

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790917

研究課題名（和文）微生物由来 DNA を利用した吸入型炎症性肺疾患治療薬の開発

研究課題名（英文）Study of inhaled nanoparticles incorporating synthetic oligodeoxynucleotides to treat lung diseases

研究代表者

佐藤 隆 (SATO TAKASHI)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：70510436

研究成果の概要（和文）：

免疫調節性オリゴ核酸を封入した生分解性ポリケタルナノ粒子の肺内投与の効果を検証した。マウス急性・慢性肺炎モデルは、珪酸粒子を投与した肺線維化モデルとエラストーゼ誘導肺気腫モデルを使用した。肺線維化モデルに対する気道内投与は呼吸機能を指標とする治療効果が見られなかったが、肺気腫モデルに対する免疫刺激性 ODN (CpG ODN) 気道内投与は 3 週後の呼吸機能 (Resistance, Elastance, Compliance その他) の有意な改善が認められ、気腫化進展を抑制しうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have developed biodegradable polyketal nano-particles containing immune-modulatory oligodeoxynucleotides (PKN-ODN), that degraded as predicted under physiologic conditions. To evaluate the ability of PKN-ODN to reduce pulmonary inflammation, well established silicosis and elastase-induced emphysema mouse models were used to develop the technology for the endotracheal delivery of PKN-ODN designed for the treatment pulmonary inflammation and the subsequent monitoring of the outcome of such intervention by Flexivent pulmonary function measuring system. In murine emphysema model, single intratracheal instillation of immune-stimulatory ODN could improve the changes in lung function parameters (Resistance, Elastance, Compliance), implying a potential treatment option.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：免疫調節性 DNA、ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

本邦のみならず、呼吸器疾患患者の増加は顕著で、WHO は今後 10 年で世界的に呼吸器領域疾患の死亡者数の急増を予測している。こうした呼吸器疾患の社会的重要性を背景に、急性・慢性炎症性呼吸器疾患に対する、より簡便で忍容性の高い、かつ効果的な局所療法の開発が急務である。本研究は、これまでに

研究代表者らが行った微生物由来 DNA に基づく免疫刺激性オリゴヌクレオチド (ODN) による気道上皮創傷治癒促進作用や免疫抑制性 ODN による過剰炎症応答抑制による肺損傷抑制作用の結果をもとに、合成 ODN を吸入素材として開発することに着手した。この吸入素材の運搬体として、生分解性であること。また炎症部位指向性の分解特性を念頭に

おき、酸性条件下において分解特性の高いポリケタルナノ (PKN) 粒子 (粒子径: 200~600 nm) を選択し、PKN と ODN の封入体を作成した (研究課題: 21790778、研究代表者: 佐藤隆)。今回、各種マウス疾患モデルを用いて、病態進行に関する作用を検討する。

2. 研究の目的

免疫調節性合成 ODN 包埋 PKN 粒子の肺内投与の効果、確立された急性・慢性肺炎モデルに気道投与 (気管内投与) を行い検証する。確立された肺炎モデルとして、珪酸粒子を投与したマウス肺線維化モデル、またエラストラーゼ誘導マウス肺気腫モデルを使用する。慢性呼吸器疾患の病勢進行は、ヒト臨床においては経時的な呼吸機能変化によって客観的に判定しうることに則り、本研究における効果判定はマウス呼吸機能システム (Scireq Flexivent System) による経時的な各種呼吸機能パラメータ測定結果を第一義に考慮する。効果を認めた場合はその機序を解析し考察を行う。

3. 研究の方法

(1) ナノ粒子の作用特性

①細胞培養系における免疫機能性の確認: マウス脾臓細胞を用いて、免疫調節性 ODN 包埋 PKN 粒子のサイトカイン産生・細胞増殖活性をフリーの ODN と比較する。

②in vivo トライアルによる免疫機能性の確認: マウス気道内に免疫調節性 ODN 包埋 PKN 粒子あるいはフリーの ODN を投与後、気管支肺胞洗浄液を回収し液性成分や細胞性成分を比較検討する。

(2) モデルマウス作成ならびにナノ粒子 ODN 投与プロトコール

①珪肺モデル: 8 から 10 週齢の Balb/c マウスに麻酔下で珪酸粒子 (MIN-U-SIL 5) 1.0 から 2.5 mg を経気管的に投与 (Day 0) して作成した。

