

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282146

研究課題名(和文) マクロファージを味方にして難治性肺疾患を克服するバイオミメティックDDSの構築

研究課題名(英文) Biomimetic DDS for overcoming intractable lung diseases by activation of macrophage functions

研究代表者

寺田 弘 (TERADA, Hiroshi)

新潟薬科大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：00035544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺がん、肺結核、慢性閉塞性肺疾患(COPD)などの難治性肺疾患を克服するために必要な治療薬を肺病巣部に有効に送達できるDDS製剤の調製を行うとともに、DDS製剤を疾患部に送達するラットやマウスなどの小動物用経気管投与装置の開発に成功した。また、肺胞内で病原細胞は攻撃型の「善玉」のM1マクロファージを自己の生存を有利にさせる「悪玉」のM2マクロファージに形質変換させるが、この変換を防ぎM1マクロファージの存在率を向上させるにはリポ多糖(LPS)およびリピッドA同族体であるONO-4007が極めて有効であることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：In order to overcome intractable lung diseases, such as lung cancer and lung tuberculosis, it is highly efficient to deliver their therapeutic agents directly to the lesion sites by intratracheal insufflation. The nanocomposite particles (mean particle size: 7.8 μm) consisting of PLGA (poly(lactic-co-glycolic) acid) nanoparticles (mean sizes: 190 nm) containing the antitubercular agent rifampicin were prepared. These particles were distributed homogeneously in the rat and mouse lungs by the intratracheal administration by the newly developed Venturi insufflator, showing efficient antitubercular effects. In addition, the antitumor agent cyclophosphamide (CPA) increased the population of the M1 lung macrophages located around the tumor cells and showed effective antitumor activity. The lipid A analog ONO-4007 enhanced these effects of CPA.

研究分野：複合領域 人間医工学 生体医工学 生体材料学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 結核 肺がん 慢性閉塞性肺疾患 マクロファージ 経気管投与

1. 研究開始当初の背景

肺結核、肺がん、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などは難治性の肺疾患であり、いずれの疾病も根治療法が確立されていない。これらの疾病を克服するためには、まず治療薬を肺疾患部に送達する必要がある。上記疾患は、肺胞表面部位に病巣部位が存在しているために、気管を介して治療薬を疾患部にピンポイント送達できるならば、効率的に治療を行うことができるものと期待される。しかし、肺組織表面は生体外表面に位置し、呼吸に際して体内に侵入を試みる病原体などの生体異物を排除する強力な防御装置でもある。このために、治療薬の肺病巣部へピンポイント送達には、特別な工夫が必要となる。

難治性肺疾患治療に際して、考慮しておかないといけないことのもう一つの事項は、病原体と生体防御系との関係である。肺胞マクロファージは、呼吸に伴い肺胞に到達した病原体を貪食によって排除する異物排除装置であるが、病原体は肺胞マクロファージの形質を自己の生存と増殖にとって有利なものに変換させてしまう。例えば、肺がん細胞周辺の肺胞マクロファージは TAM (Tumor Associated Macrophage) と称され、がん細胞の増殖を促進する働きがある。すなわち、マクロファージ本来の異物処理を行う攻撃性の「善玉系」マクロファージ (M1 型マクロファージ) を「悪玉系」マクロファージ (M2 型マクロファージ) に変換するのである。また、結核菌は、肺胞マクロファージに貪食されても、マクロファージを自己の増殖を行うための培養器へと変換してしまうために、貪食によって形成されたファゴソーム内で結核菌は旺盛に増殖する。

難治性肺疾患に対する根治療法を確立するためには、治療薬の肺胞への経気管投与方法を開発することと病原体による肺胞マクロファージの形質変換を考慮することが必要であるが、本研究開始当初においては、これらの課題に関し顕著な成果はあげられていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、難治性肺疾患を克服するために、肺病巣部へ治療薬をピンポイント送達する経気管投与方法を確立するとともに、肺胞マクロファージ、治療薬、病原体の三者の関係をマクロファージの形質変換を念頭に入れて解析する。そのために、以下の研究を行う。

- 1) 抗がん薬、抗結核薬などを肺胞内へ送達可能な経気管 DDS 製剤の調製を行う。
従来の研究から、DDS 製剤の基剤には乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) が適していることを明らかにしているため、種々の条件下で治療薬を含有した PLGA 製剤を調製する。
- 2) 経気管投与方法の開発
DDS 製剤の抗結核、抗肺がん効果を調

