

令和 4 年 3 月 21 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09972

研究課題名(和文)慢性肉芽腫症マウスを用いたPEG-DAO酵素補充療法の開発

研究課題名(英文) Treatment with Polyethylene Glycol-Conjugated Fungal d-Amino Acid Oxidase Reduces Lung Inflammation in a Mouse Model of Chronic Granulomatous Disease

研究代表者

布井 博幸 (Nunoi, Hiroyuki)

宮崎大学・医学部・元教授 研究生

研究者番号：50218260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はPEG化したD-アミノ酸オキシダーゼ(PEG-pDAO)が活性酸素産性能の欠損する慢性肉芽腫症患者好中球の殺菌能をin vitroで回復させることを報告してきた。今回の研究ではPEG化した新規の真菌由来DAO(PEG-fDAO)とD-prolineまたはD-phenylalanineの投与により、カンジダ死菌誘発性CGDマウス肺炎モデルを改善させることを、体重、肺重量の変化、Rhodamin-BSAの肺集積と肺病理解析で証明した。これらの結果より、PEG-fDAOが炎症局所へ移行しやすく、CGDマウス肺炎モデルの治療に有益であると同時にCGD患者への臨床応用の可能性を示す事となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性肉芽腫症(CGD)は活性酸素産性能の欠損により、殺菌能が低下するために、激しい感染症を繰り返す疾患である。これまで、骨髄移植や遺伝子治療が成功を収めつつあるが、患者状態の悪い場合は前処置の問題など非常にリスクを伴うことが問題であった。我々は、炎症局所で過酸化水素を産生できるPEG化したD-アミノ酸オキシダーゼ(PEG-pDAO)を用いた酵素補充療法をCGD患者好中球を用いたin vitroでの有用性を証明してきた。今回カンジダ死菌で誘発されたCGDマウス肺炎モデルを用いて新たに開発したPEG-fDAOのin vivoでの有用性を確認し、CGDの新たな酵素補充療法による治療法を提示した。

研究成果の概要(英文)：Chronic granulomatous disease (CGD) is a primary immunodeficiency wherein phagocytes are unable to produce reactive oxygen species (ROS) owing to a defect in the NADPH oxidase complex. Patients with CGD experience bacterial and fungal infections and excessive inflammatory disorders. Bone marrow transplantation and gene therapy are theoretically curative, however, residual pathogenic components cause inflammation and/or organic damage in patients. In this study, the efficacy of the ROS-generating enzyme replacement therapy was tested with PEG-fDAO using three experimental strategies with the in vivo lung inflammation model of gp91phox-knockout CGD mice. The lung weight and pathological findings suggest the condition was ameliorated by administration PEG-fDAO, followed by intraperitoneal injection of d-phenylalanine or d-proline. These data reveal the targeted delivery of PEG-fDAO and show that PEG-fDAO can be used to treat inflammation in CGD in vivo.

研究分野：先天性免疫不全症 好中球機能異常症

キーワード：PEG-DAO酵素補充療法 CGDマウス カンジダ死菌誘発性肺炎 D型アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

慢性肉芽腫症 (CGD) は活性酸素産生能の欠損により、肉芽腫を伴う感染症を繰り返す疾患である。これまで、骨髄移植や遺伝子治療が試みられていたが、まだ多くの問題を残している。我々は、この問題を解決すべく、PEG化D-amino acid oxidase (PEG-pDAO)を用いた酵素補充療法を考案し、CGD患者好中球を用いた*in vitro*での有用性を確認した(文献1)。しかし、*in vivo*でのPEG-DAOの効果が確認されていなかった。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、菌類(カビ)の一属である*Fusarium*より抽出した新たなfDAOをPEG化したPEG-fDAOを用いて、その薬理的解析をし、更にgp91phox欠損慢性肉芽腫症マウス(CGDマウス)を用いた*in vivo*肺炎モデルで、PEG-fDAOの抗炎症効果を確認することである。

