

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：30108
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：18K12066
研究課題名（和文）DDSと光イメージングが紡ぐ肺線維症の高感度かつ低リスクな病巣検出法の創出

研究課題名（英文）Fluorescent Imaging of pulmonary fibrotic foci by pulmonary drug delivery systems

研究代表者
多田 均（Tada, Hitoshi）

北海道科学大学・薬学部・教授

研究者番号：10400491
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：肺線維症は指定難病とされており、希少疾病であることから臨床研究の進展が遅いのが現状である。この疾患では、肺胞内に線維が蓄積することによって伸縮性を失い、呼吸困難によってQOLを著しく損なうことに加え、高い致死率が大きな問題となっており、有用性に優れた治療法の開発が急務である。本研究では、早期に肺疾患を発見し適切な治療を開始すること、進行した病態においても十分な有効性が得られる医薬品を開発することの両方に有用な、肺線維症発症部位への標的指向性を搭載した肺投与型リポソーム製剤を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、肺線維症の病巣へ選択的に集積するナノ粒子の創出を目指し、肺線維症の発症および進行時に増殖する肺線維芽細胞への指向性を搭載したリポソーム製剤の開発に着手した。難治性肺疾患である肺線維症を早期に発見して適切に治療することは、医学的に極めて重要な要請であることは勿論、医療費高騰の抑制など社会的にも非常に大きな意義がある。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we assessed the delivery of the liposomes modified with truncated basic fibroblast growth factor (tbFGF) to pulmonary fibrotic foci. The tbFGF peptide was used to modify the surface of liposomes. tbFGF-modified liposomes were widely and higher distributed in fibrotic regions of fibrotic lungs than non-modified liposomes.

研究分野：薬物動態学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 肺線維症 蛍光イメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺線維症は指定難病とされており、希少疾病であることから臨床研究の進展が遅いのが現状である。この疾患では、肺胞内に線維が蓄積することによって伸縮性を失い、呼吸困難によって QOL を著しく損なうことに加え、高い致死率が大きな問題となっており、有用性に優れた治療法の開発が急務である。これまでに病態モデル動物を用いて分子標的薬や核酸医薬など様々な化合物の薬理研究が盛んに行われているものの、臨床における十分な有用性が得られずに実用に至らないものが多い。この一因として、病態モデル動物を用いた検討においては、発症初期または発症前の段階で治療候補化合物を投与している場合が多く、実際の治療対象となる進行した病態における十分な効果が担保されていないことが挙げられる。この問題を解決するためには、①早期に肺疾患を発見し、適切な治療を開始する、②進行した病態においても、十分な有効性が得られる医薬品を開発する、といった戦略が考えられる。これまでに我々は、②を指向し、肺胞内への効率的な薬物送達を可能とする肺投与型 Drug Delivery System (DDS) 製剤の構築研究を行ってきた。しかしながら、病態が進行した肺では病巣へのコラーゲンなどの細胞外マトリックスの過剰蓄積によって、薬物の病巣への分布が妨げられることがこれまでの研究で明らかとなっていた。すなわち、上記①と②のどちらかを指向するにせよ線維化した肺の細胞外マトリックスを視覚化する方法論を構築し、病巣を適確に検出することで病態の進行や治療効果の判定、線維組織における DDS 製剤の分布特性評価を行う必要がある。

2. 研究の目的

これまでの研究結果は、肺線維症を克服するためには、前項①の早期発見、早期治療がいかに重要であるかを痛感させるものであるとともに、②を達成するために肺線維症治療に特化した肺投与型 DDS 製剤を再構築する必要性を強く示唆していた。そこで本研究では、肺線維症の病巣へ選択的に集積するナノ粒子の創出を目指し、肺線維症の発症および進行時に増殖する肺線維芽細胞への指向性を搭載したリポソーム製剤の開発に着手した。難治性肺疾患である肺線維症を早期に発見して適切に治療することは、医学的に極めて重要な要請であることは勿論、医療費高騰の抑制など社会的にも非常に大きな意義がある。

3. 研究の方法

(1) 肺線維症モデルマウスの作成

マウスに液体気管内噴霧投与器具 (Liquid MicroSprayer™, Model 1A-1C) を用いて、ブレオマイシンを肺投与し、14 日間飼育することで肺線維症を誘発した。なお、肺線維症発症の確認は、肺凍結切片のマッソントリクローム染色像の観察と肺中ヒドロキシプロリンの定量により行った。