②肺気腫モデル: 8 から 10 週齢の Balb/c マウスに麻酔下で豚膵エラストラーゼ (Elastin Products Company; LE425、エンドトキシンフリー) 0.3 から 3.0 単位を経気管的に投与 (Day 0) して作成した。ODN の投与は Day -2 かつまたは Day 7 から 28 の間に行い局所投与群に対しては気道内に 1 回あたり 10 から 50 マイクログラムを投与した。また、全身投与群に対しては腹腔内に 50 から 300 マイクログラムを投与した。

(3) 呼吸機能評価

モデルマウスの呼吸機能評価は、Scireq 社の小動物用高精度呼吸機能解析システム・Flexivent を使用した。測定は、麻酔下に 20 ゲージのカテーテルを経口気管挿入し、

Flexivent に接続してエアリークなく換気が行えることを確認したのちに、筋弛緩薬バンクロニウムを尾静脈より投与し、自発呼吸が完全に消失したのちに施行した。呼吸管理は呼吸終末陽圧 3 cmH₂O、呼吸数 150 回/分とし、すべてのパラメータは本体付属の解析アルゴリズムソフトウェアが許容した 3 回以上の測定値の平均値を使用した。

4. 研究成果

(1) 免疫調節性合成 ODN 包埋 PKN 粒子の免疫細胞刺激活性の評価

マウス脾臓細胞を用いて 72 時間刺激後の細胞数を Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて評価した。CpG ODN を使用した免疫刺激性 ODN 包埋 PKN 粒子の細胞増殖活性はフリー ODN と同等の活性が保持されており、CpG ODN に依存した TLR-9 経路依存性の増殖活性を示した (図 1)。ODN 包埋 PKN の細胞毒性は、ODN 濃度 < 3 μM では認められなかった。

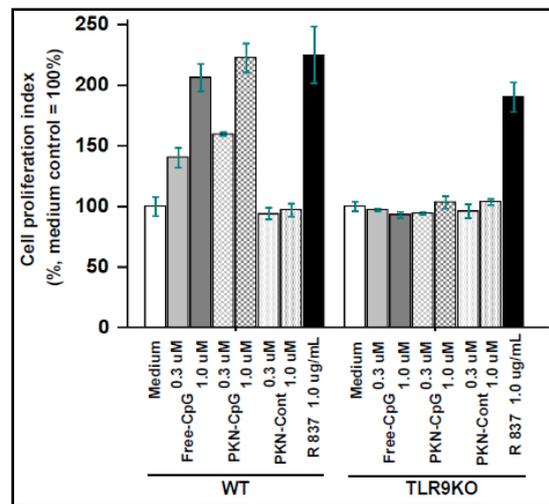


図 1. マウス脾臓細胞の細胞増殖活性
CpG ODN: GCTAGACGTTAGCGT
Cont ODN: GCTAGAGCTTAGGCT
R837: Imiquimod

同様に、マウス脾臓細胞を用いて 24 時間刺激後の培養上清中の各種サイトカイン産生を ELISA 法にて評価した。CpG ODN を使用した免疫刺激性 ODN 包埋 PKN 粒子の刺激による脾臓細胞からのサイトカイン産生はフリー ODN と同等で、CpG ODN に依存した TLR9 経路依存性を示した。代表的な結果として、図 2 に IL-12 の産生を示す。以上の in vitro の解析結果から、PKN に包埋した ODN は通常の実験で使用される濃度域では細胞毒性はなく、フリーの ODN と同等の免疫機能性が維持されていることを確認し、引き続き in vivo での実験に供した。

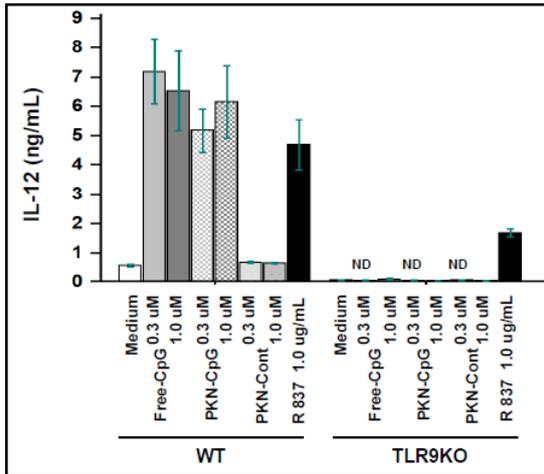


図2. マウス脾臓細胞におけるサイトカイン産生 (IL-12)

