

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15455

研究課題名(和文)リン脂質リポソームを用いた気道過敏症の治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the therapy for allergic airway hypersensitivity by using a phospholipid liposome

研究代表者

渋谷 彰 (SHIBUYA, Akira)

筑波大学・生命領域学際研究センター・教授

研究者番号：80216027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：気管支喘息は可逆性の気道閉塞、気道炎症、気道過敏性で特徴づけられ、喘息患者の約10%はステロイド抵抗性の難治性重症喘息であることから、新しい治療法の開発が必要とされている。本研究では、PC-liposomeの気道過敏性治療効果を明らかにすることを目的とした。PC-liposomeをHDM誘導開始後3週間目から5日間経鼻投与するとメサコリン負荷時気道過敏性の抑制傾向が観察され、HDM誘導開始後2週間目から10日間経鼻投与すると気道過敏性が完全に消失する現象を観察した。これらの結果は、PC-liposomeが喘息治療に有効である可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Bronchial asthma is characterized by reversible bronchial obstruction, airway inflammation and airway hypersensitivity. Since some patients with this disease show resistance to the steroid therapy, the development of a new therapy for this disease is being expected. In this study, we aimed to clarify the effect of PC-liposome on airway hypersensitivity to methacholine. Mice that were treated i.n. with PC-liposome for 5 days 3 weeks after the start of induction of allergic asthma by HDM treatment showed amelioration of the airway hypersensitivity. Those mice treated with PC-liposome for 10 days 2 weeks after the start of induction of allergic asthma by HDM treatment showed no airway hypersensitivity. These results suggest a possibility that the therapy by PC-liposome is useful for the allergic asthma.

研究分野：免疫学、血液内科学

キーワード：喘息

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息の現状:気管支喘息は可逆性の気道閉塞、気道炎症、気道過敏性で特徴づけられる。このうち気道過敏性は気管支喘息の病態の本態であり、気道過敏性の亢進と気管支喘息の重症度は相関することから、気道過敏性の制御は重要である。喘息の治療に最も有効とされる吸入ステロイドは好酸球性の炎症を抑制することで気道過敏性を低下させ、喘息症状を改善する。しかし、喘息患者の約10%はステロイド抵抗性の難治性重症喘息であることから、新しい治療法の開発が必要とされている。

LSは肺胞表面を覆う界面活性物質で、約90wt%の脂質と約10wt%の蛋白質からなり、肺胞内の表面張力低下作用により呼吸時における肺胞拡張の負担を軽減し肺胞の虚脱を防ぐ。LSの量的および質的な活性低下は新生児呼吸窮迫症候群(NRDS)や急性呼吸窮迫症候群(ARDS)の他、肺炎、肺癌、喘息など多くの呼吸器疾患で報告されており(Enhörning, Chest J, 2008;Hohlfeld, Respir Res, 2002)、重症例での人工LSの治療効果が報告されている。喘息患者においても人工LS(Pumactant)の吸入により呼吸機能(FEV1%)が改善することが報告され(Babu et al, Eur Respir, 2003)、喘息治療に人工LSが有用である可能性が示されている。

申請者はLSの脂質成分の約50%を占めるPhosphatidylcholine(PC)をリポソーム化し(PC-liposome)、House dust mite(HDM)により喘息を誘導したマウスに経鼻投与したところ、メサコリン吸入負荷時の気道過敏性が完全に消失する現象を見出した(図1、未発表)。このことから、HDM喘息モデルではLS活性が低下しており、PC-liposome投与によりLS活性が回復することで気道過敏性が消失する可能性が考えられ、PC-liposomeが人工LSとして気道過敏症の治療薬となりうる可能性が示された。

2. 研究の目的

本申請課題では、PC-liposomeの気道過敏性治療効果および作用機序を明らかにすることを目的として、PC-liposomeが、i, HDM以外の喘息モデルにおいても気道過敏性の治療効果を有するか、ii,これらの喘息モデルにおける気道炎症および血清IgE抗体価を抑制する効果を有するか、iii,これらの喘息モデルにおいてLS活性が低下するのか、また、PC-liposomeを投与することでLS活性が回復するのかについて明らかにする。