(2) 肺線維芽細胞指向型リポソームの調製

肺線維芽細胞上の basic fibroblast growth factor (bFGF) 受容体に親和性を有する truncated bFGF (tbFGF) を合成した。カチオン性脂質である DOTAP を主成分とする粒子径 100 nm のリポソームを調製し、tbFGF を表面修飾した。

(3) 肺線維芽細胞指向型リポソームの蛍光イメージング

Rhodamine B で標識した肺線維芽細胞指向型リポソームを肺線維症モデルマウスに気管内噴霧し、投与 2 時間後に肺を摘出した。摘出した肺を蛍光ズーム顕微鏡 (Axio. Zoom V.16, Zeiss) で蛍光観察した。また、摘出した肺を Clear^{T2} 法で組織透明化処理し、共焦点レーザー顕微鏡で内部の蛍光観察を行った。

4. 研究成果

(1) 肺線維芽細胞指向型リポソームの臓器スケールでの分布評価

肺線維芽細胞指向型リポソームを肺線維症モデルマウスに肺投与し、蛍光ズーム顕微鏡で肺全体を観察した蛍光像を Fig. 1 に示す。tbFGF 修飾したリポソームでは、未修飾リポソームと比較して線維化肺全体で強い蛍光が観察された。

(2) 肺線維芽細胞指向型リポソームの線維化部位における分布評価

肺線維芽細胞指向型リポソームを肺線維症モデルマウスに肺投与し、組織透明化処理した摘出肺を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果を Fig. 2 に示す。Col-F によって描写されたコラーゲンが多く集積する部位に、tbFGF で修飾したリポソームは未修飾リポソームよりも多く集積した。以上の結果より、肺線維芽細胞指向型リポソームを用いることで、肺線維症の早期発見および効率的な治療を指向した新規肺投与型 DDS の開発が期待できる。

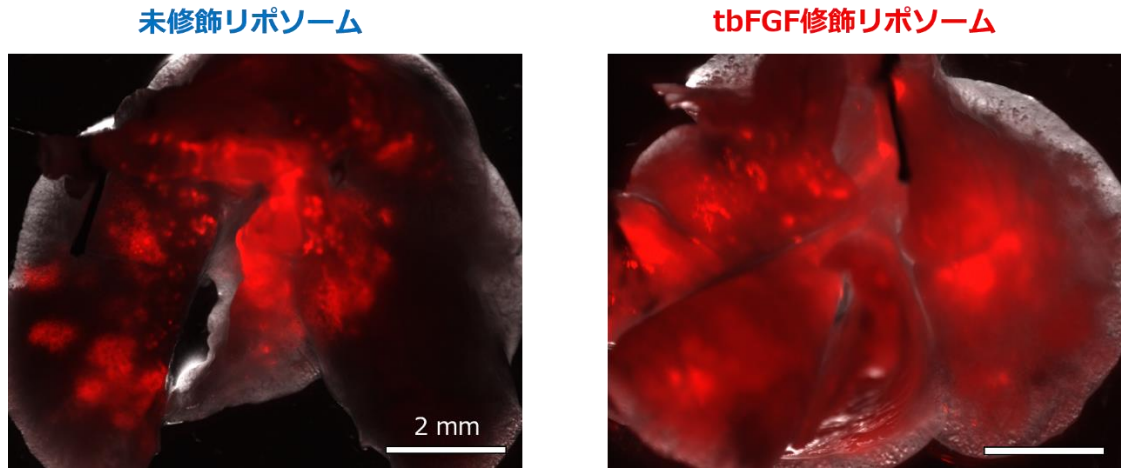


Fig. 1 Tissue distribution of lung fibroblast-targeting liposomes in pulmonary fibrosis mouse

Rhodamine B-labeled lung fibroblast-targeting liposomes were administered intrapulmonarily to the mice. The lungs were observed with fluorescence zoom microscopy.