3. 研究の方法

カンジダ死菌 (nonviable *Candida Albicans*; nCA)を CGD マウスに吸入させ *in vivo* 肺炎モデル実験を確立した。同時に新規に作成した真菌由来の PEG-fDAO の生化学的解析と薬理動態解析を行い、効果を発揮する条件を検討した。その上で、nCA 吸入後、どのタイミングで PEG-DAO を、また、それに続く D-アミノ酸投与が効果を判定するのに良いのか試みるため 3 種類のプロトコルの実験を行なった。さらに、PEG-fDAO の生化学的解析から、生体に影響が少なく、安定した結果が得られる D-proline (D-Pro)と D-phenylalanine (D-Phe)での適正化実験を行なった。実験 1、2 (Exp-1,2)では D-Pro を、実験 3 (Exp-3)では D-Phe を PEG-fDAO 投与後連続 3 日間腹腔投与した。

4. 研究成果

(1) 真菌由来の PEG-fDA の生化学的解析として、5 種類の D 型アミノ酸に対する V_{max} および K_m 値を測定し、D-Phe が D-Pro より V_{max} で約 2 倍、 K_m で 1/40 倍だったため、Exp-1,-2 では従来使用していた D-Pro 投与し、Exp-3 では D-Phe 投与し、その効果を比較した。また、PEG-fDA の生体内半減期は以前使用した PEG-pDA が約 9 時間だったのに対し、30-40 時間とかなり長いことを確認した (Fig-1)。その結果、D 型アミノ酸は PEG-fDA 投与後一日置きの日連続で D 型アミノ酸を投与することで、安定した組織移行性が得られ、活性酸素の正常組織損傷も抑えられるだろうと想像された。

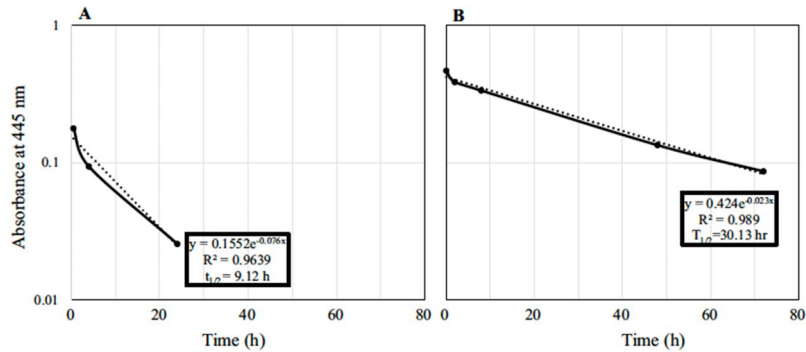
(2) CGD マウスを用いた nCA 吸入誘発性 *in vivo* 肺炎モデル作成では、炎症が強く惹起されるのは nCA 吸入後 4 日目であり、Exp-1,-2,-3 で PEG-fDA を nCA 吸入させた後、各々 2, 4, 9 日目に投与し、各々 1, 2, 3 週間後、Exp-1 では体重、肺重量を、Exp-2,-3 では Rhodamin-BSA 蓄積、肺組織変化を加え評価した。Exp-1 では非投与群の体重減少と肺重量が有意に緩和されていた (Fig-2 A, B, Fig-3 A1)。Exp-2 では、体重減少、肺重量、肺組織変化でも有意差は認められたが (Fig-2 C,D,E, Fig-3 B, Fig-4 A, Fig-5 A-F)、Exp-3 では、体重減少、肺重量では有意差までは認められなかったものの、肺組織変化や Rhodamin-BSA 蓄積では有意差が認められた (Fig-2, F,G,H, Fig-3 C, Fig-4 B, Fig-5 G-L)。

