

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：30111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790167

研究課題名(和文)線溶作用を有する微粒子製剤による肺線維症治療システムの開発

研究課題名(英文)Efficient delivery to fibrotic lesion of anti-fibrotic agents incorporated into nanoparticles for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

戸上 紘平(Togami, Kohei)

北海道薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20582357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺線維症は、高度の線維化により蜂巢肺を形成する難治性疾患であり、吸入型DDSによる優れた治療薬の開発が望まれている。本研究では、抗線維化薬を線維化肺に送達可能なDDSについて検討した。肺線維症では肺胞上皮細胞のタイトジャンクションの破壊が起こるため、高分子量の薬物を肺投与しても、肺胞中に滞留せずに血中へ漏出しやすいうえ、線維化部位には薬物が到達できないという問題点が示唆された。この問題を解決できる肺投与型DDSとして、約100 nmの微粒子製剤が最適な肺内動態となることを見いだした。そこで、bFGFの短鎖リガンド修飾リポソーム(粒子径100 nm)により、抗線維化薬の送達効率の向上を達成した。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary fibrosis is a progressive and lethal lung disease characterized by the accumulation of extracellular matrix, loss of pulmonary function, and change in lung structure. In this study, the intrapulmonary pharmacokinetics of aerosolized drugs was evaluated using animal models of bleomycin induced pulmonary fibrosis. This study suggests that in pulmonary fibrosis, aerosolized drugs cannot distribute widely in the lung and can easily leak into the plasma because of their accumulation in the extracellular matrix and destruction of the epithelial tight junctions in lungs. In addition, we assessed the delivery of anti-fibrotic agents incorporated into liposomes modified with truncated bFGF and investigated the anti-fibrotic effect of the drug. This study indicates that tbFGF-liposomes with 100 nm are useful drug delivery system of anti-fibrotic agents to fibrotic lesion for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：肺線維症 肺線維芽細胞 肺胞上皮細胞 吸入型DDS 抗線維化薬 肺内動態 タイトジャンクション
微粒子製剤

1. 研究開始当初の背景

肺線維症は、慢性かつ進行性の経過をたどり、高度の繊維化により不可逆性の蜂巣肺形成をきたす予後不良の難治性疾患であり、対策が急務である。線維症の治療薬として、繊維化に関わる分子標的薬などの薬理学的研究が盛んに行われているが、抗線維症効果を示す物質を見いだしても、他の臓器での副作用発現が問題となり、十分な有用性が得られていない。さらに、初の抗線維症薬として上市されたピルフェニドンにおいても、半数以上に光線過敏症といった重篤な副作用が生じることが大きな問題となっている。これらは経口、静脈内または腹腔内投与による検討であり、血液を介して全身へ分布するため、全身性副作用が生じると考えられる。この問題を解決するためには、肺線維症治療のための局所投与型ドラッグデリバリーシステムの利用が有効であると考えられた。

研究代表者は、これまでに呼吸器疾患治療の最適化を目的とし、各肺胞細胞の薬物輸送機構を解明し、肺細胞をターゲットとする肺投与型ドラッグデリバリーシステムの開発を進めてきた。肺に投与した製剤を、肺胞中に滞留させ、全身循環系に移行させないためには、肺胞上皮細胞を介して血液中へ吸収されにくい性質を製剤に付与することが不可欠であった。ところが、この正常モデル動物や肺炎モデル動物では、優れた肺内滞留性を示す肺投与型ドラッグデリバリーシステムを肺線維症治療に応用できるか予備検討を行ったところ、プレオマイシン誘発性肺線維症モデルラットでは、その肺内滞留性が顕著に低下する結果が得られた。すなわち、肺線維症の治療に特化した、肺内滞留性に優れた新たなドラッグデリバリーシステムの構築が必要であった。

2. 研究の目的

肺線維症においては肺上皮細胞が断裂し、線維芽細胞が肺胞腔内に侵入して増殖することから肺胞は閉塞していく。そのため、これまでの肺炎などを想定した肺投与型ドラッグデリバリーシステムでは、十分な薬物送達を達成することが難しいと考えられた。そこで本研究では、肺線維症発症時の各種薬物の肺内動態特性を検討した。さらに、得られた結果に基づいて、優れた肺内滞留性を有する抗線維化薬のドラッグデリバリーシステムの構築を試みた。

