

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10255

研究課題名(和文) プロスタサイクリンアゴニストONO1301の肺再生治療の可能性

研究課題名(英文) Sustained-release delivery of prostacyclin analogue(ONO-1301) enhances lung regeneration after pneumectomy in mice

研究代表者

南 正人 (Minami, Masato)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10240847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：プロスタサイクリンアナログの一種であるONO1301による肺再生治療の可能性について検討した。その結果、マウス肺再生モデルにてONO1301の肺再生効果が示唆された。これは呼吸機能改善のみならず、組織学的にも肺再生の可能性が明らかになった。これはプロスタサイクリンアナログのII型肺胞上皮に対するHGF遺伝子発現上薬の結果による可能性が示唆された。またONO1301をシートに塗布した貼付法による局所治療の可能性も明らかにした。

研究成果の概要(英文)：ONO1301 is a synthetic prostacyclin analog characterized by chemically stable structure and enhances hepatocyte growth factor (HGF), and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion. Here, we hypothesized that sustained delivery of ONO1301 may induce therapeutic effects of residual lung compensatory lung growth after left pneumectomy in mice. In histopathological findings, the enlarged airspace and emphysematous change of residual lung were suppressed in the presence of ONO1301 groups(ONO) as compared to control groups(Con). From the results of hyperpolarized ^{129}Xe MRI, the parameters of gas exchange and Septal-to-alveolar volume ratio (V_s/V_a) of ONO were significantly higher than that of Con ($p>0.05$). In lung function test, lung compliance (c chord) of ONO were significantly decreased as compared to Con. In conclusion, our results suggest that ONO has an important candidate as a promotive agent in postpneumectomy compensatory lung regeneration.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺再生 慢性閉塞性肺疾患 プロスタサイクリンアナログ HGF

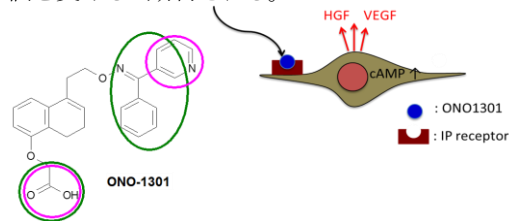
1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は非可逆性の肺破壊を特徴とする根治術のない慢性進行性の肺疾患であり、患者数は年々増加の一途を辿っている。根治術として肺移植が施行されているものの、日本のみならず世界的にもドナーの絶対数が不足しており、新規治療法の開発が急務である。それらの問題を解消するために最近、再生治療が注目されている。iPS細胞を代表とされる細胞治療が以前より報告されているが、プロスタノイドIP受容体アゴニストであるONO-1301は、肝細胞増殖因子(HGF)、ストローマ細胞由来因子(SDF-1)や血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などの内因性修復因子の発現亢進作用をもち、肺再生に有望な作用を有する可能性がある(図①)。今回、我々はこのONO1301の長時間作動効果をもつ徐放性製剤を用いて難治性肺疾患に対する肺再生効果検討するために本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、これらの課題を満たす候補として一つの化合物ONO1301に着目し肺再生治療への可能性を探求するとともに、臨床応用への道筋をつけることを目的とした。ONO1301はオキシム誘導体で選択的IP受容体作動性にトロンボキサンA2(TXA2)合成酵素阻害作用を合わせ持つ非プロスタグランジン骨格のプロスタサイクリンアゴニストである。その生理活性作用には内因性修復因子産生をはじめとする多彩な作用をもっている。具体的にはHGF、ストローマ細胞由来因子(SDF-1)や血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などの産生促進が含まれており、マウス肺線維症モデル、喘息モデル、心筋梗塞モデルなどで有効な作用効果が報告されている。肺再生治療を目指した研究は少ないことから、COPDを始めとする難治性肺疾患に対して新たな治療法となる可能性がある。COPDは、肺胞の不可逆的破壊を病態の首座としており、その成因に関する研究は数多く為されているものの、COPDの再生治療を目指した研究は少ない。また、感染、喫煙、誤嚥など様々な刺激により肺細胞は傷害を受け、それら傷害を受けた細胞および肺組織が新しい細胞によって常に修復されており、この修復機転の破綻は、COPD、肺線維症、肺癌など多くの難治性肺疾患の病態に関与していると考えられる。ONO1301の徐放化剤を用い、簡便な方法で、HGFを始めとする肺胞再生誘発因子を障害肺に作用させるCOPDの治療法の確立は、肺胞再生にチャレンジすることに他ならない。さらに局所療法の提案は肺容量減少手術後の残存肺の再生・機能改善並びに肺胞破壊予防を促す新規のアプローチといえる。またONO1301はSDF-1も促進することで、骨髄由来細胞を障害肺に誘導し肺胞再生を促す可能性も秘めており、骨髄由来細胞の肺再生における役割についても、同時に検証できると期待できる。以上のようにONO1301は、COPDを複数の修復作用、修復細胞動員をはかり難治疾患に取り

