

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860029

研究課題名(和文)革新的な肺胞再生誘導剤を用いた慢性閉塞性肺疾患の再生治療用経肺システムの構築

研究課題名(英文)Development of the novel therapeutic drug for chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

堀口 道子(Horiguchi, Michiko)

東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：70632470

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)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)は世界の死亡原因の第4位であるが、破壊された肺胞を修復する有効な根治的治療法は未だ存在していない。

申請者は、COPDの根治的治療法の確立を目指して、破壊された肺胞の再生を作用点とする新規化合物の探索を行った。その結果、世界で初めて活性型ビタミンD3が肺胞再生効果を有するという新規の知見を発見した。しかし、活性型ビタミンD3がどのような分子機構によってヒト肺胞上皮幹細胞の分化を誘導するか十分な検討は出来ておらず、作用点の同定が急務であった。本研究では、上記の問題を鑑み、活性型ビタミンD3の肺胞再生効果の増大や副作用を予測するために分子機構の解明を行った。

研究成果の概要(英文)：COPD is a progressive respiratory disease with several causes, including smoking, and no curative therapeutic agent is available, particularly for destructive alveolar lesions. In this study, we investigated the alveolar regenerative effect of the active vitamin 1,25-dihydroxy vitamin D3 (VD3) with the ultimate goal of developing a novel curative drug for COPD. To evaluate the alveolus-repairing effect of VD3, we administered VD3 intrapulmonarily to elastase-induced COPD model mice and computed the mean distance between the alveolar walls as an index of the extent of alveolar injury. Results showed revealing excellent alveolus-regenerating effect of VD3. These results revealed the potent activity of VD3 in inducing differentiation of the Calu-6 cells and the effect of topical administration of VD3 to the lungs to induce lung regeneration at histological and functional levels, demonstrating the potential of VD3 as a curative agent for alveolar destruction in COPD.

研究分野：薬剤学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 活性型ビタミンD3 再生治療

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD :chronic obstructive pulmonary disease)は世界の死亡原因の第4位(患者数 8000 万人以上)であるが、破壊された肺胞を修復する有効な根治的治療法は未だ存在していない。申請者は、COPD の根治的治療法の確立を目指して、破壊された肺胞の再生を作用点とする新規化合物の探索を行った。その結果、世界で初めて活性型ビタミン D3 が肺胞再生効果を有するという新規の知見を発見した(堀口、特許出願中)。しかしながら、活性型ビタミン D3 がどのような分子機構によってヒト肺胞上皮幹細胞の分化を誘導するか十分な検討は出来ておらず、有効性を高める為の作用点の同定が急務であった。

また、既に臨床で骨粗鬆症等に使用されている活性型ビタミン D3 経口製剤では、高カルシウム血漿による重篤な副作用が報告されており、副作用の問題がない投与量では肺局所における有効治療濃度に達しないことが推定される。そこで、活性型ビタミン D3 を用いた COPD 再生治療法確立の為には、肺局所に存在する肺胞上皮幹細胞への効率的な薬物送達技術の構築が必要となる。申請者の研究グループは、既に新規経肺投与用乾燥粉末吸入システム(72 カ国で特許登録済み C.Yamashita et. al., US Patent:US744879 (2008))を開発し、タンパク質やペプチド等の生体高分子の経肺製剤を開発してきた。本システムは、従来のジェットミル法やスプレードライ法による製造工程中で微粒子化した製剤とは異なり、集合体である凍結乾燥ケーキが患者の吸入時に初めて微粒子となるように設計した新しい概念の吸入システムである。本吸入システムは、凍結乾燥を用いておりビタミン D3 のような熱に不安定な生体成分に非常に有用であり、既に肺局所における薬物の分布を制御することが可能であったが、特定の肺構成細胞への薬物の送達や細胞内デリバリーを制御するシステムの構築には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、上記の問題を鑑み、活性型ビタミン D3 の肺胞再生効果の増大や副作用を予測するために分子機構の解明を行った。

