

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25年5月31日現在

機関番号:17701

研究種目:挑戦的萌芽研究

研究期間:2011 ~ 2012

課題番号:23659435

研究課題名(和文) 難治性喘息に対する新規抗体療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel antibody therapy for refractory asthma

研究代表者

井上 博雅 (INOUE HIROMASA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号:30264039

研究成果の概要(和文):重症難治性喘息や肺線維症などの難治性呼吸器疾患の治療法は確立しておらず、その病態解析から新規治療法の確立が必要である。本研究は、難治性呼吸器疾患の新たな治療標的の探索および新規抗体療法の開発を目的とした。アレルギー性喘息や肺線維症のマウスモデルを用いて、これまで呼吸器における役割が不明であった分泌性ホスホリパーゼA2やアンジオポエチン様蛋白、さらに血管内皮細胞増殖因子が、喘息や肺線維症の病態形成において重要な役割を担っていることを確認した。これらのメディエーターの作用を制御する抗体の開発は、難治性呼吸器疾患に対する画期的な治療法として期待できる。特に、抗血管内皮細胞増殖因子抗体を肺局所で長期間産生するベクターは、肺線維症に対する新しい治療法として有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文): Severe asthma and idiopathic pulmonary fibrosis are chronic lung diseases of notable unmet medical need. Focusing on secretory phospholipase A2 and angiopoietin-like proteins, we studied here the mechanisms underlying allergic asthma and lung fibrosis to find new therapeutic targets with novel antibody therapy. Deficiency of a group of secretory phospholipase A2 augmented asthma phenotypes in a mouse model. Expression of a member of angiopoietin-like proteins was increased in the lung tissues from a mouse model of lung fibrosis and from the patients with pulmonary fibrosis. We also found that vascular endothelial growth factor (VEGF) plays an important role in pathogenesis of lung fibrosis in mice, and our findings suggest that the genetic delivery of monoclonal anti-VEGF antibody is a novel alternative to conventional monoclonal antibody therapy.

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	2,700,000	810,000	3,510,000

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:難治性呼吸器疾患, 気管支喘息, 肺線維症, 抗体療法

1. 研究開始当初の背景

難治性重症喘息、COPD、急性肺傷害、肺線維症などの難治性呼吸器疾患の治療法は確立しておらず、その詳細な病態解析に基づく新規治療法の開発が必要である。

近年、各種病態の成立に重要なメディエーターが同定され、それらに対するモノクローナル抗体が開発されてきた。現在、様々な疾患に対してモノクローナル抗体による治療が臨床応用されている。今後もさらなる発展が

期待されているが、モノクローナル抗体の半減期は一般的に短いため、繰り返し投与する必要があり、非常に高価であることなどが大きな課題として残されている。

これらの問題を克服するために、本研究では治療用モノクローナル抗体を長期間産生するベクターを開発して疾患モデルを制御する研究を行ってきた。すなわち、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) に対するモノクローナル抗体を、単回投与にて長期に渡り肺局所で産生するウイルスベクターを開発した。現行製剤では半減期が短いため 2~4 週毎に繰り返し投与する必要があるが、本ベクターは単回投与にて長期間 (これまでのデータでは少なくとも 40 週間) のモノクローナル抗体の産生が可能である。このモノクローナル抗体産生ウイルスベクターを利用して、透過性肺水腫や転移性肺腫瘍などの難治性呼吸器疾患に対する有用性を報告した。また、ベクターを胸腔内に投与して胸部臓器特異的に抗体遺伝子を導入する手法により、肺局所で効率良くモノクローナル抗体遺伝子を長期に発現させる手法を確立した。

また、研究者らは、気管支喘息の病態におけるサイトカインとサイトカインシグナル抑制因子、キチナーゼ、カルシウム依存性クロライドチャネルの関与などの新たな知見を見出すとともに、サイトカインシグナル抑制因子の制御、キチナーゼ阻害薬、カルシウム依存性クロライドチャネル阻害薬などの新規治療法の開発にも取り組み、動物モデルでのその有用性を報告してきた。