(3) D-Phe の K_m 値が D-Pro の約 1/40 であり、 V_{max} も約 2 倍であることや D-Phe 溶解性の問題もあり、Exp-1,-2 で使用していた D-Pro (1M, 0.5ml/mouse)を、Exp-3 では D-Phe を DEMSO に溶解 (0.1M, 0.5ml/mouse)し、肺組織変化や Rhodamin-BSA 蓄積では有意差が認められ、D-Pro と同等または安定した結果が得られたと考えている (Fig-2,-3,-4,-5)。

(4) 3 つの protocol での実験から、体重変化 (Fig-2)、肺重量の変化 (Fig-3)、Rhodamin-BSA の肺への蓄積 (Fig-4)、また病理組織像 (Fig-5)でもほぼ同様に、PEG-fDA 投与群において、nCA 群と比較し緩和されていた。

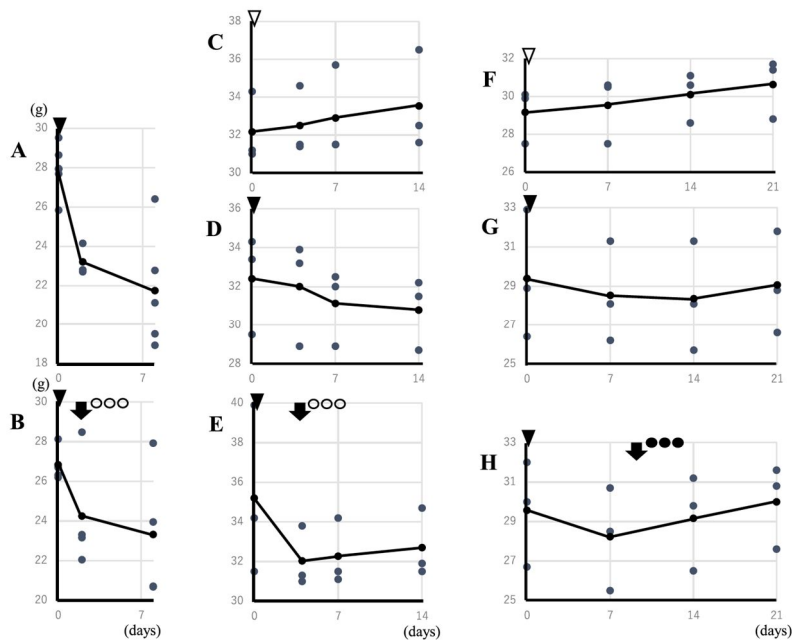
以上の結果より、PEG-fDA はカンジダ死菌を用いた CGD *in vivo* 肺炎モデル実験でも、有用であることを確認した (文献 2)。

Fig. 1 In vivo pharmacokinetics of fDAO and PEG-fDAO by enzymatic activities using plasma



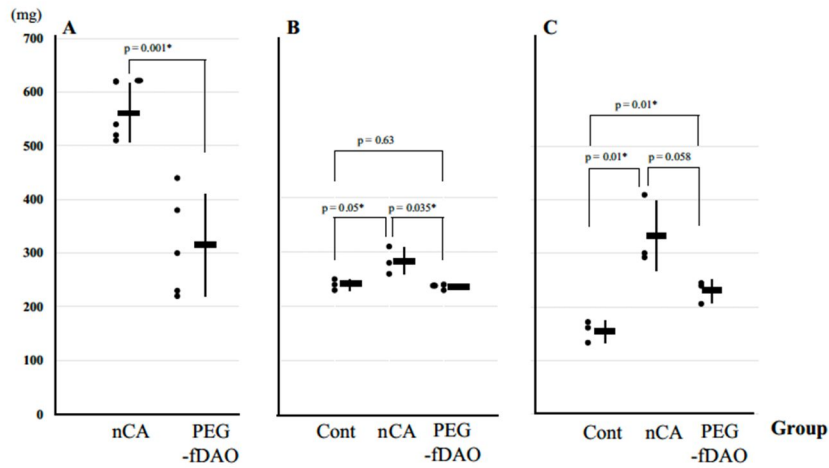
Two typical sets of exponential curve fitting analysis along with the mathematical formula are presented for fDAO (A) and PEG-fDAO (B) (Microsoft Excel). The mathematical calculation for biological half-life ($x = t_{1/2}$) is also depicted in the figure.