さらに、本研究では、肺胞再生を目指した新規慢性閉塞性肺疾患の治療薬として、肺胞幹細胞指向型ビタミン D3 経肺システムを構築し COPD 治療効果を評価することで革新的な COPD 根治的治療法を構築することを目標に研究を行った。

3. 研究の方法

活性型ビタミン D3 のヒト肺胞上皮幹細胞分化誘導責任因子の同定とシグナル経路の解明

肺胞上皮幹細胞の膜受容体発現解析によるデリバリー標的分子の同定と、これらの知見を利用した肺胞上皮幹細胞への指向性を高めたドラッグデリバリー(DDS)技術の構築

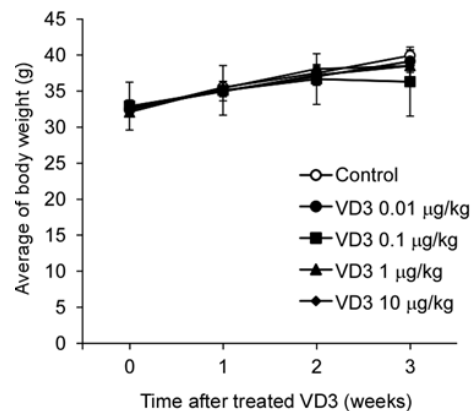
肺胞上皮幹細胞指向型ビタミン D3 の経肺システムの構築

肺胞上皮幹細胞指向型ビタミン D3 経肺製剤の COPD 再生治療効果の評価

4. 研究成果

VD3 経肺投与による体重の変化

現在、VD3 は骨粗鬆症および慢性腎不全、副甲状腺機能低下症、ビタミン D 抵抗性クル病の際のビタミン D 代謝異常の改善などに適応があり臨床で使用されている。一方で、COPD に対する肺胞再生効果については全く報告がない。そこで、エラスターゼ誘導性 COPD モデルマウスに対する VD3 の薬理効果を評価した。まず、VD3 経肺投与に



よる全身への影響を評価するため、エラスターゼ誘発性 COPD モデルマウスにおいて、VD3 の投与量による体重に対する影響を評価した結果、0.01 から 10 µg/kg の VD3 経肺投与群では有意な体重変化は観察されなかった(Fig. 1)。

Figure 1

COPD モデルマウスにおける VD3 経肺投与による肺胞再生効果

そこで、エラスターゼ誘導性 COPD モデルマウスを用いて、VD3 による肺胞修復効果を評価した。エラスターゼ 7.5U を週 2 回経肺投与し作成した COPD モデルマウスに、0、0.01、0.1、1 µg/kg の VD3 を週 2 回経肺投与し、最初の VD3 投与から 3 週間後に肺組織を摘出しヘマトキシリン・エオジン染色を行った。その結果、肺胞の障害の程度を示す平均肺胞壁間距離は、

Control 群の $56.7 \pm 9.7 \mu\text{m}$ に比較して $0.01 \mu\text{g/kg}$ VD3 群では $32.6 \pm 6.0 \mu\text{m}$ であり、 $0.1 \mu\text{g/kg}$ VD3 群では $24.2 \pm 4.1 \mu\text{m}$ であり、 $1 \mu\text{g/kg}$ VD3 群では $23.6 \pm 1.6 \mu\text{m}$ を示し、以前に報告した正常マウスの $24.1 \mu\text{m}$ と同程度まで改善することが明らかとなった (Fig. 2)。以上の結果より、VD3 経肺投与群では 0.01 から $1 \mu\text{g/kg}$ のいずれの投与量においても Control 群に比較して有意に肺胞壁間距離が縮小し、有意な肺胞再生効果を有する事が明らかになった (Fig 2)。

