

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17637

研究課題名（和文）粉末siRNA製剤を用いたCCL15を標的とする気管支喘息の新規経気道治療の開発

研究課題名（英文）Development of novel inhaled bronchial asthma therapy targeting CCL-15 using siRNA dry powder

研究代表者

宮本 真太郎（Miyamoto, Shintaro）

広島大学・病院（医）・講師

研究者番号：30633995

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：誘発喀痰上清中のCCL15の濃度は、気管支喘息患者において健常者と比べ有意に高値であり、血清ペリオスチン濃度との間には有意な相関が認められた。ヒトCCL15のマウスにおけるオルソログであるCCL9を用いてマウスにおける研究を行ったところ、喘息モデルマウスではコントロールと比較して気管支肺胞洗浄液中のCCL9濃度は有意に上昇しており、気道上皮細胞、気道平滑筋細胞、血管内皮細胞、気道上皮下の炎症細胞にCCL9が発現していることを肺組織の免疫染色により確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、喘息気道においてCCL15の発現が亢進していることが示され、CCL15が喘息の病態や難治化に関わっている可能性があると考えられた。これらの結果より、CCL15は気管支喘息の診断や気道炎症の評価において役立つバイオマーカーとして有望と考えられ、難治性喘息の病態解明や喘息診断・気道炎症評価における新たな検査法の開発、さらにはCCL15を標的とした新規気管支喘息治療の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We measured CCL-15 levels in induced sputum (IS) from asthmatic subjects and healthy controls. In asthmatic subjects, IS CCL-15 levels were elevated, compared with that of healthy controls. CCL-15 levels in IS were also found to correlate with serum periostin levels. The CCL-9, the mouse ortholog of CCL15, levels in the bronchoalveolar lavage fluids (BALFs) of the asthma models were significantly increased compared with those of control mice. An immunohistochemical examination showed that the expression of CCL-9 was detected in the bronchial epithelium, airway smooth muscle cells, vascular endothelial cells, and subepithelial inflammatory cells in the mice.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：気管支喘息 CCL15 喘息モデルマウス siRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は気道の慢性炎症によって気道過敏性の亢進を生じ、それにより非可逆的な気道壁の線維化(気道リモデリング)をきたして気流制限を生じる疾患であり、その病態には様々な炎症性サイトカインが関与している。その炎症性サイトカインの1つである CCL15 は MCP-1 (macrophage inflammatory protein-1) family に属し、細胞走化活性に関わる CC ケモカインであり、気道や肺に強く発現することが報告されている(Joubert P et al. 2011)。また、関節リウマチ患者の滑膜組織において CCL15 の発現が亢進していた(Haringman JJ et al. 2006)との報告や、線維化の進行したサルコイドーシス患者の BALF (気管支肺胞洗浄液)中の CCL15 濃度が上昇していた(Arakaelyan A et al. 2009)との報告もあり、CCL15 が組織の慢性炎症、特に肺の慢性炎症および線維化に深く関わっていることも示唆される。そして、喘息患者の気道平滑筋細胞における in vitro のデータでは、CCL15 の発現が亢進し(Joubert P et al. 2011)、また CCL15 の高親和性受容体である CCR1 の発現も亢進している(Joubert P et al. 2008)との報告もされている。さらには、血清中の CCL15 濃度が重症喘息患者において上昇していること(Shimizu Y et al. 2011)も報告されている。以上より、CCL15 は気管支喘息の病態、特に気道炎症や気道リモデリングに関与していることが示唆され、特に重症喘息のバイオマーカーや治療標的となる可能性があるが、ヒトの気道分泌液中の CCL15 の発現や気道上皮細胞、気道基底膜など気道平滑筋細胞以外の気道構成細胞における CCL15 の発現についての報告はない。また、喘息モデルマウスを用いた CCL15 についての報告は存在せず、CCL15 が喘息の病態に関する機序の詳細は不明であり、CCL15 の気管支喘息における治療標的としての有用性を評価した報告や、CCL15 を標的とした喘息治療についての報告は存在しない。以上より、本研究では CCL15 の気管支喘息の病態における関与の詳細とその機序の解明を学術的問いとし、このことについて検証することとし、さらには CCL15 を標的とした経気道治療の開発を最終的な目的とした。

### 2. 研究の目的

まず CCL15 の気管支喘息の病態における関与の詳細とその機序を解明し、CCL15 の喘息の診断や気道炎症評価のためのバイオマーカーとしての有用性および治療標的としての有用性を評価し、その後、CCL15 を標的とする新規喘息治療を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 誘発喀痰検体を用いた研究

当院当科へ通院中の気管支喘息患者の誘発喀痰上清中の CCL15 濃度を測定し、健常者および COPD 患者の誘発喀痰上清中の CCL15 濃度と比較検討する。これにより、気管支喘息患者の気道において、CCL15 の発現が特異的に亢進しているかどうかを調べる。次に、気管支喘息患者の誘発喀痰上清中の CCL15 濃度と、喘息患者の各種背景因子や各種サイトカインとの関連について検討する。

#### (2) 野生型喘息モデルマウスを用いた研究

CCL15 はマウスには存在しないため、他のヒト CCL15 に関する研究と同様に、ヒト CCL15 のマウスにおけるオルソログである CCL9 を用いて、マウスにおける研究を行う。

卵白アルブミン(OVA)を抗原とする気管支喘息モデルマウスを作製し、気道における CCL9 の発現をコントロールマウスと比較検討する。また気道中の CCL9 の発現と、その他の各種サイトカインとの関連を調べる。これらによって CCL9 の気管支喘息の病態における役割を明らかにし、またバイオマーカーとしての有用性を評価する。