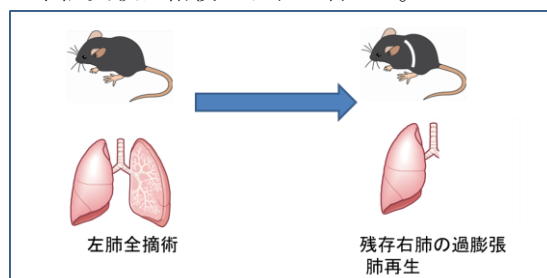
組み克服できる大きな一歩につながると思われる。特に、一つの化合物にてHGF,VEGF,SDF1と複数の成長因子を産生させ、相乗的に再生促進させようとする試みが独創的であり、現在、世界的にもこのような発想による呼吸不全の外科治療の概念はなく、極めて先進的である。本治療法が確立されれば、多数のCOPD患者の治療に大いに貢献するばかりでなく、本邦からの独創的な治療法の確立として国際的に高い評価を受けると期待される。



図①

3. 研究の方法

①肺再生モデルマウスにてONO1301投与による残存肺の再生効果の検討。
まず肺再生を検討するためにマウスの片肺全摘術による残存肺再生モデルを使用した。全身麻酔下、気管内挿管を行い、小動物用人工呼吸管理下に左開胸を行った。左肺門を一括に結紮し(2-0または3-0プロリン)左肺全摘術を施行。閉胸後、皮下にONO1301投与群と非投与群で下記実験群を解析した(図②)。また下記実験は術後4日目に行った。



図②

①-I 形態学的検討

小動物用CTを用いて、残存肺の容量を全身麻酔下に自発呼吸を保持したまま撮像し、体積の測定を行った。

①-II 残存肺の病理組織学的解析

術後4日目に全身麻酔下に自発呼吸を残したまま小動物用CTを撮像し、残存肺の大きさを比較した。また術後4日目に犠牲死させ、残存右肺を摘出し、10%ホルマリンを気道内に注入(加圧は一定)、固定した。その後パラフィン包埋し薄切後にHE染色並びに細胞増殖/細胞分裂を見るためにKi-67で免疫染色し、両群で比較した。また肺再生モデルでは、一旦肺胞隔壁が破壊され、その後数日で隔壁の再生、修復が起こるとされるため、各両群で修復過程を比較検討した。

②肺再生モデル肺におけるONO1301の呼吸機能改善効果の検証；施術後4日目で、自発呼吸を残した状態で全身麻酔をかけ下記解析を行った。

②-I 呼吸機能の測定

呼吸機能の解析には、小動物呼吸機能測定器（プレチスモグラフ）を用いた。主にコントロール群と ONO1301 投与群に対して、肺コンプライアンス (c-chord)、肺活量 (VC) を測定し、比較検討した。

②-II 超偏極 129Xe (HP129Xe) MRI 診断法による動的イメージング法による肺胞組織/空洞体積比 (Vs/Va)、および 1 回呼吸当たりの換気割合 ra を測定し、各群で比較した。