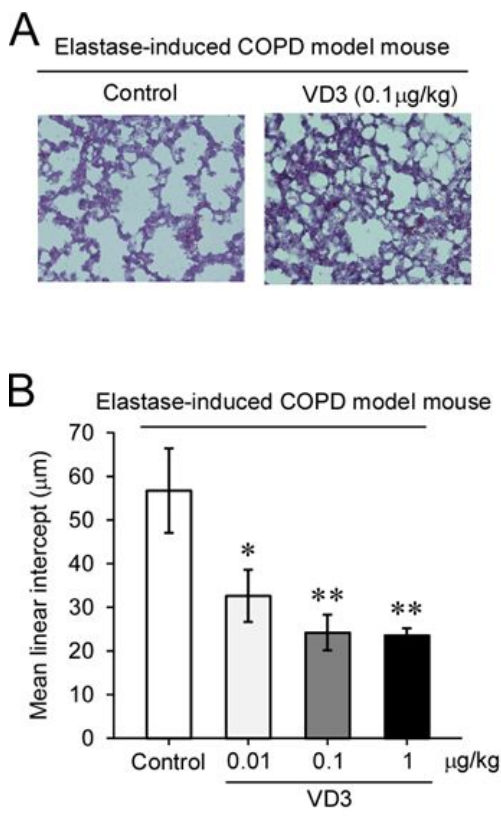


Figure 2

COPD モデルマウスにおける VD3 経肺投与による肺の弾性の改善
COPD では肺胞が障害され、肺の弾性収縮力が低下することで呼吸障害を呈する。そこで、VD3 の経肺投与が COPD モデルマウスの肺の弾性を回復させるかについて高性能呼吸機能解析システム (flexiVent) を用いて評価した。その結果、肺の弾性と表面張力を示す Tissue Elastance は、Control 群の $9.3 \pm 1.8 \text{ cmH}_2\text{O} / \text{ml}$ に比較して VD3 投与群では $17.6 \pm 2.1 \text{ cmH}_2\text{O} / \text{ml}$ と有意に増大し、正常マウスの $20.4 \pm 2.2 \text{ cmH}_2\text{O} / \text{ml}$ と同程度まで回復が認められた。

COPD モデルマウスにおける VD3 経肺投与による呼吸機能の改善
さらに、VD3 が COPD モデルマウスの呼吸機能を回復させるかについて高性能呼吸機能解析システム (flexiVent) を用いて評価した。呼吸機能の指標となる、強制肺活

量 (FVC) に対する 0.05 秒間の強制呼気容量 (FEV_{0.05}) 値は、Control 群の $38.7 \pm 4.7 \%$ に比較して、VD3 投与群では $68.3 \pm 6.0 \%$ と有意に増加し、正常マウスの $80.8 \pm 4.8 \%$ に近い値まで回復が認められた。

以上の結果より、VD3 は、COPD モデルマウスにおいて肺胞の修復および呼吸機能を回復することが明らかとなった。

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 14 件)

- Ozawa C., Horiguchi M., Akita T., Hirokawa M., Nakao Y., Abe K., Yamashita C. 「 Peroxisome Proliferator- Activated Receptor β/δ Stimulation Induces the Differentiation of Human Alveolar Epithelial Progenitor Cell. 」 *Insights in Chest Diseases.* in press. 査読有
- Akita T., Horiguchi M., Ozawa C, Terada H, Yamashita C. 「 The Effect of a Retinoic Acid Derivative on Cell-Growth Inhibition in a Pulmonary Carcinoma Cell Line. 」, *Biol Pharm Bull.* 2016;39(3):308-12. doi: 10.1248/bpb.b15-00524. 査読有
- Ozawa C., Horiguchi M., Akita T., Oiso Y., Abe K., Motomura T., Yamashita C. 「 Pulmonary Administration of GW0742, a High-affinity Peroxisome Proliferator-activated Receptor Agonist, Repairs Collapsed Alveoli in an Elastase-Induced Mouse Model of Emphysema. 」, *Biol Pharm Bull.* 2016;39(5):778-85. doi: 10.1248/bpb.b15-00909. 査読有
- Horiguchi M., Oiso Y, Sakai H, Motomura T, Yamashita C., 「 Pulmonary administration of phosphoinositide 3-kinase inhibitor is a curative treatment for chronic obstructive pulmonary disease by alveolar regeneration. 」, *The Journal of Controlled Release*, 6 July 2015; 213 : 112-119. (Impact factor 7.768) doi:10.1016/j.jconrel.2015.07.004. 査読有
- Sakai H.*, Horiguchi M.*, Ozawa C., Akita T., Hirota K., Shudo K., Terada H., Makino K., Kubo H., Yamashita C., 「 Pulmonary administration of Am80 regenerates collapsed alveoli. 」, *The Journal of Controlled Release*, 28 December 2014; 196 : 154-160. (Impact factor 7.768) *equally contribute. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.10.004. 査読有
- Horiguchi M., Kojima H., Sakai H., Kubo