気道過敏性におけるLSの役割は不明である。本研究により、PC-liposomeの治療効果と作用機序が明らかになれば、吸入ステロイドと β_2 刺激薬の併用薬で気道炎症をコントロールできない重症喘息においてもLS活性を回復させることで気管支喘息の本態である気道過敏性を制御できる可能性を示すことになる。また、世界的に完全合成型LSの開発が精力的に行われているが、LSの主成分であるPCをリポソーム化すること人工LSの機能を獲得することが明らかになれば、気道過敏症のみならず、成人の呼吸器疾患全般の新しい治療法の基盤開発に貢献することが可能である。

3. 研究の方法

クロロホルムに溶解しPhosphatidylcholineをナス型フラスコに採取し、ロータリーエバポレーターを用いて脂質薄膜を作製後、脂質薄膜は室温にてPBSに水和させた。液体窒素と温浴で凍結融解を10回行った後、Extruder(Avestin Liposofast)を用いて100nmのPC-liposome(1mM)を作製する。予備実験において、phosphatidylcholineはPOPC(2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)を用いたが、LSの主成分であるPCはDPPC(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)で構成脂肪酸が異なる。そこでPC-liposomeの作製はPOPCの他、DPPCもリポソーム化する。

またリポソームのサイズは予備実験では 100 nmで調整したが、本研究では 100 nm 以外のサイズ(30, 50, 200, 500, 1000 nm)も作製し、治療効果を検討する。

HDM 経鼻的頻回投与による喘息の誘導:ヤケヒョウダニ(Dermatophagoides pteronyssinus: Der p)の抽出物(HDM; 10 µg/mouse)を週 5 日 4 週間、計 20 回経鼻投与する。最終免疫から3日後に解析する。

4. 研究成果

野生型マウスにHDM(10 µg)を週5日、4週間経鼻投与し、最終投与から3日後にメサコリン負荷時の気道過敏性をflexiVentを用いて測定した。また、PC-liposomeの投与は、50 µLを経鼻的に1週間プロトコルでは(1wk)ではd21-25の5日間投与し、2週間プロトコル(2wk)ではd14-18およびd21-25 まで計10日間投与した。その結果PC-liposomeをHDM 誘導開始後3週間目から5日間経鼻投与すると(PC-1wk)メサコリン負荷時気道過敏性の抑制傾向が観察され、HDM 誘導開始後2週間目から10日間経鼻投与すると(PC-2wk)気道過敏性が完全に消失する現象を観察した。

アレルギー性気管支喘息は、世界保健機関(WHO)の ICD (International Statistical Classification of Disease and Related Health Problems: 疾病および関連保健問題の国際統計分類)の統計によると、患者数は世界で3億人、日本で約300万人、毎年の死者数世界で25万人超、日本で3,000人にも及ぶため、喘息の治療法を開発することは世界的急務である。気管支喘息の重症度は気道過敏性の亢進と相関するため、気道過敏性の制御機構は気管支喘息の治療法開発の標的となる。

呼吸器疾患に対する薬物輸送システムにリポソームを用いる発想はすでにあるが(Swaminathan et al, Controlled Pulmonary Drug Delivery, 2011)、PC-liposomeの呼吸疾

患に対する治療効果についての報告はない。一方、予防効果については、プレオマイシンによる肺線維症モデルにおいて、PC-liposomeを予め投与することで病態を抑制する報告があるが(Gwinn et al, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010)、その作用機序は不明である。PCは創傷治癒効果(Kornilova et al, Bulletin of Exp Biol Med, 2001)や抗炎症作用を有するという報告もあるが(Shraer et al, Liposome Res, 1994)、詳細は明らかではない。PCは肺サーファクタントの主成分であることから、PC-liposome投与により肺サーファクタント活性を回復させるという発想は斬新であり、その作用機序を明らかにすれば、喘息の病態の理解や新しい治療法開発の基盤研究となり、革新的である。