・8週齢雌 C57BL/6 マウスへ Day0,14 に卵白アルブミン(OVA):10 $\mu$ g の腹腔内投与で感作を行う。

・Day27-30 に 1% OVA の吸入曝露を各日 20 分間ずつ行う。

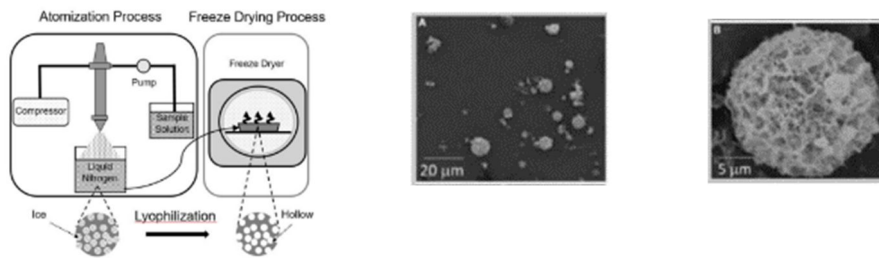
・Day31 に sacrifice (気管支肺胞洗浄液(BALF)細胞分画, BALF 上清中の CCL9 およびその他のサイトカイン濃度測定, 気道過敏性解析, 肺組織標本作製, ハイドロキシプロリン量測定)。

・気道過敏性は、マウスを全身麻酔下で人工呼吸管理を行いながら、気道収縮物質メサコリンの吸入濃度の上昇に伴う気道抵抗の上昇度を解析して判定する。

・マウス喘息肺組織において CCL9 の免疫染色を行い、CCL9 の発現部位を同定する。

### (3) CCL9 を標的とした粉末 siRNA 製剤を用いる新規経気道喘息治療の開発研究

まずは、研究代表者およびそのグループが過去に報告した方法(Miyamoto S et al, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2011)を参考に、マウス CCL9 を標的とした市販の液体 siRNA を入手し、これを喘息モデルマウスに経気道投与することで、気道炎症、気道過敏性、気道リモデリングがどのように変化するか調べる。マウス CCL9 を標的とした液体 siRNA の経気道投与により、喘息モデルマウスの気道炎症、気道過敏性、気道リモデリングが抑制されたら、次にその液体 siRNA を粉末化したものを喘息モデルマウスに経気道投与して、気道炎症、気道過敏性、気道リモデリングが抑制できるかを調べる。液体 siRNA の粉末化は、研究代表者およびそのグループが過去に報告した方法(Ihara D et al, Pharm Res 2015) (Miwata K, Miyamoto S et al, Mol Ther Nucleic Acids. 2018)を参考に、マウス CCL9 を標的とした液体 siRNA を名城大学 薬物動態制御学に依頼して粉末化(フリーズドライ)する。液体 siRNA の粉末化(フリーズドライ)方法の概略および、粉末化した siRNA 粒子の画像(Miwata K, Miyamoto S et al, Mol Ther Nucleic Acids. 2018)を下に示す。



- ・ Control siRNA として、CCL9 を標的とした siRNA と塩基組成は同様で配列が異なり、マウス細胞の遺伝子と同一性を持たないような配列の siRNA を用いる。
- ・ 経気道投与に用いる CCL9 を標的とする siRNA の量およびタイミングについては、喘息モデルマウスにおける他の物質を標的とした siRNA の経気道投与の自施設および他施設の報告例を参考に preliminary な実験を行い決定する。

## 4. 研究成果

誘発喀痰上清中の CCL15 の濃度は、気管支喘息患者において健常者と比べ有意に高値であり、気管支喘息患者の誘発喀痰上清中の CCL15 濃度と血清ペリオスチン濃度との間には有意な相関が認められた。これらより、気管支喘息患者の気道において CCL15 の発現が亢進しており、気道中の CCL15 は気管支喘息の診断や病勢の把握に役立つバイオマーカーとして有望であり、また CCL15 は特に気道炎症や気道リモデリングといった気管支喘息の主病態および難治化に関わっている可能性があることが示唆された。

続いて、喘息モデルマウスを用いた研究を行うこととしたが、CCL15 はマウスには存在しないため、他のヒト CCL15 に関する研究と同様に、ヒト CCL15 のマウスにおけるオルソログである CCL9 を用いて、マウスにおける研究を行った。マウス気道における CCL9 発現の程度を気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の CCL9 濃度の測定により、また気道における CCL9 発現部位の同定を肺組織の CCL9 免疫染色を用いて、喘息モデルマウスとコントロールマウスとを比較することで検討した。すると、喘息モデルマウスではコントロールマウスと比較して BALF 中の CCL9 濃度は有意に上昇しており、また喘息モデルマウス肺組織における CCL9 免疫染色の結果、気道上皮細胞、気道平滑筋細胞、血管内皮細胞、気道上皮下の炎症細胞に CCL9 が発現していることを確認できた。以上より、喘息モデルマウスの気道において CCL9 が発現亢進していることが示され、マウス CCL9 (ヒト CCL15) は喘息病態へ関与している可能性が高く、喘息治療標的として有望であると考えられた。その後は、喘息モデルマウスにおいて siRNA を用いて気道の CCL9 を経気道的にノックダウンする治療の開発を進め、最終的にはヒト気道の CCL15 を標的とする新規喘息吸入治療の開発を目指していた。しかし、CCL9 を標的とした siRNA の喘息モデルマウスへの経気道投与では、siRNA の量、濃度、投与回数、投与間隔等の工夫や、transfection 試薬の液体 siRNA への添加等を試みたが、気道炎症を有意に抑制することは本研究期間内にはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------