

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861528

研究課題名(和文)急性肺傷害に対するレゾルビン内包化陰性電荷リポソーム吸入療法の開発

研究課題名(英文)The development of resolvin-encapsulated negatively-charged liposome for the therapy of acute lung injury

研究代表者

田畑 雄一 (Tabata, Yuichi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70515238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：急性肺傷害は、時に炎症反応が慢性化して、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)に代表される極めて予後不良な致死性病態に至る。そのメカニズムには何らかの原因で急性炎症反応の消退が失敗して慢性化してしまうことが関わっている。近年、アラキドン酸やドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸(EPA)などの多価不飽和脂肪酸から産生されるリポキシン、レゾルビンなどの脂質活性分子が炎症の消退に大きな役割を持つことが発見された。今回、レゾルビンを肺胞する陰性電荷リポソームを作成し、動物肺炎モデルにて肺への投与を行うことで、これらの脂質分子が急性肺傷害の病態形成にどのように関わり、治療に応用可能となるかどうか探索した。

研究成果の概要(英文)：Recent findings indicate that the resolution of inflammation tends toward being an active process that enables inflamed tissues to return to a state of homeostasis. This process is facilitated by pro-resolving lipid mediators, which are mainly derived from 6-polyunsaturated fatty acids (PUFA). The bioactive pro-resolving lipid molecules are lipotoxins, resolvins, and protectins. The resolution of inflammation requires pro-resolving mediator-activated programs that stop neutrophil infiltration to inflamed tissues, promote the uptake and clearance of apoptotic inflammatory cells, and stimulate the antimicrobial activities of mucosal epithelial cells. In this study, we developed resolvin-encapsulated negatively-charged liposomes and evaluated the anti-inflammatory effects in in-vitro and in-vivo models. The preliminary findings suggest new possibilities in the development of novel approaches and pharmaceutical therapeutics for the treatment of inflammatory diseases in critical care.

研究分野：集中治療医学

キーワード：炎症消退脂質 レゾルビン リポソーム 炎症 肺炎 急性呼吸窮迫症候群

1. 研究開始当初の背景

急性肺傷害のなかでも、急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) は炎症が全臓器性そして全身性に広く波及して、その制御が破綻した病態である。このような病態に対して、炎症の惹起・誘導に関わる分子の発現・効果を抑制・中和することで治療成績の改善を期待する多くの試みが行われてきた。しかしながら、これらの多くの分子標的療法は明確な治療成績の改善を示すに至らず、期待された結果を残せなかった。現在では、機械的人工呼吸法、人工肺補助や血液浄化法などにより一時的に低下した臓器機能を人工的に補助し、その間に循環動態の維持や体液管理、感染制御などをより積極的に行う、いわゆる「総合戦略」で立て直しが図られている。しかし、臓器機能が改善せず、炎症の慢性化や致命的な線維化が発生した場合、集中治療での救命努力は力尽きる。この予後には不可逆的な臓器損傷に至らずに炎症が無事に消退するのかがどうかに関わっていると考えられるが、近年、炎症の誘導反応 (Pro-inflammatory response) と同様に生理的な炎症消退反応 (Pro-resolving response) の誘導は、炎症の時間経過において能動的にプログラムされており、いくつかの新しく発見された生理活性脂質分子が重要な役割を果たしていることが解明されてきた (図1)。特に fish oil に含まれるオメガ(ω)³ 多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA) であるドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid, DHA) やエイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) などから、レゾルビンと呼ばれる炎症の消退に関わる強い生理活性をもつ脂質分子が産生されることが報告された (図2)。炎症部位の血管内皮等では、炎症の消退とともに DHA や EPA が好中球や血小板の cyclooxygenase や lipooxygenase の作用により、15R-hydroxyeicosapentaenoic acid (HEPE) や 18R-HEPE を経てレゾルビンへ変換される。レゾルビンは、G タンパク競合受容体である抗原提示細胞や単球細胞膜上の ChemR23 や LT B4 受容体を介して抗炎症性に作用すると考えられている。レゾルビンに代表される生理活性炎症消退脂質分子は、難治性の炎症性疾患の新しい治療薬として注目されている。

2. 研究の目的

急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) に代表される急性肺傷害は極めて予後不良な致死性病態である。その病態形成には肺胞マクロファージの活性化と続発する急性炎症反応の消退不全による炎症の慢性化が関わっている。近年、ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などの ω -3 多価不飽和脂肪酸から産生される脂質活性分子であるレゾルビンが炎症の消退に大きな役割を持つことが発見され、炎症性疾患に対する新しい治療薬として期待されている。今回、肺胞マクロファージを標的としたレゾルビン内包化リポソーム吸入療法が、急性肺傷害の炎症消退誘導薬となるか細胞培養および動物モデルを用いて検討する。

3. 研究の方法

レゾルビン D1 およびレゾルビン E1 を陰性電荷リポソームに内包化した製剤 (NCLER) をホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、コレステロールを脂質膜成分として、逆相蒸発法にて精製した。まず、in vitro の系として、大腸菌 LPS で活性化した培養系マクロファージの炎症反応に対する NCLER 投与の効果を実験室条件下で測定することによって調べた。次に、in vivo の系として、マウス緑膿菌性肺炎モデルを用いて、NCLER の吸入の肺傷害や感染症、炎症性反応に対する効果について調べる。NCLER 吸入療法が副作用を誘発せずに炎症の消退をもたらすことができるか評価した。