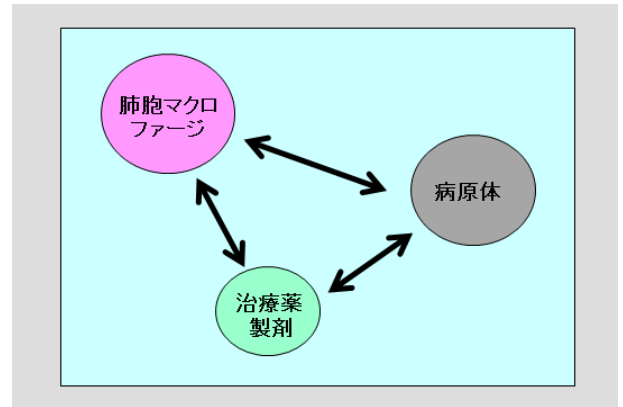


図 1 難治性肺疾患克服のために考慮しないといけない治療薬 (製剤)、肺胞マクロファージと病原体三者の相互関係

べるためには、まずラットやマウスなどの小動物を用いる必要がある。これら小動物用の経気管投与方法として従来の陽圧型装置を改良するとともに、陰圧換気型人工呼吸器の原理を応用してあらたな装置を開発する。

- 3) 病原体、肺胞マクロファージ、治療薬製剤三者の相互作用を基礎に難治性肺疾患克服を考える (図 1)。

この項目の課題研究は、まず結核菌・がん細胞の肺胞マクロファージの表現形に与える影響からスタートする。

3. 研究の方法

- 1) 経気管 DDS 製剤の調製
PLGA を基剤とする製剤粒子を粒子径、PLGA の分子量、乳酸とグリコール酸の比率を変化させて調製し、治療薬の溶出パターン、製剤のマクロファージの機能に対する影響などを調べる。
- 2) 経気管投与方法の開発
これまでの肺への製剤投与方法は、肺胞上皮を介する全身性の「経肺投与」であったが、本研究では肺胞に粒子を滞留させる「蓄肺性投与」であるので、肺胞にまで製剤粒子が到達できるための条件設定から研究を開始する。
目的とする動物はラットやマウスなどの小動物である。従来の陽圧型投与方法の改良を行うとともに、新たに陰圧換気型人工呼吸器の原理に基づいた装置の開発を行う。
- 3) 病原体及び治療薬の肺胞マクロファージの機能に対する影響
抗がん薬、抗結核薬の肺胞マクロファージの機能に対する影響を、M1、M2 型マクロファージに特有なシグナルの発現を指標にして調べる。

次いで、ラットなどの小動物の肺胞における肺がんと結核の病巣部に存在する肺胞マクロファージの形質変換を調べる。

4. 研究成果

本研究では、肺胞へ送達可能な DDS 製剤の調製、DDS 製剤の肺胞病巣部まで送達するための経気管投与装置の開発、および病原体、治療薬の肺胞マクロファージの機能におよぼす影響を主として行った。得られた結果の概要は以下に記すとおりである。

1) DDS 製剤の調製

肺胞への製剤粒子の送達は主として粒子径に依存し、最適の粒子径は数マイクロメータ程度であり、細胞内への移動はナノサイズが有利である。このために、肺胞までの送達にはマイクロメータ径の粒子で行い、細胞内への移行にはナノメータ粒子が行えるようにすると効率的である。

従って、一次粒子としてナノ粒子を用いこれらを集合させたマイクロメータサイズの二次粒子とするナノコンポジット粒子(図2)を調製した。

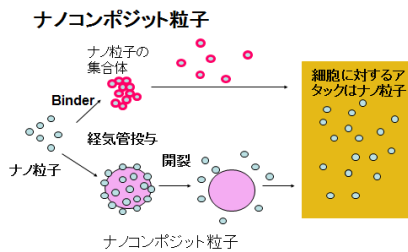


図2 ナノコンポジット粒子

分子量 10,000、乳酸：グリコール酸=75:25 の PLGA (PLGA7510) を基剤として用いた抗結核薬リファンピシンのナノ粒子をエマルジョン法により調製し、この粒子懸濁液にアミノ酸であるアルギニンとロイシンとを賦形剤として用いてスプレードライ法によりナノコンポジット粒子を調製した。調製したナノコンポジット粒子は、平均粒子径が 190 nm の一次粒子が集合した平均粒子径が 7.8 μm のサイズを有していた。