③ 分子生物学的解析

ONO1301 の作用機序を調べるために、細胞レベルで分子生物学的解析を行った。

肺を構成している細胞群に対する ONO1301 の効果を検討した。肺再生に関与する遺伝子発現の変化を mRNA の RT-PCR 法にて解析した。II 型肺胞上皮細胞として A549 細胞を用いて、ONO1301 を投与して CXCL12, HGF, VEGF の mRNA を解析した。

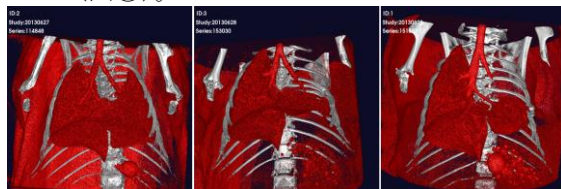
④ ONO1301 の局所治療の開発

全身投与より副作用が少ないとされる局所治療法開発を行った。ONO1301 を塗布したアテロコラーゲンシートを肺表面に貼付した。シート貼付後 2 週間目に貼付側の肺 (ONO1301 側) と非貼付側の肺 (コントロール側) を摘出、mRNA を抽出し、肺再生に関与する遺伝子発現を RT-PCR 法にて測定した (N=3 で検討)。

4. 研究成果

①-I 形態学的検討結果

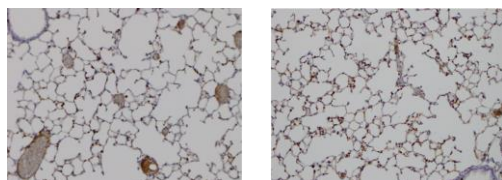
胸部 CT による形態的变化を比較した結果、ONO1301 投与群で残存肺が大きい傾向を認められたものの、全身麻酔下に自発呼吸を保持したままの CT 撮像が難しく、体積の有意差を得られるだけの検定数が得られなかった (図③)。



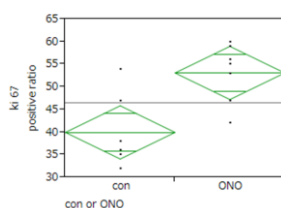
図③無処置群 全摘のみ 全摘 ONO1301 投与

①-II 病理組織学的検討結果

一方、病理学的検討では、Ki67index を比較したところ、有意に ONO1301 投与群で高値であった (図④、⑤)。



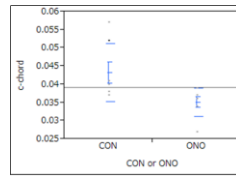
図④ コントロール群 ONO1301 群



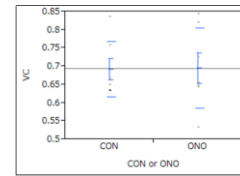
図⑤
両群 7 例
P<0.05

②-I の結果

肺気腫の指標である肺コンプライアンスは ONO1301 投与群で有意に低値であり (図⑥ P=0.03)、肺再生の効果を示すものであったが、肺活量 VC については有意差を認めなかった (図⑦ P=0.8)。



図⑥ 肺コンプライアンス

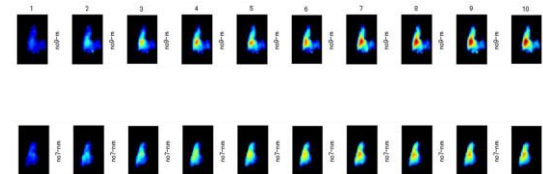


図⑦肺活量 VC

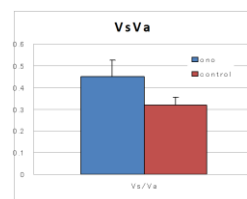
②-II の結果

下記図は 10 回の自発呼吸毎の励起させた信号強度の回復を示した代表的な図である (上段 ONO1301 投与群 下段コントロール)。

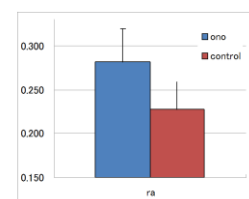
上段 ONO1301 群では下段コントロール群に比べ回復 (赤い色調) が早いことが確認できる。