3. 研究の方法

(1) 肺線維症治療薬の候補化合物の薬理効果の評価

抗線維化薬を有する化合物として血清胸腺因子 (FTS) に着目した。肺線維芽細胞 (WI-38) を用いて細胞増殖能を CCK-8 法

で検討した。さらに、TGF- β 刺激によるコラーゲン産生能に対する抑制効果を、細胞内ヒドロキシプロリンを定量することで求めた。

(2) 肺胞構造の変化が薬物の肺組織分布特性に与える影響

Wistar ラット及び ICR マウスに、Microsprayer を用いてプ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モデル動物を作成した。肺線維症マウスにインドシアニングリーンを肺投与し、肺内動態を *in vivo* imaging 装置を用いて評価した。また、肺線維症ラットに、6-CF、FD-4、-10、-70 及び-250 を肺投与した。血漿及び気管支肺泡洗浄液中薬物濃度から、薬物の肺内滞留性を評価した。

(3) 肺線維症の治療を指向したドラッグデリバリーシステムの構築

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。tbFGF を修飾した粒子径 100 nm のリポソームを調製し、肺線維芽細胞への集積性について検討した。さらに、抗線維化薬であるピルフェニドンを封入し、コラーゲン産生抑制効果についても併せて検討した。

4. 研究成果

(1) FTS の添加により、WI-38 の増殖能に影響は認められなかった。一方、WI-38 の TGF- β 刺激によるコラーゲン生成に対しては、FTS 0.1 nM 以上の濃度において有意な抑制作用が認められた (Fig. 1)。以上の結果より、FTS は肺線維症の治療に有効である可能性が示唆された。

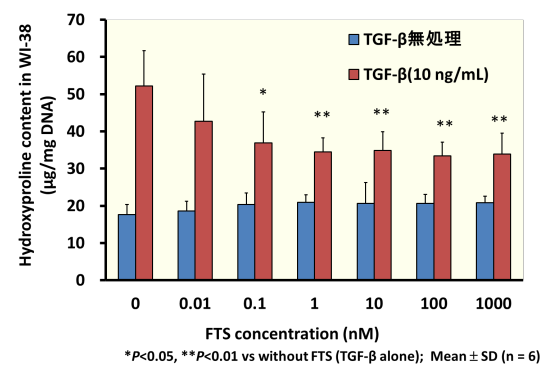


Fig. 1 Hydroxyproline content after TGF- β stimulation in WI-38 cells with FTS

(2) 肺線維症マウスにおいて、肺におけるインドシアニングリーンの蛍光強度は、速やかに減弱した。また、肺線維症ラットにおいて、6-CF、FD-4、FD-10、FD-70 及び FD-250 を肺投与後の血中濃度は、正常群よりも高い値で推移し、反対に気管支肺

胞洗浄液中の残存量は正常群より低い値を示した(Fig. 2)。すなわち、肺線維症発症時には分子量 250000 (粒子径 30 nm 相当)以上の微粒子製剤でなければ、肺内滞留性を担保できないことが示唆された。

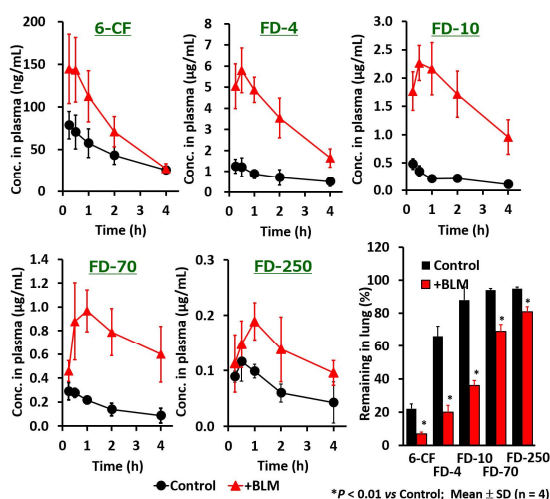


Fig. 2 Time course of the concentrations of 6-CF, FD-4, FD-10, FD-70, and FD-250 in plasma and remaining in BALF of them after intrapulmonary administration to rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis

(3) tbFGF 修飾リポソームの WI-38 細胞内取り込み量は、未修飾リポソームより高い値で推移した (Fig. 3)。また、ピルフェニドンを封入した tbFGF 修飾リポソームは、水溶液と比較して優れたコラーゲン産生抑制作用を示した。以上の結果より、tbFGF 修飾リポソームを用いることで、肺線維芽細胞へ抗線維化薬を効率的に送達可能な、肺線維症治療を指向した新規 DDS の開発が期待できる。