(2) 免疫調節性合成 ODN 包埋 PKN 粒子の経気道投与後の肺内炎症細胞集積の評価
8 から 10 週齢の Balb/c マウスに、麻酔下で ODN 包埋 PKN 粒子を投与し、2 日後に気管支肺胞洗浄を行い回収液中の細胞数ならびに細胞分画を評価した。CpG ODN を使用した免疫刺激性 ODN 包埋 PKN 粒子を投与した群では、フリーの CpG ODN を投与した群と比較して、低用量の ODN から気管支肺胞洗浄液中のマクロファージとリンパ球の集積が高く、用量依存性に増加がみられた (図 3)。

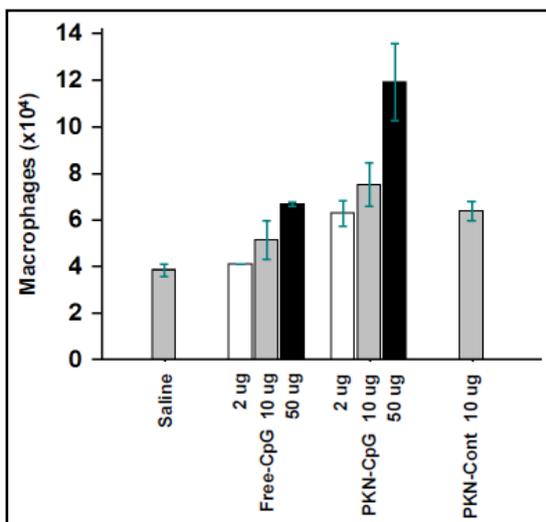


図3. マウス気管支肺胞洗浄液中マクロファージ数

CpG ODN : GCTAGACGTTAGCGT
Cont ODN : GCTAGAGCTTAGGCT

(3) 疾患モデルマウスにおける免疫調節性合成 ODN 包埋 PKN 粒子の治療効果。
肺線維化モデルとして、珪肺モデルを使用した群では、予備実験で肺機能の低下が認められた珪酸投与後 6 週を効果判定の期日とした。免疫調節性合成 ODN 包埋 PKN 粒子の経気道投与は予防的投与 (珪酸粒子投与 2 日前) かつまたは治癒投与 (珪酸粒子投与 1 週間後より毎週投与。4 週まで) による効果は認められなかった。

肺気腫モデルとして、豚膵エラスターゼを使用した群では、予備実験で投与後 3 週から顕著な呼吸機能低下を認め、その後も進行がみられたことから、エラスターゼ投与後 3 週ならびに 6 週を効果判定の期日とした。ODN の経気道投与の効果は、CpG ODN を単回予防的投与した群において、その後の高用量エラスターゼ (3 単位) 投与に伴う重度の呼吸機能低下の進行を有意に抑制することが示された。具体的なパラメータとして、肺エラスターゼやコンプライアンスの悪化が有意に抑制されていた。また、高精度の Forced Oscillation Technique を用いた中枢・末梢気道の評価から、Tissue elasticity に代表される肺末梢機能が温存されていること (図 4)。さらには、静肺コンプライアンスの測定から得られた Total lung capacity の測定値からも気腫化の進行を抑制していると考えられた (図 5)。

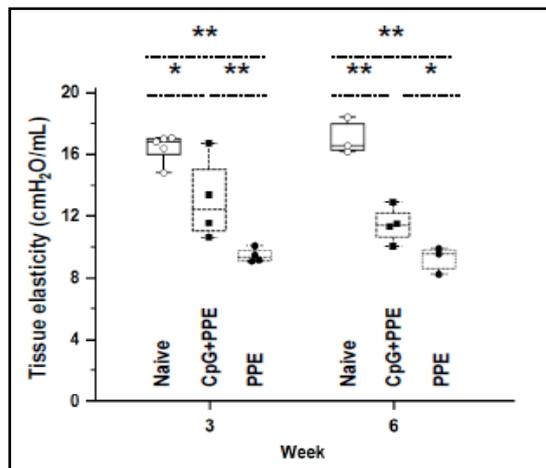


図4. マウス呼吸機能における肺組織弾性の評価

CpG ODN : GCTAGACGTTAGCGT

PPE : Porcine pancreatic elastase

これまで、自然免疫応答に関わる TLR4 受容体やアダプター分子である MyD88 が肺気腫の形成に関与するとの報告がなされているが、TLR9 受容体が肺気腫の形成や進行に関与す