図⑧ 上段 ONO1301 投与群 下段コントロール それを基に解析した結果 ONO1301 投与群は、および 1 回呼吸当たりの換気割合 ra (図⑩) において有意に高率な回復を認めた (P=0.027)。



図⑨ Vs/Va

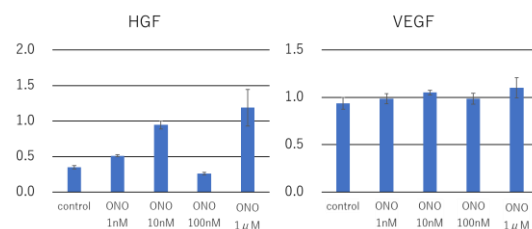


図⑩ ra

一方、肺胞組織/空洞体積比 (Vs/Va) を測定した結果 図のように ONO1301 群で有意に肺胞組織の回復 (再生) を認めた (図⑨ P=0.028)。

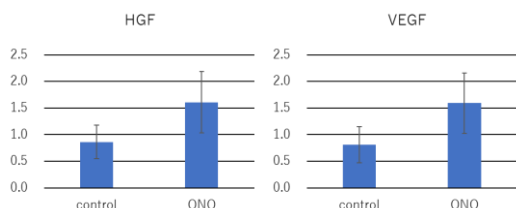
③ 分子生物学的解析

A549 を ONO1301 投与し、細胞を回収、mRNA を抽出し RT-PCR 法にて解析した結果、HGF は概ね ONO1301 投与量に比例して発現増加するものの、VEGF では、濃度依存性の発現増加は認めなかった (図⑪)。



図⑪ RT-PCR

④ 局所治療法開発を目指した研究
HGF, VEGF とも ONO1301 貼付肺の方が非貼付肺に比し有意に高発現を示していた ($p < 0.05$, 図⑫)。



図⑫RT-PCR

①～④まとめ

マウス肺再生モデルにて ONO1301 の肺再生効果が示唆された。これはプロスタサイクリンアゴニストが II 型肺胞上皮に作用し HGF 発現上昇によることが示唆された。またシートに塗布し、対象臓器へ貼付する局所治療の可能性も明らかになった。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Funaki S, Shintani Y, Kawamura T, Inoue M, Minami M, Kimura A, Sakai Y, Miyagawa S, Sawa Y, Okumura M. Sustained-release delivery of prostacyclin analogue enhances lung regeneration after pneumonectomy in mice. GTS conference. 2015. kyoto
- ② 舟木壮一郎、川村知裕、別所俊哉、新谷康、井上匡美、南 正人、酒井芳紀、宮川 繁、澤 芳樹、奥村明之進
プロスタサイクリンアゴニスト ONO-1301 による肺再生治療の可能性、第 14 回日本再生医療学会総会 2015、横浜
- ③ 舟木壮一郎、新谷 康、川村知裕、南 正人、酒井芳紀、宮川 繁、澤 芳樹、奥村明之進、難治性肺疾患に対する肺再生治療、第 57 回日本呼吸器学会学術講演会、2017、東京
- ④ 福井絵里子、新谷 康、桃實 徹、神崎 隆、川村知裕、舟木壮一郎、南 正人、奥村明之進、肺気腫モデルマウスに対する脂肪組織由来幹細胞による細胞治療、第 17 回日本再生医療学会総会、2018、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 正人 (Masato Minami)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10240847

(2) 研究分担者

奥村 明之進 (Meinoshin Okumura)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：40252647

井上 匡美 (Masayoshi Inoue)
研究者番号：10379232
京都府立医科大学・医学研究科・教授

新谷 康 (Yasushi Shintani)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：90572983

舟木 壮一郎 (Soichiro Funaki)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：50464251

川村 知裕 (Tomohiro Kawamura)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：30528675