

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：22701
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2017
課題番号：15K14944
研究課題名(和文)凍結乾燥法を基盤とした幹細胞製剤化技術の構築

研究課題名(英文)New stem cell therapy base on freeze drying

研究代表者

堀口 道子(HORIGUCHI, Michiko)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：70632470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非侵襲的な肺胞幹細胞移植の実現を目指して、幹細胞の吸入製剤化技術の構築を行い、製剤の有効性および安全性を明らかにすることを目的として研究を行った。肺胞再生治療法が確立できれば、治療法のないCOPDや難治性の肺線維症の根治、手術後の肺再建が可能となり多くの患者の命を救う革新的な再生治療技術となる。申請者は、世界に先駆け、PI3K阻害剤などがヒト肺胞上皮幹細胞を効率的に分化誘導し肺胞再生効果を有するという新規の知見を発見した。本研究では、重篤な肺胞破壊病変の再生を可能とする非侵襲的な肺胞幹細胞移植の実現を目指して、凍結乾燥法を基盤としたヒト肺胞幹細胞の凍結乾燥吸入製剤を開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is an intractable pulmonary disease, leading to a widespread and irreversible alveolar collapse. The COPD becomes the third position of the world cause of death. The aim of this study was to identify a treatment target molecule able to regenerate collapsed alveoli. This study is the first one to identify lung stem cells and ECM factor that induce lung repair. The stability of nanoparticles of stem cells and ECM factor significantly increased in comparison with the controls, and pulmonary administration of the nanoparticles regenerated collapsed alveoli. These results suggest that lung stem cells and ECM nanoparticles are effective as novel COPD treatment target compounds.

研究分野：再生治療

キーワード：DDS 吸入剤 移植 再生治療 COPD 難治性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

肺胞再生治療法が確立できれば、治療法のない慢性閉塞性肺疾患 (COPD) や難治性の肺線維症の根治、外科的手術後の肺再建が可能となり多くの患者の命を救う革新的な再生治療技術となる。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、世界に先駆け、合成レチノイド Am80 や PI3K 阻害剤などがヒト肺胞上皮幹細胞を効率的に分化誘導し肺胞再生効果を有するという新規の知見を発見した。軽度の肺胞破壊モデルでは発見した分化誘導剤が肺胞の再生を誘導する優れた効果を示したが、完全に肺胞構造が破壊された重症例では分化誘導剤の投与のみでは肺胞再生効果が不十分であり治癒には至らなかった。一方で、幹細胞を肺に直接移植すると顕著な肺胞の修復が確認されているが、非侵襲的に肺胞幹細胞を移植する製剤は存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、非侵襲的な肺胞幹細胞移植の実現を目指して、肺胞幹細胞の凍結乾燥技術および幹細胞の吸入製剤化技術の構築を行い、製剤の有効性および安全性を明らかにすることを目的として研究を行った。

本研究では、重篤な肺胞破壊病変の再生を可能とする非侵襲的な肺胞幹細胞移植の実現を目指して、凍結乾燥法を基盤とした粉末吸入システムを用いたヒト肺胞幹細胞の凍結乾燥吸入製剤の開発を行った。

3. 研究の方法

ガラス化、医療用 CAS および段階的乾燥法を利用した肺胞幹細胞の凍結乾燥技術を確立した。既に樹立済みのヒト肺胞上皮幹細胞をガラス化溶液 (0.5M トレハロース、45%エチレングリコールを含む) で培養し、緩慢もしくは急速凍結を行った。凍結 1 週間後に恒温槽にて融解し、幹細胞培養液にて培養開始後からの継時的な細胞生存率を MTT アッセイにより評価した。さらに特殊な CAS 発生装置を使って細胞の中にある水分子を振動させ細胞壁や細胞膜を安定に凍結することが可能な医療用 CAS : Cell Alive System (現有機器) を用いて肺胞幹細胞に最適な凍結速度と振動を検討し幹細胞の凍結技術を検討した。

当研究室の特許技術を基盤とした肺胞幹細胞の粉末吸入製剤を構築した。疎水性アミノ酸であるフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリンを各バイアルに 0.1 ~ 1mg 添加し医療用 CAS と棚方凍結乾燥機 (現有機器) にて凍結乾燥にて行った。吸入剤の性能は米国薬局方に準じた試験装置 MSLI (現有機器) で肺分布を示す 5 μ m 以下の微粒子割合により判定した。

幹細胞の生着率の評価には、生体顕微鏡を用いて生きたマウスにおいて、蛍光標識した幹細胞を可視化した。さらに、幹細胞の周辺環境や幹細胞の受容体の解析を行った。

4. 研究成果

予定していたすべての項目において順調に研究が進んだ。一部の添加剤の検討は予定以上に多くの物質を評価することが出来

た。新規の凍結装置を用いた検討においては、機器の導入時期が予定より1、2カ月遅れたため予定より遅れて検討を始めたが、概ね予定通りの研究が進展している。

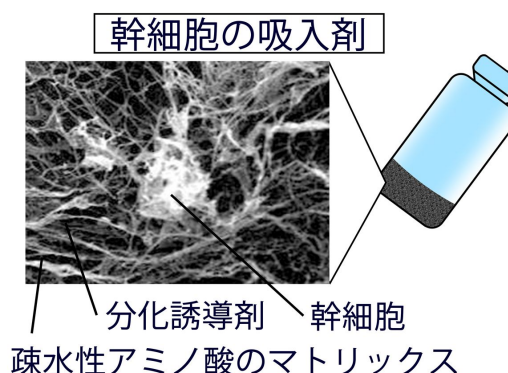


図1．幹細胞の凍結乾燥製剤

肺への幹細胞の投与にあたり、強制的に圧力をかけて肺に投与する従来の方法ではなく、自発的な吸入に近い投与方法が望ましいが、マウスにおいて、このような自発的な吸入方法はいまだ確立されていない。そこで本研究では、蛍光色素を用いて、肺へ自発的に投与する方法を確立して、幹細胞の生着率の評価に用いた（下図）。