本研究では、特に、これまで呼吸器での役割が不明であるリン脂質分解酵素分泌性ホスホリパーゼ A2 (secretory phospholipase A2: sPLA2)、血管新生因子アンジオポエチンに構造上類似する分泌型蛋白であるアンジオポエチン様蛋白 (Angiopoietin-like protein: Angpt1) に注目して、難治性呼吸器疾患の新たな治療標的を探索した。

sPLA2 は、クリセロリン脂質の 2 位のエステル結合を加水分解して脂肪酸とリソリン脂質を産生する酵素 PLA2 の分子種の一つである。従来の研究では、細胞内 PLA2 のひとつ cPLA2 α がアラキドン酸代謝の始動に中心的役割を演じることか明らかとされてきたか、それ以外の PLA2、特に sPLA2 の機能的役割は不明な点が多かった。

Angpt1 は、脂質代謝やエネルギー代謝に関与し、メタボリックシンドロームなどの生活習慣病の新しい治療標的として注目されている。7 種類の Angpt1 の中には、血管内皮細胞や単球に作用し、炎症関連遺伝子を誘導し、慢性炎症を惹起・増悪する重要な因子であることが判明した Angpt1 もある。

2. 研究の目的

難治性喘息や COPD、肺線維症、急性肺傷害などの難治性呼吸器疾患の新たな治療標的の探索、およびこれらの疾患に対する新規抗体療法の開発を目的とし、以下の研究を行った。

(1) 喘息、肺線維症、肺傷害における sPLA2 の役割の解明

(2) 喘息、肺線維症、肺傷害における Angpt1 の役割の解明

(3) 肺線維化における VEGF の関与と抗 VEGF モノクローナル抗体産生ベクターの効果

3. 研究の方法

アレルギー性喘息のマウスモデルは、水酸化アルミニウムをアジュバントとして、卵白アルブミンを感作、吸入曝露により作製した。喘息反応として、麻酔人工換気下の吸入アセチルコリンに対する気道過敏性、気管支肺胞洗浄液中の好酸球数、気道杯細胞の増生などを指標とした。

肺線維症マウスモデルは、プレオマイシンを気管内投与して誘導し、肺の炎症を気管支肺胞洗浄液で評価し、線維化を肺組織標本や肺ヒトロキシプロリン測定により評価した。

肺傷害マウスモデルは、エンドトキシンを気管内投与して誘導し、肺の炎症を気管支肺胞洗浄液や肺組織標本により評価した。

各種の sPLA2 遺伝子欠損マウス、Angpt1 欠損マウス、VEGF を生体内で過剰発現するトランスジェニックマウスなどの遺伝子改変マウスを用い、喘息モデル、肺線維症モデル、急性肺傷害モデルなどを野生型と比較した。

肺線維症患者の検体は、肺癌切除標本で背景に肺線維化が確認された症例で、切除標本で病理学的に肺線維症の診断のついている例を対象とした。

免疫染色用に、アンジオポエチン様因子 Angpt1 に対する抗体を作製した。この抗体を用いて、マウス肺線維症モデルの肺組織およびヒト肺線維症患者の肺組織の活動性病変部を免疫染色し、Angpt1 の発現を検討した。

4. 研究成果

難治性呼吸器疾患に対する新規抗体療法の開発を目的として、疾患モデルの作製および抗体療法の新たな治療標的を探索した。疾患モデルは、気管支喘息、肺線維症、急性肺傷害の病態を安定してマウスに再現する手法を確立できた。

(1) 新たな治療標的を探索するために、sPLA2 遺伝子欠損マウスに、卵白アルブミンとアジュバントを用いて喘息反応を誘導したところ、野生型マウスと比べて吸入アセチルコリンに対する気道過敏性が著明に亢進し、好酸球性炎症が増強していた。

また、ブレオマイシンを用いて肺線維症を誘導すると、sPLA2 遺伝子欠損マウスでは体重減少や死亡率が高まることも見出した。

これらの結果は、分泌性リン脂質分解酵素が喘息や肺線維症の発症を抑制することを意味する。分泌性リン脂質分解酵素の喘息や肺線維症への関与を示した報告はこれまでなく、新しい観点による病態解明と治療法開発に繋がる極めて重要な成果である。

(2) Angpt1 に対する免疫染色にて、ヒト肺線維症の肺組織に Angpt1 が高発現していることを確認した。また、肺線維症のマウスモデルでは、肺での Angpt1 の発現が増強していた。

Angpt1 は線維化の誘導に重要な役割を果たすと考えられ、Angpt1 の生理作用を阻害する中和抗体の開発は、線維化を抑制する画期的な治療法として期待できる。

(3) VEGF の肺線維症への影響を検討するために、VEGF トランスジェニックマウスに肺線維症を誘導した。興味深いことに、野生型と比較して線維化が著明に増強しており、VEGF は肺線維化を促進することが明らかになった。