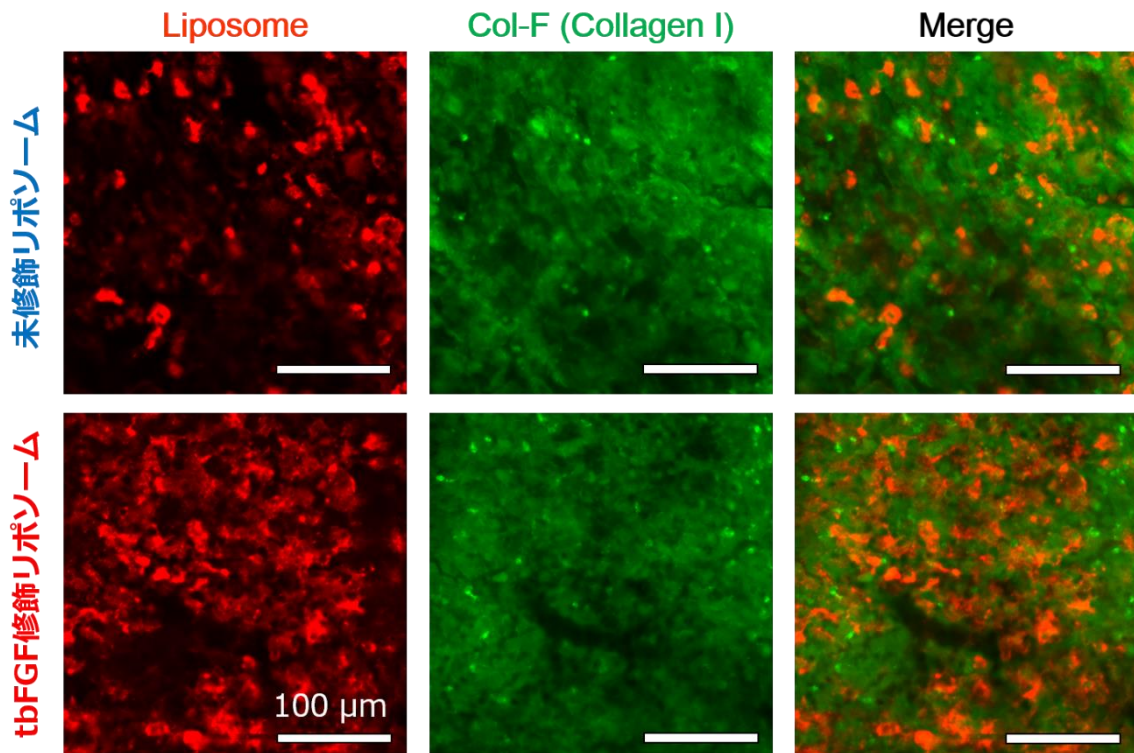


Fig. 2 Intrapulmonary distribution of lung fibroblast-targeting liposomes after tissue-clearing treatment