Fig. 2 Body Weight changes after nCA intranasal aspiration in each experiment



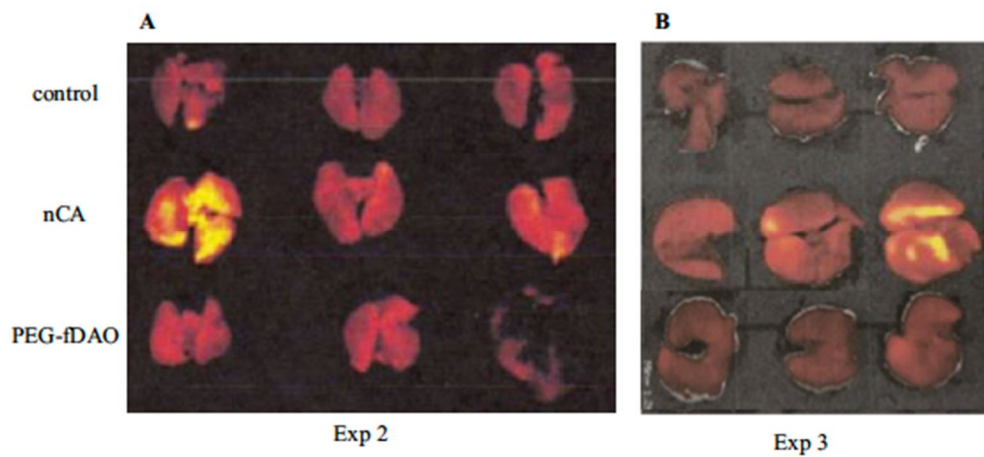
The small dots indicate the body weight (y-axis) in the time course (x-axis) of each experiment. The solid line indicates the mean body weight. Since the age of the mice differed during commencement of each experiment, the average body weight also differed across the experiments.

Fig. 3 Change in the lung weight in each experiment.



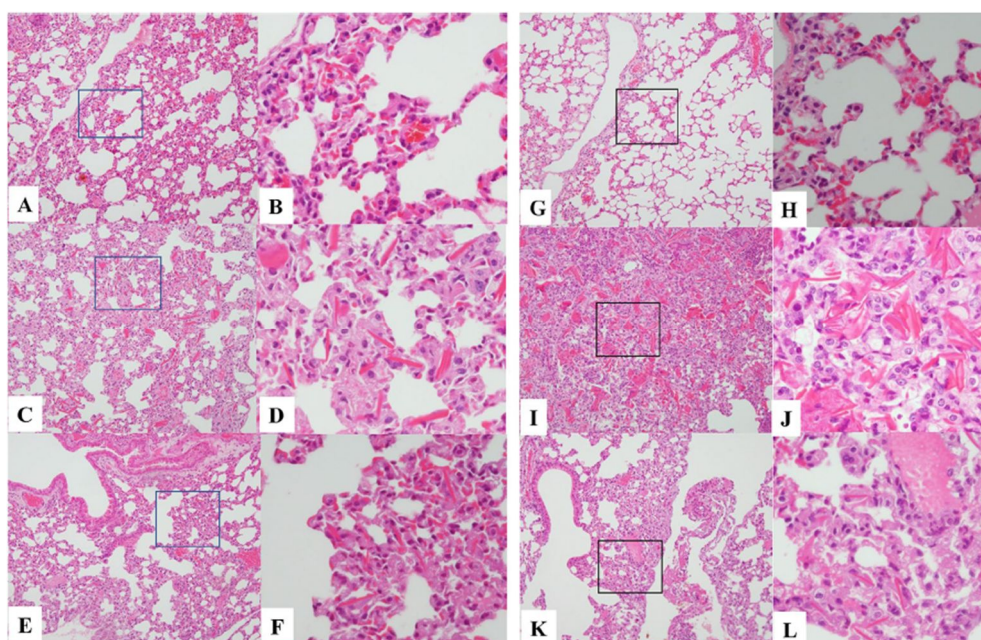
The small dots (black circle) depict the lung weight in Exp-1/-2/-3 (A/B/C). Solid bars (—) and the vertical bars indicate mean and 2 SD of the lung weight (mg) in control, nCA, and PEG-fDAO groups. An asterisk (*) indicates the significant difference between the groups in each experiment.