研究分担者らは、VEGF に対するモノクローナル抗体を肺局所で長期間産生するベクターを既に開発しており、透過性肺水腫や転移性肺腫瘍などの難治性呼吸器疾患に対する有用性を報告してきた。今回の研究結果から、抗 VEGF モノクローナル抗体産生ベクターは、肺線維症に対する新しい治療法としても有用であることを示唆している。

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)

[雑誌論文] (計 4 件) 全て査読あり

(1) Matsunaga Y, Fukuyama S, Okuno T, Sasaki F, Matsunobu T, Asai Y, Matsumoto K, Saeki K, Oike M, Sadamura Y, Machida K, Nakanishi Y, Kubo M, Yokomizo T, Inoue H. Leukotriene B4 receptor BLT2 negatively regulates allergic airway eosinophilia. *FASEB J* 2013 in press
doi:10.1096/fj.12-217000

(2) Samukawa T, Hamada T, Uto H, Yanagi M,

Tsukuya G, Nosaki T, Maeda M, Hirano T, Tsubouchi H, Inoue H. The elevation of serum napsin A in idiopathic pulmonary fibrosis, compared with KL-6, surfactant protein-A and surfactant protein-D. *BMC Pulm Med*. 12(1):55, 2012.
doi: 10.1186/1471-2466-12-55

(3) Kan-O K, Matsumoto K, Inoue H, Fukuyama S, Asai Y, Watanabe W, Kurokawa M, Araya J, Kuwano K, Nakanishi Y. Corticosteroids plus long-acting beta2-agonists prevent double-stranded RNA-induced upregulation of B7-H1 on airway epithelium. *Int Arch Allergy Immunol* 160(1):27-36, 2012
DOI: 10.1159/000338430

(4) Matsumoto K, Asai Y, Fukuyama S, Kan-o K, Matsunaga Y, Noda N, Kitajima H, Inoue H. IL-6 induced by double-stranded RNA augments allergic inflammation via suppression of Foxp3+ T cell/IL-10 axis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46(6):740-7, 2012
DOI: 10.1165/rcmb.2010-04790C

[学会発表] (計 3 件)

(1) Inoue H et al. Role of leukotriene B4 receptor BLT2 in allergic airway inflammation. Keystone Symposia Conference "Pathogenic Processes in Asthma and COPD" 2013年1月 Santa Fe

(2) 井上博雅 ほか 重症気管支喘息の病態：炎症細胞と炎症性サイトカイン 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012年11月 大阪市

(3) 井上博雅 気管支喘息における気道炎症の機序 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会 2011年5月 千葉市

[図書] (計 3 件)

(1) 井上博雅. 気管支喘息. 今日の治療指針 2013年版 p288-290. 山口徹・北原光夫・福井次矢編集, 医学書院, 東京, 2013
<http://www.igaku-shoin.co.jp/bookDetail.do?book=84344>

(2) 町田健太郎, 東元一晃, 井上博雅. 喘息に対する抗サイトカイン療法. Annual Review呼吸器 2012. 永井厚志・巽 浩一郎・桑野和善・高橋和久編集, 中外医学社, 東京, 2012
https://www.chugaiigaku.jp/modules/shop/index.php?main_page=product_info&cPath

=4_47&products_id=1222

(3)井上博雅, 町田健太朗, 浅井友香里. 気管支喘息における IL-33. Annual Review 呼吸器 2011. 永井厚志・巽 浩一郎・桑野和善・高橋和久編集, 中外医学社, 東京, 2011
https://www.chugaiigaku.jp/modules/shop/index.php?main_page=product_info&cPath=4_47&products_id=1121

〔産業財産権〕

○ 出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 博雅 (INOUE HIROMASA)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：30264039

(2)研究分担者

渡辺 正樹 (WATANABE MASAKI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
特任助教
研究者番号：90398298

(3)連携研究者

村上 誠 (MURAKAMI MAKOTO)
東京都医学総合研究所・脂質代謝プロジェクト・プロジェクトリーダー
研究者番号：60276607

尾池 雄一 (OIKE YUICHI)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号：90312321

(4)研究協力者

久保田 真吾 (KUBOTA SHINGO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
大学院生

貞村 ゆかり (SADAMURA YUKARI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
大学院生