2) 経気管投与装置の開発

製剤粒子を経気管投与する方法としては、従来用いられている陽圧型の「肺に粒子を注入する方法」と陰圧換気型人工呼吸器を用いた(いわゆる鉄の肺)陰圧型の「肺に粒子を流れ込ませる方法」とがある。

本研究では、陽圧型ではベンチュリー効果を取り入れた新規方法と、陰圧型方

法による装置の開発を試みた。ベンチュリー効果を用いた陽圧式方法と、鉄の肺方式(陰圧方式)による経気管投与装置を作成し、蛍光性の PLGA 粒子(平均粒子径 3 μm)のラット肺胞への分布を調べたのが図3であり、両者を市販の陽圧式 Penn Century DPI の結果と比較してある。一見して明らかなように、本研究で開発した陽圧式、陰圧式装置の方がともに Penn Century 型のものよりも格段に良好な結果を与えていることが分かる。

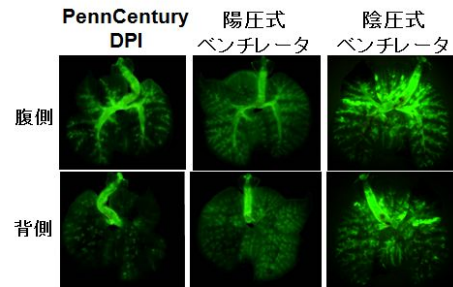


図3 蛍光性 PLGA 粒子(平均粒子径 3 μm)のラット肺への経気管投与結果

次いで、マウスに対する経気管投与装置の開発を試みた。マウスの肺の体積は 1 ml 程度で、気道の直径は 1.2 mm 程度と極めて小さなサイズであるので、製剤粒子を肺胞に送達するのは極めて困難であったが、改良陽圧型、新規陰圧型装置とともに良好な結果を得ることに成功した。特に、ゲルローディングマイクロチップを用いたベンチュリー効果による改良陽圧方式は、極めて良好であり、上述の方法により調製したナノコンポジット粒子製剤の投与量の 50% が肺胞に到達していた。

3) 肺胞マクロファージの機能に対する病原体などの影響

ラット肺にがん細胞を移植すると、がんの病巣部が形成される。この病巣部に対して抗がん剤であるシクロフォスファミド CPA を経気管投与すると抗がん活性が認められた。リピッド A 同族体である ONO-4007 は、CPA の抗がん活性を大幅に増大させた。この効果は、ONO-4007 が肺病巣部に存在しているマクロファージの表現形を M1 型に変換したためであると考えられる。

肺がん細胞と抗がん薬、マクロファージの関係を試験管内でも成立するかを調べるために、マウス肺がん細胞由来細胞株 LLC を用いて CPA の効果をマクロフ

ァージ(マウス腹腔マクロファージ由来細胞株 RAW264.7)共存下で研究した。その結果、LLC は M2 マクロファージの存在量を増大させる作用があり、CPA は M1 マクロファージの存在量を増大させた。また、ONO-4007 は CPA のマクロファージ表現形に対する影響を著しく増大させた。

更に、マウス肺において同様の研究を行ったところ、CPA の M1 マクロファージの存在量の増強、これを上回る ONO-4007 の作用などラットでの結果と同様の結果が得られたばかりでなく、ONO-4007 は肺におけるマクロファージの存在量を増大させていることも明らかになった。これらの治験は、肺がんの効果的な治療法を開発するために重要であると考える。

4) 慢性閉塞性肺疾患(COPD)に対するレチノイン酸の影響

肺気腫は COPD に代表される病態である。肺気腫に対して有効な治療薬を探索する目的で、レチノイン酸同族体である Am80 の作用をマウスにおいて検討した。まず、肺気腫モデル動物は、マウスにエステラーゼを経気管内投与して作出した。Am80 は経気管投与によって肺気腫の進行を抑制する作用があることを明らかにした。

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7件)