Rhodamine B-labeled lung fibroblast-targeting liposomes were administered intrapulmonarily to the pulmonary fibrosis mice. After Clear^{T2} tissue-clearing treatments with collagen staining using Col-F, the lung tissues were observed via confocal microscopy. The images were taken at a depth of 20 mm from the lung surface. Red fluorescence indicates the distribution of the liposomes. Green fluorescence indicates the localization of collagen I.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanehira Yukimune, Togami Kohei, Ishizawa Kiyomi, Sato Shingo, Tada Hitoshi, Chono Sumio	4. 巻 24
2. 論文標題 Intratumoral delivery and therapeutic efficacy of nanoparticle-encapsulated anti-tumor siRNA following intrapulmonary administration for potential treatment of lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Development and Technology	6. 最初と最後の頁 1095 ~ 1103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10837450.2019.1633345	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Togami Kohei, Daisho Takayuki, Yumita Yuki, Kitayama Anri, Tada Hitoshi, Chono Sumio	4. 巻 562
2. 論文標題 Evaluation of various tissue-clearing techniques for the three-dimensional visualization of liposome distribution in mouse lungs at the alveolar scale	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 218 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpharm.2019.03.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Togami Kohei, Fukuda Kenta, Yamaguchi Kotaro, Tada Hitoshi, Chono Sumio	4. 巻 10
2. 論文標題 Facile and sensitive HPLC-UV method for determination of nintedanib in rat plasma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science	6. 最初と最後の頁 133-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Togami Kohei, Ozaki Hiroaki, Yumita Yuki, Kitayama Anri, Tada Hitoshi, Chono Sumio	4. 巻 2020
2. 論文標題 Three-Dimensional Imaging of Pulmonary Fibrotic Foci at the Alveolar Scale Using Tissue-Clearing Treatment with Staining Techniques of Extracellular Matrix	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Biomedical Imaging	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/8815231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishizawa Kiyomi、Togami Kohei、Tada Hitoshi、Chono Sumio	4. 巻 46
2. 論文標題 Evaluation of tissue-clearing techniques for intraorgan imaging of distribution of polymeric nanoparticles as drug carriers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Development and Industrial Pharmacy	6. 最初と最後の頁 2061 ~ 2069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03639045.2020.1843476	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Togami Kohei、Maruta Yuki、Nanbu Mao、Tada Hitoshi、Chono Sumio	4. 巻 46
2. 論文標題 Prolonged distribution of aerosolized PEGylated liposomes in the lungs of mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Development and Industrial Pharmacy	6. 最初と最後の頁 1873 ~ 1880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03639045.2020.1825473	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishizawa Kiyomi、Togami Kohei、Tada Hitoshi、Chono Sumio	4. 巻 109
2. 論文標題 Multiscale Live Imaging Using Förster Resonance Energy Transfer (FRET) for Evaluating the Biological Behavior of Nanoparticles as Drug Carriers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 3608 ~ 3616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2020.08.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 戸上紘平、岩田健嗣、小笠原安理沙、入江沙世、山口広太郎、多田均、丁野純男
2. 発表標題 シクロデキストリン複合体化による抗線維化薬ニンテグニブの肺内動態および肺線維症治療効果の改善
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸上紘平, 小笠原安理沙, 入江沙世, 岩田健嗣, 山口広太郎, 多田均, 丁野純男
2. 発表標題 抗線維化薬ニンテダニブ-シクロデキストリン複合体の肺投与による肺内動態および肺線維症治療効果の改善
3. 学会等名 第36回日本DDS学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石澤清心, 戸上紘平, 多田均, 丁野純男
2. 発表標題 Real-time FRET imagingによるドラッグキャリアの体内動態の可視化
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石澤清心, 戸上紘平, 多田均, 丁野純男
2. 発表標題 ドラッグキャリアの体内動態を可視化するreal-time FRET imaging
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸上 紘平、小笠原 安理沙、入江 沙世、岩田 健嗣、山口 広太郎、多田 均、丁野 純男
2. 発表標題 ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンを用いた抗線維化薬ニンテダニブ肺投与の有用性
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kohei Togami, Hirotsugu Ishii, Ryota Abe, Hitoshi Tada, Sumio Chono
2. 発表標題 Efficient delivery to fibrotic regions of liposomes modified with fibroblasts and collagen targeting for treatment in idiopathic pulmonary fibrosis
3. 学会等名 CRS 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyomi Ishizawa, Kohei Togami, Hitoshi Tada, Sumio Chono
2. 発表標題 Multiscale live-imaging using Förster resonance energy transfer to evaluate the distribution of nanoparticles for drug delivery
3. 学会等名 CRS 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸上紘平、石井大嗣、阿部亮太、多田均、丁野純男
2. 発表標題 肺線維症治療を指向したリポソームの肺線維芽細胞への集積性およびcollagen Iへの付着性に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyomi Ishizawa, Kohei Togami, Hitoshi Tada, Sumio Chono
2. 発表標題 Multi-scale imaging using Förster resonance energy transfer for evaluating drug carrier distribution
3. 学会等名 AAPS 2018 PHARMSCI 360 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石澤清心、戸上紘平、多田均、丁野純男
2. 発表標題 ドラッグキャリアに用いるナノ粒子と内封薬物の体内分布評価のためのFRET現象を応用したmulti-scale imaging
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石澤清心、戸上紘平、多田均、丁野純男
2. 発表標題 FRET現象を応用したmulti-scale imagingによるドラッグキャリアと内封薬物の体内分布評価法の確立
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石澤清心、戸上紘平、多田均、丁野純男
2. 発表標題 FRET現象を応用したmulti-scale imagingによるDDSの機能評価法の確立
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第145例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藏所楓、兼平幸宗、多田均、丁野純男、戸上紘平
2. 発表標題 肺線維症発症時における肺投与型リポソームの肺内滞留性に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第145例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	戸上 紘平 (Togami Kohei) (20582357)	北海道科学大学・薬学部・准教授 (30108)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------