Fig. 4 Fluorescence imaging of the lung tissues during each experiment.



The lung tissues of mice from the control, nCA, and PEG-fDAO groups in Exp-2 (A) and Exp-3 (B) are depicted.

Fig. 5 Pathological findings of the lung tissues in Exp-2 and Exp-3.



Lung pathologies in A–F Exp-2 and G–L Exp-3 are shown, where A/B and G/H, C/D and I/J, and E/F and K/L indicate the control, nCA, and PEG-fDAO group, respectively. A/C/E/G/I/K and B/D/F/H/J/L indicate the original magnifications of 100 and 400, respectively. The boxed areas are amplified in the right panels.

参考文献

- 1) Nakamura H, Fang J, Mizukami T, Nunoi H, Maeda H. PEGylated D-amino acid oxidase restores bactericidal activity of neutrophils in chronic granulomatous disease via hypochlorite. *Exp Biol Med* (Maywood). 2012 Jun;237(6):703-8.
- 2) Hiroyuki Nunoi, Peiyu Xie, Hideaki Nakamura, Yasuaki Aratani, Jun Fang, Toyoki Nishimura, Hiroaki Kataoka, Hiroshi Maeda and Makoto Matsukura, Treatment with Polyethylene Glycol-Conjugated Fungal d-Amino Acid Oxidase Reduces Lung Inflammation in a Mouse Model of Chronic Granulomatous Disease February 2022 *Inflammation* DOI: 10.1007/s10753-022-01650-z

5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計4件)

- 1 Masakatsu Yanagimachi, Koji Kato, Akihiro Iguchi, Koji Sasaki, Chikako Kiyotani, Katsuyoshi Koh, Takashi Koike, Hideki Sano, Tomonari Shigemura, Hideki Muramatsu, Keiko Okada, Masami Inoue, Ken Tabuchi, Toyoki Nishimura, Tomoyuki Mizukami, Hiroyuki Nunoi, Kohsuke Imai, Masao Kobayashi, and Tomohiro Morio, Hematopoietic Cell Transplantation for Chronic Granulomatous Disease in Japan

Front Immunol. 2020 Jul 29. 査読有り doi: 10.3389/fimmu.2020.01617

2 Hiroyuki Nunoi, Peiyu Xie, Hideaki Nakamura, Yasuaki Aratani, Jun Fang, Toyoki Nishimura, Hiroaki Kataoka, Hiroshi Maeda and Makoto Matsukura, Treatment with Polyethylene Glycol-Conjugated Fungal d-Amino Acid Oxidase Reduces Lung Inflammation in a Mouse Model of Chronic Granulomatous Disease February 2022 Inflammation 査読有り DOI: 10.1007/s10753-022-01650-z

〔学会発表〕(計0件) 〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)現在 PEG-DAO の特許申請について、池田糖化工業と宮崎大学の知財部と相談中である。

取得状況(計0件)

〔その他〕 ホームページ等なし

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:松倉 誠

ローマ字氏名: Matsukura Makoto

所属研究機関名:崇城大学

部局名:薬学部

職名:元教授

研究者番号(8桁):70238997

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:前田 浩

ローマ字氏名: Maeda Hiroshi

所属研究機関名:崇城大学

部局名:DDS 研究所

職名:元特任教授

研究者番号(8桁):90004613