Keiji Hirota, Tatyana Hristova, Violeta Mitova, Tomoyuki Koda, Masahiro Fushimi, Mika Kuniya, Kimiko Makino, Hiroshi Terada, Romyana Cherkezova, Shin-Ichi Yusa, Neli Koseva, Kolio Troev, Polyphosphoester-based Paclitaxel Complexes: Biological Evaluation, Anticancer Res., 査読有, 36 巻, 2016, 1613-1620

<http://ar.iijournals.org/content/36/4/1613.long>

Tomomi Akita, Michiko Horiguchi, Chihiro Ozawa, Hiroshi Terada, Chikamasa Yamashita,

The Effect of a Retinoic Acid Derivative on Cell-Growth Inhibition in a Pulmonary Carcinoma Cell Line, Biol. Pharm. Bull., 査読有, 39 巻, 2016, 308-312

DOI: 10.1248/bpb.b15-00524

Keishiro Tomoda, Natsumi Yabuki, Hiroshi Terada, Kimiko Makino,

Surfactant Free Preparation of PLGA

Nanoparticles: The Combination of Antisolvent Diffusion with Preferential Salvation,

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 査読有, 457 巻, 2014, 88-93

DOI: 10.1016/j.colsurfa.2014.05.010

Issei Takeuchi, Kenmaro Shimakura, Hideyuk Ohtake, Jun Takayanagi,

Keishiro Tomoda, Takehisa Nakajima, Hiroshi Terada, Kimiko Makino,

Nondestructive Analysis of Structure and Components of Tablet Coated with Film by the Usage of Terahertz

Time-Domain Reflection Spectroscopy, J. Pharmaceutical Sciences, 査読有,

103 巻, 2014, 256-261

DOI: 10.1002/jps.23797

Iyoda T, Takada M, Fukatsu Y, Kumokoshi S, Fujisawa T, Shimada T, Shimokawa N, Matsunaga T, Makino K,

Doi N, Terada H, Fukai F,

A Novel Mechanism Underlying the Basic Defensive Response of Macrophages against Mycobacterium Infection,

Journal of Immunology, 査読有, 192 巻 9 号, 2014, 4254-4262

DOI: 10.4049/jimmunol.1301526

Keiji Hirota, Tadafumi Kawamoto, Hiroshi Terada,

Distribution and Deposition of Respirable PLGA Microspheres in Lung Alveoli.

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 査読有, 105 巻, 2013, 92-97

<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.027>

Keiji Hirota, Yoshinori Nakagawa, Ryota Takeuchi, Yoshihiro Uto, Hitoshi Hori, Shinya Onizuka, Hiroshi Terada,

Antitumor Effect of Degalactosylated Gc-Globulin on Orthotopic Grafted Lung Cancer in Mice,

Anticancer Res., 査読有, 33 巻 7 号, 2013, 2911-2915

<http://ar.iijournals.org/content/33/7/2911.long>

[学会発表](計16件)

木村永実理、竹内一成、寺田弘、牧野公子、マウス用新規経肺投与デバイスの開発と評価、日本薬学会第136年会、2016年3月28日、パシフィコ横浜、横浜

國谷美果、竹内一成、寺田弘、牧野公子

Lipid A 類縁体とアルキル化剤との併用による効果的な肺がん治療、日本薬学会第136年会、2016年3月28日、パシフィコ横浜、横浜

大野智也、廣田慶司、竹内一成、宇都義治、堀均、牧野公子、寺田弘、マクロファージ活性化因子 GcMAF を用いた肺がん治療メカニズムの解析、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜、横浜

伏見雅裕、國谷美果、鈴木里歩、廣田慶司、竹内一成、牧野公子、寺田弘、マクロファージ活性化剤の経肺投与と化学療法剤の併用による効果的な肺がん治療法、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、神戸学院大学、神戸

小澤祐平、松原理恵、竹内一成、堀口道子、山下親正、牧野公子、首藤紘一、寺田弘、エラストラーゼ誘導性肺気腫モデルマウスにおけるレチノイン酸の炎症抑制効果、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 26 日、神戸学院大学、神戸

伏見雅裕、廣田慶司、竹内一成、牧野公子、寺田弘、Effective antitumor activity of inhaled Lipid A Analogue combined with chemotherapeutic agent、Fifth Indo-Japanese International Joint Symposium on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries、2014 年 9 月 16 日、東京理科大学森戸記念館、東京