るとの報告は検索しうる限りでは見出せなかった。今回の結果を受け、TLR9 受容体欠損マウスを用い、エラスターゼ投与に伴う気腫化の進行を野生型と比較すると有意に進行が速いことも分かり興味深い。本研究から、慢性炎症性肺疾患に対する吸入治療として、新たな吸入素材とデリバリーシステムの可能性が示された。

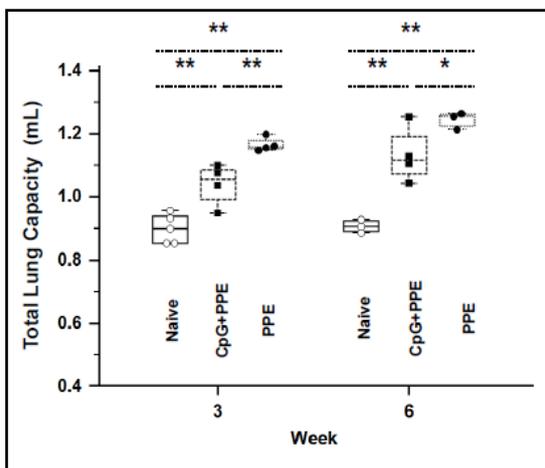


図5. マウス呼吸機能における全肺気量の評価

CpG ODN : GCTAGACGTTAGCGT
PPE : Porcine pancreatic elastase

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5件)

- (1) Ito Y, Shigemori S, Sato T, Shimazu T, et al.
Class I/II hybrid inhibitory oligodeoxynucleotides exerts Th1 and Th2 double immunosuppression.
FEBS Open Bio. 査読有 2012 in press.
DOI:10.1016/j.fob.2012.11.002
- (2) Shigemori S, Yonekura S, Sato T, Otani H, Shimosato T.
Expression of the immunoreactive buckwheat major allergenic storage protein in Lactococcus lactis.
Appl Microbiol Biotechnol. 査読有 2012 in press.
DOI:10.1007/s00253-012-4608-9
- (3) Takahashi R, Sato T, Klinman DM, Shimosato T, et al.
Suppressive oligodeoxynucleotides synergistically enhance

antiproliferative effects of anticancer drugs in A549 human lung cancer cells.

Int J Oncol 査読有 2012 in press.

DOI:10.3892/ijo.2012.1755

- (4) Sato T, Saito Y, Inoue S, Shimosato T, Takage S, et al.
Serum heme oxygenase-1 as a marker of lung function decline in patients with chronic silicosis.
J Occup Environ Med. 査読有 2012;54:1461-1466
DOI:10.1097/JOM.0b013e3182636e93
- (5) Shigemori S, Yonekura S, Sato T, Nakanishi M, et al.
Expression of a biologically active GFP-alpha (S1)-casein fusion protein in Lactococcus lactis.
Curr Microbiol 査読有 2012;64:569-575
DOI:10.1007/s00284-012-0111-x

[学会発表] (計3件)

- (1) Sato T, Miyazawa N, Klinman DM, Shimosato T, et al.
CPG Oligodeoxynucleotides Promote Wound Healing In Airway Epithelial Cells.
American Thoracic Society International Conference, 2011.5.15, Denver, CO, USA
- (2) Sato T, Miyazawa N, Saito Y, Takahashi R, et al.
Serum Heme Oxygenase-1 As Marker Of Lung Function Decline In Patients With Chronic Silicosis.
American Thoracic Society International Conference, 2011.5.17, Denver, CO, USA
- (3) Takahashi R, Sato T, Miyazawa N, Klinman DM, et al.
Suppressive Oligodeoxynucleotide Synergistically Enhances The Antiproliferative Effect Of Anti-Cancer Drug In Human Lung Cancer Cells.
American Thoracic Society International Conference, 2011.5.15, Denver, CO, USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.yokohama-cu.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 隆 (SATO TAKASHI)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：70510436