- H., Yamashita C. 「Pulmonary administration of integrin -nanoparticles regenerates collapsed alveoli.」, *The Journal of Controlled Release*, 10 Aug 2014; 187:167-174. (Impact factor 7.768) doi: 10.1016/j.jconrel.2014.05.050. 査読有
7. **Horiguchi M.**, Koyanagi S., Hamdan A, Kakimoto K., Matsunaga N., Yamashita C., Ohdo S. 「Rhythmic control of the ARF-MDM2 pathway by ATF4 underlines circadian accumulation of p53 in malignant cells.」, *Cancer Research*, 2013 Apr 15; 73(8):2639-49. (Impact factor 9.286) doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2492. 査読有
 8. **Horiguchi M.** 「DEVELOPMENT OF THE NEW COMPOUNDS FOR ALVEOLUS REPRODUCTION」, *iPoPs*, 2014, 3: 11, 20. 査読有
 9. **Horiguchi M.**, Yamashita C., 「Development of the new therapeutic drug for COPD」, *Indo-Japanese on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries*, 2014, 3-11. 査読有
 10. Akita T., **Horiguchi M.**, Shudo K., Terada H., Yamashita C., 「Effects of a Retinoic Acid Derivative on Cell Growth Inhibition in Lung Cancer」, *Indo-Japanese on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries*, 2014, 141-142 査読有
 11. Sakai H., **Horiguchi M.**, Shudo K., Terada H., Makino K., Yamashita C., 「Pulmonary administration of Am80 regenerates collapsed alveoli」, *Indo-Japanese on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries*, 2014, 137-139 査読有
 12. Karube H., **Horiguchi M.**, Yamashita C., 「Establishment of refractory lung cancer cell model and consideration of treatment for refractory lung cancer」, *Indo-Japanese on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries*, 2014, 133-135 査読有
 13. Nakao Y., Nakamura R., Ozawa C., Hamada S., **Horiguchi M.**, Oka J., Yamashita C., 「Development of a nasal formulation for the GLP-2 delivery to the brain」, *Indo-Japanese on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries*, 2014, 143-145 査読有
 14. Ozawa Y., Hirota K., Takeuchi I., Makino K., **Horiguchi M.**, Yamashita C., Terada H., 「The effect of Am80 acid on inflammation in elastase-induced emphysema」, *Indo-Japanese on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries*, 2014, 127-128 査読有
- 〔学会発表〕(計 62 件)
- 〔うち、招待講演 1 2 件〕
1. **Michiko Horiguchi**, Chikamasa Yamashita 「Development of the novel therapeutic drug for chronic obstructive pulmonary diseases」, 4th INTERNATIONAL POSTGRADUATE CONFERENCE ON PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2016年2月27日 Chiba (Tokyo university of Science) (国際学会招待講演)
 2. **Michiko Horiguchi** 「Development of the novel therapeutic drug for chronic obstructive pulmonary disease」, 第89回日本薬理学会年会、2016年3月10日、横浜(パシフィコ横浜)
 3. **堀口道子** 「肺胞の再生を作用点とした COPD 治療薬の開発」, 第59回日本薬学会関東支部大会、2015年9月12日、船橋(日本大学)
 5. **堀口道子**, 山下親正, 「肺胞再生治療薬の開発」, 第14回肺サーファクタント分子病態研究会、2015年6月6日、札幌(札幌医科大学)
 6. **堀口道子**, 「新規肺胞再生治療薬の開発」, がんプロフェッショナル養成基盤推進プラン<ICTと人で繋ぐがん医療維新プラン>トランスレーショナルリサーチセミナー、2015年2月3日、島根(島根大学)
 7. **堀口道子**, 山下親正, 「肺胞再生治療の実現に向けて」, 第5回東京理科大学総合研究機構 戦略的物理製剤学研究基盤センターシンポジウム、第12回東京理科大学薬学部DDS研究センターシンポジウム、2014年12月8日、東京(東京理科大学森戸記念館)
 8. **堀口道子**, 「薬学部の強みを生かして-研究マインドを有する医療人・医療ニーズを理解した研究者の育成-」, 第1回先導的薬剤師の未来像を考えるシンポジウム、2014年11月8日、長崎(長崎大学)
 9. **Michiko Horiguchi**, 「Development of the new therapeutic drug for COPD」, 5th Indo-Japanese International Joint Symposium on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asia Countries, 2014年9月16日 Tokyo (Tokyo university of Science) (国際学会招待講演)