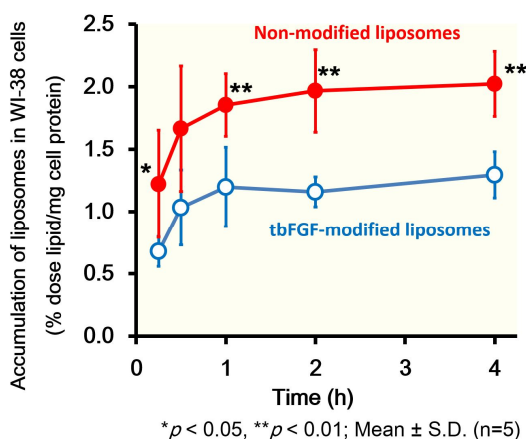


Fig. 3 Time profiles of the cellular accumulation of tbFGF-liposomes and non-modified liposomes in WI-38

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計3件)

Togami K, Kanehira Y, Tada H.: Possible involvement of pirfenidone metabolites in the antifibrotic action of a therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Biol. Pharm. Bull.* 36(10), 1525-1527, 2013. 査読有.
DOI: 10.1248/bpb.b13-00452

Togami K, Miyao A, Miyakoshi K, Kanehira Y, Tada H, Chono S.: Efficient delivery to human lung fibroblasts (WI-38) of pirfenidone incorporated into liposomes modified with truncated basic fibroblast growth factor and its inhibitory effect on collagen synthesis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Biol. Pharm. Bull.* 38(2), 270-276, 2015. 査読有.
DOI: 10.1248/bpb.b14-00659.

Togami K, Kanehira Y, Tada H.: Pharmacokinetic evaluation of tissue distribution of pirfenidone and its metabolites for idiopathic pulmonary fibrosis therapy. *Biopharm. Drug Dispos.* 36(4), 205-215, 2015. 査読有.
DOI: 10.1002/bdd.1932

(学会発表)(計11件)

戸上 紘平、沖田 彩、栗屋 昭、多田 均: 肺線維症治療薬開発のための血清胸腺因子 (FTS) の作用機序の検討. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013.3

兼平 幸宗、戸上 紘平、多田 均: 肺線維症治療薬ピルフェニドン及びその代謝物の体内動態と肺組織移行性. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013.3

兼平 幸宗、戸上 紘平、多田 均: 肺線維症治療の最適化を目的とした抗線維化薬ピルフェニドンの薬物動態及び薬力学的評価. 第 52 回日本薬学会東北支部大会 (仙台) 2013.10

宮尾 亜希、宮腰 恵生、戸上 紘平、多田 均、丁野 純男: 肺線維症の治療を指向した basic fibroblast growth factor (bFGF) 修飾リポソームの肺線維芽細胞への標的指向化に関する研究. 日本薬学会第 134 年会 (熊本) 2014.3

戸上 紘平、丁野 純男、多田 均: 肺線維症モデル動物における肺投与後の肺内動態に関する検討. 日本薬学会第 134 年会 (熊本) 2014.3

戸上 紘平、多田 均、丁野 純男: 肺線維症モデル動物における肺投与型薬物の肺内動態に関する検討. 第 29 回日本薬学会年会 (大宮) 2014.5

戸上 紘平、宮尾 亜希、宮腰 恵生、多田 均、丁野 純男: 肺線維症の治療を指向した basic fibroblast growth factor (bFGF) 修

飾りボソームの肺線維芽細胞への標的指向化. 第 30 回日本 DDS 学会年会 (東京) 2014.7

Togami K, Tada H, Chono S: Intrapulmonary pharmacokinetics of aerosolized drugs in animals with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. 19th North American Regional ISSX Meeting and 29th JSSX Annual Meeting (San Francisco, USA). 2014.10

兼平 幸宗、戸上 紘平、多田 均、丁野 純男: 転移性肺がんモデルマウスにおける肺投与型薬物の肺組織分布特性. 日本薬学会第 135 年会 (神戸) 2015.3

戸上 紘平、丁野 純男、多田 均: 肺線維症モデル動物における肺投与した薬物の肺内滞留性及び肺胞深部への到達性に関する検討. 日本薬学会第 135 年会 (神戸) 2015.3

大原 宏司、松本 和、戸上 紘平、佐藤 安訓、上野 明道、多田 均、早坂 正孝: 細胞外 ATP と TGF- β のヒト肺線維芽細胞遊走に関する研究. 日本薬学会第 135 年会 (神戸) 2015.3

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸上 紘平 (TOGAMI Kohei)

北海道薬科大学 薬学部 講師

研究者番号: 20582357