47の発現を siRNA で抑制することで肺線維化に対する抑制効果を確認することができた。さらにHSP47 siRNA をVA とリポソームの複合体により被包化し投与することで、肺線維化の有意な抑制が認められ、

HSP47siRNAのみならずVAの存在も有意な線維化抑制に必須であることが確認できた。

今回のこのVAを用いたドラッグデリバリーシステムは、VAを貯留する肝星細胞をターゲットとして、その細胞特異性を利用して特異的に肝星細胞にHSP47siRNAを導入させ、肝硬変治療に成功した手法(Sato Y et.al Nat Biotechnol. 2008 Apr ; 26(4) : 431-42)を肺線維症治療に応用したものである。今回の課題はこの方法を肺の線維化に対しても応用できるかどうかである。肺における肝星細胞に相当する細胞は肺筋線維芽細胞と考えられている。肺筋線維芽細胞は肺線維化の過程で、線維芽細胞の性質が変化して増殖してくる。肺における肝星細胞と同様に考えられている肺筋線維芽細胞においてもVAが貯蔵されることが報告されており、今回の検討結果もVAが肝星細胞同様にVAを選択的に取り込む性質があることが十分に推測される。今後in vitroでの確認を行いたい。

今回肺線維化の抑制が確認できたが、さらに肺筋線維芽細胞のVA貯蔵作用、コラーゲン産生抑制などのin vitroでの分析、完成した肺線維症に対する治療効果などを検討していく予定である。