継体培養系マクロファージ様細胞である J774A.1 細胞を用いて、貪食能、サイトカイン産生能、NO 産生能に対する NCLER 投与の効果を検討する。J774A.1 細胞を RPMI1640 培養液にて継体培養し、細胞数を調整して、一定数 (1×10^6 程度) をプレートに用意する。インターフェロン γ でプライミング状態として、大腸菌 LPS で刺激を加える。NCLER リポソームを異なる濃度で培養液に加えた場合に各種マクロファージ機能がどう変化するかを定量する。

貪食能への影響 (図6): 一定時間後、蛍光標識された酵母菌 (Molecular Probe 社、

USA) を投与・飼育させ蛍光顕微鏡で定量する。

遊走活性への影響:ケモタキシスチャンパー法を用いたマクロファージの遊走活性測定を行う。

殺菌能への影響: J774A.1細胞に $2 \sim 3 \times 10^6$ CFU/mL のリステリア生菌を一定時間共培養し、上澄みを洗浄すると共にペニシリン含有培養液で細胞外細菌を除去する。マクロファージを一定時間後に剥がして破碎し、細胞内に貪食されても活性のあるリステリア数をプレートにまいてカウントする。

サイトカイン産生への影響: LPSを加える直前から、経時的に培養液を一部採取し、分泌されたサイトカインの濃度をELISA法で測定する。対象サイトカインとして、TNF α , IL-1B, IL-6, IL-10, IL-12, MCP-1, MIP-2らを選択する。

サイトカイン発現への影響: 特異的な抗サイトカイン標識抗体とフローサイトメトリーを用いて、発現量が微量であるが、特に炎症の誘導・消退に鍵となるIL-12サイトカイン・ファミリーであるIL-12, IL-23, IL-27のマクロファージでの発現について調べる。

活性酸素産生への影響: 発光試薬とSODを用いた化学発光法にて培養液中に産生された活性酸素をルミノメータで測定する。

一酸化窒素産生 (NO) への影響: LPSを加える直前から、経時的に培養液を一部採取し、分泌されたNO濃度をGriess試薬を用いた比色法にて測定する。

CD-1 マウス(雄、週齢 8-12、体重約 25g) 肺内に、セボフルランによる短時間麻酔下に、肺上皮傷害性緑膿菌株 PA103 浮遊液 (sublethal dose, 1×10^6 CFU in PBS) をインスティレーション用鈍針にて投与して肺炎を誘導し、一定時間後に NCLER リポソームを rodent 用の吸入器 (Inhalation Tower ELS0113, Buxco Research Systems, USA) にて吸入させる。24~72 時間の体温や活動性を測定し、安楽死させた後、肺の障害度を生理学的(肺内水分量)、病理学的(組織像)、生化学的(好中球エステラーゼ活性、サイトカイン濃度)、細菌学的評価(細菌数、菌血症)に評価を加える。コントロール群には、レゾルピンを含有しない empty リポソーム吸入を用いる。NCLER リポソームの

吸入が細菌感染を悪化させずに炎症消退を誘導できるかを総合的に判定する。

4. 研究成果

逆相蒸発法を用いて、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、コレステロールをモル比6:4:1 の比率にてジエチルエーテルやクロロホルムに溶解し、封入物質であるレゾルピンを含む水溶液を加えて、ロータリーエバポレータ(図4、既存装置)と超音波乳化装置、ホモジナイザーを用いて減圧下に有機溶媒を除去してエマルジョンとし、0.2ミクロンのメンブランフィルターにてNCLERリポソームを得た。当初の予定では、マウス肺炎モデルにおいて吸入にて投与する予定であったが、小動物における十分な吸入効率を確保できる吸入器が無いため、気管内に直接投与する方法に切り替えた。現在、このモデルを用いて、肺の炎症に対する抑制効果の評価を行っている。また、*in vitro*のモデルでは、リポソーム投与によるマクロファージを用いた炎症性サイトカインの分泌抑制効果の評価している。今後、有意な抑制効果が得られれば、更に疾患モデルを拡大して新しい抗炎症薬としての可能性を探りたい。

炎症誘導や消退のカスケードは複雑であるが、本研究では、まず細胞培養モデルを用いることで、単純化し、炎症消退分子レゾルピンのマクロファージに対する直接的な作用を調べた。継体培養により維持が簡単な市販のJ774A.1細胞ラインを用いて実験を確立し、のちにマウス由来の一次培養系マクロファージを用いて、より生理的な反応を効率よく解析するようにした。第二段階として*in vivo*への実験系に発展させることで、現在、臨床的な応用に近づけることを検討している。

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)

[学会発表](計2件)

1. 田畑雄一, 他. 小児心臓手術後人工呼吸中における神経麻痺エコー診断:後方視的検討. 第53回日本小児循環器学会総会学術集会. 2017年
2. 田畑雄一, 橋本悟, 山崎正記, 井上美帆. 小児心臓手術後横隔神経麻痺診断における経肝臓横隔膜超音波検査の有用性:前向き観察研究 第1報. 第45回日本集中治療医学会学術集会. 2018年

〔産業財産権〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田畑 雄一 (Yuichi Tabata)

研究者番号: 70515238

京都府立医科大学・医学研究科・助教

(2) 研究協力者

佐和 貞治 (Teiji Sawa)

研究者番号: 10206013

京都府立医科大学・医学研究科・教授