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7件)

1. Udayanga K G S, Nakamura Y, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Immunoreceptor CD300a on mast cells and dendritic cells regulates neutrophil recruitment in a murine model of sepsis. Int Immunol, 28(12), 611-615, 2016 査読有 (DOI: 10.1093/intimm/dxw047)
2. Tsurusaki S, Tahara-Hanaoka S, Shibagaki S, Miyake S, Imai M, Shibayama S, Kubo M, Shibuya A. Allergin-1 inhibits TLR2-mediated mast cell activation and suppresses dermatitis. Int Immunol, 28(12):605-609, 2016 査読有 (DOI: 10.1093/intimm/dxw046)
3. Sato K, Honda SI, Shibuya A, Shibuya K. Improved protocol for the isolation of naïve follicular dendritic cells. Mol Immunol, 78:140-145, 2016 査読有 (DOI: 10.1016/j.molimm.2016.09.011)
4. Haraguchi N, Kikuchi N, Morishima Y, Matsuyama M, Sakurai H, Shibuya A, Shibuya K, Taniguchi M, Ishii Y.

- Activation of murine invariant NKT cells promotes susceptibility to candidiasis by IL-10-induced modulation of phagocyte antifungal activity. *Eur J Immunol*, 46(7):1691-1703, 2016 査読有 (DOI: 10.1002/eji.201545987)
5. Kanaya M, Shibuya K, Hirochika R, Kanemoto M, Ohashi K, Okada M, Wagatsuma Y, Cho Y, Kojima H, Teshima T, Imamura M, Sakamaki H, Shibuya A. Soluble DNAM-1, as a predictive biomarker for acute graft-versus-host disease. *PloS One*, 11(6): e0154173, 2016 査読有 (DOI: 10.1371/journal.pone)
 6. Honda S, Sato K, Totsuka N, Fujiyama S, Fujimoto M, Miyake K, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Marginal zone B cells exacerbate endotoxic shock via interleukin-6 secretion induced by Fc α / μ R-coupled TLR4 signalling. *Nat Commun*, 7:11498, 2016 査読有 (DOI: 10.1038/ncomms11498)
 7. Iguchi-Manaka A, Okumura G, Kojima H, Cho Y, Hirochika R, Bando H, Sato T, Yoshikawa H, Hara H, Shibuya A, Shibuya K. Increased soluble CD155 in the serum of cancer patients. *PloS One*, 11(4), 2016 査読有 (DOI: 10.1371/journal.pone.0152982)
- [学会発表](計19件)
1. 渋谷 彰, 小田 ちぐさ 上皮の細胞死によるバリア組織の恒常性の制御 第35回サイトプロテクション研究会 メルパルク京都(京都市下京区) 2017.3.10
 2. 渋谷 彰 バリア組織の細胞死とアレルギー, 炎症疾患 Advanced Seminar Series on Microbiology and Immunology 大阪大学微生物病研究所(大阪府吹田市) 2017.2.16
 3. Kanemaru K, Denda-Nagai K, Irimura T, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Clec10a, suppresses Der f-induced immune response and dermatitis. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 2016.12.7
 4. Shibagaki S, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Characterization of mouse ES cell-derived mast cell line, MEDMC-BRC6. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 2016.12.6
 5. Nakamura Y, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Elovl6 attenuates mechanical stress-induced skin inflammation. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 2016.12.5
 6. Vo AV, Takenaka E, Yamashita-Kanemaru Y, Shibuya A, Shibuya K. Involvement of DNAM-1 (CD226) expressed on small peritoneal macrophages in antigen presentation. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 2016.12.5
 7. Okumura G, Abe F, Ito M, Shibuya A, Shibuya K. Development of molecular targeted therapy for human acute GVHD in humanized mice. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 2016.12.5
 8. Iizuka A, Segawa S, Kaneko S, Yokosawa M, Kondo Y, Tahara-Hanaoka S, Shibayama S, Goto D, Matsumoto I, Shibuya A, Sumida T. The regulatory role of Allergin-1 in autoantibody production. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 2016.12.5
 9. 渋谷 彰 Inhibitory Immunoreceptors in Inflammation and Allergy. 京都大学医学研究科 免疫・アレルギー・感染コース リトリート 白浜荘(滋賀県高島市) 2016.11.19
 10. 渋谷 彰 死細胞によるアレルギー, 炎症応答の制御 千里ライフサイエンスセミナーK4 免疫・感染症シリーズ第6回「ワ