10. **Michiko Horiguchi**, 「Development of the New Compounds for Alveolus Reproduction」, 3rd INTERNATIONAL POSTGRADUATE CONFERENCE ON PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2014年8月11日 Kuala Lumpur (Malaysia) (国際学会招待講演)

11. **堀口道子**, 山下親正「肺胞再生を目指した新規吸入剤の開発」, 第4回東京理科大学総合研究機構戦略的物理製剤学研究基盤センターシンポジウム 第11回東京理科大学薬学部DDS研究センターシンポジウム, 2013年12月16日、東京(東京理科大学森戸記念館)

12. **堀口道子**, 山下親正、「慢性閉塞性肺疾患(COPD)治療薬としてのレチノイン酸の肺胞細胞内挙動の解明」, 第3回東京理科大学総合研究機構 戦略的物理製剤学研究基盤センターシンポジウム 第10回東京理科大学薬学部DDS研究センターシンポジウム, 2012年8月22日、東京(東京理科大学森戸記念館)

〔図書〕(計 1 件)

1. **堀口道子**「肺胞再生治療の実現に向けて」先端医学社 分子呼吸器学、2016年20号 p.104-106

〔産業財産権〕

出願状況(計 6 件)

1. 山下親正、岡淳一郎、**堀口道子**、濱田幸恵、「中枢作用性ペプチド及び医薬組成物」, PCT/JP2015/074962.

2. 山下親正、**堀口道子**、「PI3キナーゼ阻害剤を含む医薬組成物, ビタミンD受容体に作用する化合物を含む医薬組成物, 凍結乾燥組成物, 凍結乾燥組成物の製造方法、及び経肺投与用医薬組成物」, WO 2014/098232, 2014.

3. **堀口道子**、山下親正、伊豫田拓也、深井文雄、「肺胞幹細胞分化誘導剤、医薬組成物、及び肺胞幹細胞分化誘導方法」, 特願 2014-125484, 2014.

4. 山下親正、岡淳一郎、**堀口道子**、濱田幸恵、「中枢作用性ペプチド誘導體、点鼻製剤、抗うつ剤及び認知障害改善剤」, 特願 2014-177974, 2014.

5. 山下親正、岡淳一郎、**堀口道子**、濱田幸恵、「中枢作用性ペプチド誘導體、点鼻製剤、抗うつ剤及び認知障害改善剤」, 特願 2014-184436, 2014.

6. **堀口道子**、山下親正、「PI3キナーゼ阻

害剤を含む医薬組成物, ビタミンD受容体に作用する化合物を含む医薬組成物, 凍結乾燥組成物, 凍結乾燥組成物の製造方法、及び経肺投与用医薬組成物」, PCT/JP2013/084310, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者
堀口道子 (HORIGUCHI, Michiko)
東京理科大学 薬学部・助教
研究者番号: 70632470

(2) 研究分担者
なし