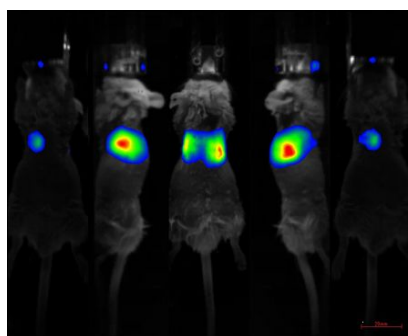


図1．自発的経肺投与方法によるマウス肺内分布の評価

幹細胞の生着率の評価では、幹細胞を GFP 標識し、生体顕微鏡で生きたマウスに

おける幹細胞の生存率を評価する方法を確立した。幹細胞は生体内で存在したものの、凍結乾燥後の増殖率は著しく減少した。そのため、今後は増殖率を保持したまま幹細胞を生体内で保持できる添加剤等の開発が必要である。

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 11 件)

1. Horiguchi M, Hirokawa M, Abe K, Kumagai H, Yamashita C. Pulmonary administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to the lungs induces alveolar regeneration in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *J Control Release*. 2016 Jul 10;233:191-7. (5-Year Impact Factor: 8.450) 査読有
2. 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. *J Control Release*. 2015 Sep 10;213:112-119. (5-Year Impact Factor: 8.450) 査読有

3. Sakai H*, **Horiguchi M***, Akita T*, Ozawa C, Hirokawa M, Oiso Y, Kumagai H, Takeda Y, Tachibana I, Maeda N, Yamashita C.
Effect of 4-[(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-Tetramethyl-2-Naphthalenyl)Carbamoyl]Benzoic Acid (Am80) on Alveolar Regeneration in Adiponectin Deficient-Mice Showing a Chronic Obstructive Pulmonary Disease-Like Pathophysiology.
J Pharmacol Exp Ther. 2017 Jun;361(3):501-505.
***Those author contributed equally to this work. 査読有**
4. Fujiwara Y, Ando H, Ushijima K, **Horiguchi M.** Yamashita C, Fujimura A.
Dosing-time-dependent effect of rivaroxaban on coagulation activity in rats.
Journal of Pharmacological Sciences. 2017; vol 134 No.4.
査読有
5. Sasaki-Hamada S, Nakamura R, Nakao Y, Akimoto T, Sanai E, Nagai M, **Horiguchi M.** Yamashita C, Oka JI.
Antidepressant-like effects exerted by the intranasal administration of a glucagon-like peptide-2 derivative containing cell-penetrating peptides and a penetration-accelerating sequence in mice.
Peptides. 2017 Jan;87:64-70.
査読有
6. Nakao Y, **Horiguchi M.** Nakamura R, Sasaki-Hamada S, Ozawa C, Funane T, Ozawa R, Oka JI, Yamashita C.
LARETH-25 and β -CD improve central transitivity and central pharmacological effect of the GLP-2 peptide.
Int J Pharm. 2016 Dec 30;515(1-2):37-45. **査読有**
7. Goto A, Akita T, Nogami S, **Horiguchi M.** Abe R, Yamashita C.
CD90-Target Liposomes Increase the Therapeutic Efficacy of a Retinoic Acid Derivative in Pulmonary Carcinoma. ***Nano Research & Applications.*** 2016 December; Vol. 2 No. 2:17 **査読有**
8. Akita T, Goto A, Kameyama A, **Horiguchi M.** Ozawa C, Akaguma S, Yamashita C.

The Differentiation-Inducing Effect of a Retinoic Acid Derivative on a Pulmonary Carcinoma Cell Line.

Journal of Cancer Biology and Therapeutics. 2016 December; Vol.2 **査読有**

9. 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. 2016; Vol. 1 No. 2:11 **査読有**
10. 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. **査読有**
11. 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. **査読有**

[学会発表](計 4 件)

1. **堀口道子**, 『幹細胞分化制御を標的とした個別化医療への応用』、第23回国際個別化医療学会学術集会、2017年10月28日
2. Billing D, Wu-Baer F, **Horiguchi M**, Taglialatela A, Alvarez S, Szabolcs M, Sheng Lin C, Ciccio A, Baer R 『The phospho-recognition activities of the BRCT domains of BRCA1 and BARD1 are required for protection of stalled replication forks by the BRCA1/BARD1 heterodimer』
Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance, September 5-9, 2017
3. **堀口道子**, 『幹細胞分化を標的とした難治性疾患の新治療戦略』、JMSA New York Forum 2017 in New York University, 2017年4月8日
4. **堀口道子**, 『New treatment strategy of the decreased respiratory function』、The Japan-US Science Forum in Boston 2016年11月12日

〔図書〕(計 1 件)

堀口道子、山下親正、『吸入薬剤による気腫
肺再生の試み』、分冊呼吸器病 vol.21 no.1
(2017)

〔産業財産権〕

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

堀口 道子 (HORIGUCHI, Michiko)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号 : 70632470