- クチン,アジュバント開発研究の最前線」千里ライフサイエンスセンタービル(大阪府豊中市) 2016.11.15
11. Nakazawa Y, Nakahashi-Oda C, Nakamura Y, Udayanga KGS, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control the abundance of regulatory T cell at barrier surfaces. Immune Profiling in Health and Disease, The Fairmont Olympic Hotel, Seattle, WA, USA, 2016.10.3
 12. 渋谷 彰 抑制性免疫受容体によるアレルギー炎症疾患の制御 Legend Seminar 徳島大学 藤井節郎記念医科学センター(徳島県徳島市元町) 2016.9.15
 13. 渋谷 彰、小田 ちぐさ 常在細菌叢によるバリア組織の恒常性維持 第44回日本臨床免疫学会総会 京王プラザホテル(東京都新宿区) 2016.9.8
 14. 渋谷 和子、阿部 史枝、伊藤 守、渋谷 彰 ヒト化マウスを用いた抗ヒトDNAM-1 抗体によるヒト急性GVHDの治療法開発 第8回血液疾患免疫療法学会学術集会 北海道大学医学部学友会館(北海道札幌市) 2016.9.3
 15. Nakahashi-Oda C, Udayanga K. G. S, Nakamura Y, Nakazawa Y, Totsuka N, Miki H, Iino S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control the abundance of regulatory T cells at barrier surfaces. International Congress of Immunology 2016, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Australia, 2016.8.25
 16. Yamashita-Kanemaru Y, Bernhardt G, Shibuya A, Shibuya K. CD155 (PVR/Nect5) mediates a costimulatory signal in CD4+ T cells and regulates allergic inflammation. International Congress of Immunology 2016, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Australia, 2016.8.25
 17. Niizuma K, Tahara-Hanaoka S, Noguchi E, Shibuya A. Identification and characterization of CD300H, a new member of the Human CD300 immunoreceptor family. International Congress of Immunology 2016, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Australia, 2016.8.25
 18. 渋谷 彰 抑制性免疫受容体による疾患制御 タイムシグナルと制御シンポジウム 下田東急ホテル(静岡県下田市) 2016.6.11
 19. 渋谷 彰 抗生物質による腸内細菌バランスの乱れと喘息 第63回日本実験動物学会 ミューザ川崎シンフォニーホール(神奈川県川崎市) 2016.5.18
- 〔図書〕(計0件)
- 〔産業財産権〕
出願状況(計1件)
- 名称:抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体及びその使用
発明者:渋谷 彰、渋谷 和子、阿部 史枝、広近 玲、奥村 元紀
権利者:同上
種類:特許
番号:2016-84170
出願年月日:平成28年4月20日
国内外の別:国内
- 取得状況(計1件)
- 名称:可溶性CD155タンパク質を用いた癌の検出方法
発明者:渋谷 彰、渋谷 和子、井口 研子
権利者:同上
種類:特許
番号:特許第5995117号
出願年月日:平成22年1月28日
取得年月日:平成28年9月2日
国内外の別:国内
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://immuno-tsukuba.com/index.html>
6. 研究組織
(1)研究代表者
渋谷 彰 (SHIBUYA, Akira)
筑波大学・生命領域学際研究センター・教授

研究者番号：80216027