小棚木彩乃、廣田慶司、竹内一成、牧野公子、寺田弘、Determination of Live Mycobacterium tuberculosis by Quantitative PCR、Fifth Indo-Japanese International Joint Symposium on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries、2014 年 9 月 16 日、東京理科大学森戸記念館、東京

小澤祐平、廣田慶司、竹内一成、牧野公子、堀口道子、山下親正、寺田弘、The effect of Am80 acid on inflammation in elastase-induced emphysema、Fifth Indo-Japanese International Joint Symposium on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries、2014 年 9 月 16 日、東京理科大学森戸記念館、東京

武田 洋平、竹内 一成、寺田 弘、牧野 公子、薬物内包ナノ粒子とイオントフォレスを組み合わせた経皮吸収剤の開発、第 30 回日本 DDS 学会学術集会、2014 年 7 月 30 日 31 日、慶應義塾大学、東京

岩瀧 貴紀、竹内 一成、中島 武尚、寺田弘、牧野 公子、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) を利用した肺がん治療用経肺投与剤の開発、第 30 回日本 DDS 学会学術集会、2014 年 7 月 30 日 31 日 慶應義塾大学、東京

小棚木彩乃、廣田慶司、牧野公子、寺田弘、定量 PCR を用いた結核生菌数測定

法の開発、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 30 日、熊本大学工学部、熊本
柳沼啓太、白井俊太郎、木村俊一、廣田慶司、牧野公子、寺田弘、肺胞マクロファージの微粒子取り込みに対するサイズ効果、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本大学工学部、熊本
Keiji Hirota, Takehisa Nakajima, Keishiro Tomoda, Kimiko Makino, Hiroshi Terada, Anti-tubercular effect of rifampicin-PLGA microspheres insufflated into rat lung infected with BCG, Inhaled Therapies for TB: Second Meeting-Tokyo 2013, 2013 年 10 月 2 日 Tokyo, Morito Hall, TUS, Tokyo
Onoshita T., Fujiwara N., Haga M., Nakajima T., Tomoda K., Hirota K., Terada H., Makino K., The behavior of PLGA microspheres containing rifampicin in alveolar macrophages, Inhaled Therapies for TB: Second Meeting--Tokyo2013, 2013 年 10 月 2 日, Tokyo, Morito Hall, TUS, Tokyo
Keiji Hirota, Yutaka Hirai, Takehisa Nakajima, Kimiko Makino, Hiroshi Terada, A novel device for pulmonary administration of dry powders to small animals based on the Venturi effect, Inhaled Therapies for TB: Second Meeting--Tokyo2013, 2013 年 10 月 2 日, Tokyo, Morito Hall, TUS, Tokyo
Keishiro Tomoda, Takehisa Nakajima, Keiji Hirota, Hiroshi Terada, Kimiko Makino, Pulmonary delivery system for the treatment of TB and lung carcinoma, Inhalation Asia 2013, 2013 年 6 月 26 日, The University of Hong Kong, Hong Knng

〔図書〕(計 4 件)

Keiji Hirota, Keishiro Tomoda, Kimiko Makino, Hiroshi Terada, Springer, Inhalation therapy for pulmonary tuberculosis, Targeted Drug Delivery : Concepts and Design, 2015, 179-195
Keiji Hirota, Hiroshi Terada, Elsevier, Particle-manufacturing technology-based inhalation therapy for pulmonary diseases, Colloid and interface Science in Pharmaceutical Research and Development, 2014, 103-119

牧野公子・廣田慶司・寺田弘、技術情報協会、注射剤・経口剤に代わる新しい薬剤投与デバイスの開発、2014、126-128
廣田慶司、寺田弘、イ・ティ・イ、応用が広がる DDS-人体環境から農業・家電まで、2013、578

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：経肺薬剤投与器具、および経肺薬剤
投与装置

発明者：廣田慶司、寺田弘、牧野公子

権利者：東京理科大学

種類：特許

番号：特願 2014-063807

出願年月日：2014 年 3 月 26 日

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

寺田 弘 (TERADA, Hiroshi)

新潟薬科大学・公立大学の部局等・教授

研究者番号：00035544

(2)研究分担者

牧野 公子 (MAKINO, Kimiko)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：40147509

廣田 慶司 (HIROTA, Keiji)

東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：50516359

(2014 年 3 月 31 日まで)

竹内 一成 (TAKEUCHI, Issei)

東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：10734931

(2014 年 4 月 1 日より)