

平成21年 6月10日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700405
 研究課題名（和文） スクラップアンドビルドに基づく、蛋白質と遺伝子を併用した線維症治療用材料の開発
 研究課題名（英文） Development of Drug Delivery System for Fibrosis Treatment Based on Scrap And Build Mechanism.
 研究代表者
 上田 寛樹 (UEDA HIROKI)
 兵庫医療大学・薬学部・講師
 研究者番号：70432325

研究成果の概要：肺線維症は、不可逆的な肺へのコラーゲン性組織の過形成による肺胞構造の破壊に帰する重篤な呼吸器疾患である。本疾患からの正常組織再構築には、コラーゲン性組織形成の抑制のみならず、組織の線維化の解除が必要であると考えられてきた。そこで、本研究では、2つの異なる薬物キャリア構造を化学結合した、微粒子型、ならびに分子型の複合化薬物キャリアを開発し、コラーゲン性細胞外マトリックスの酵素分解と組織線維化抑制に機能する細胞増殖因子・遺伝子の局所徐放を併用した、新規な線維症治療方法の開発を試みた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	390,000	2,990,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学・再生医工学材料

キーワード：再生医工学材料，薬物伝達システム，線維症，スクラップアンドビルド，肺

1. 研究開始当初の背景

コラーゲンの合成を伴う、線維芽細胞の増殖は、生体中のどこの損傷組織においても修復のため生じる生物学的反応である。しかし、過度のコラーゲン合成が時折生じ、臓器や生体組織の生物学的機能を損なう症状が様々な生体組織において知られ、これらはその特徴から線維症と総称されている。こうした線維症は、肝硬変、腎硬化症、結節性多発動脈炎、肺炎といった多くの疾患に関わっている。これらの中で、特に重篤な肺における線維症は慢性間質性肺炎、ウィルス感染や抗癌剤ゲ

フィニチブやブレオマイシンといった薬物による肺炎、および特発性間質性肺炎などにより引き起こされる。特発性間質性肺炎は原因が明らかでないいくつかの間質性肺炎を総称したものであるが、中でも特発性肺線維症は、徐々にだが不可逆的に進行し、症状発症から5年以内の予後とされる難治性の肺疾患であった。肺胞壁の炎症から線維化の進行により肺胞構造の破壊に至るとされているが、未だに病因の解明は不十分であり、明らかに有効な治療法は開発されていなかった。

肺線維症の根元的病因は未解明であったが、遺伝的背景や現在は未知の何らかの刺激による組織障害が断続的に繰り返され、その後継続する創傷治癒メカニズムが不適切に持続することにより、結果として過度の線維芽細胞の増殖とコラーゲン性細胞外マトリックス産生による組織の線維化を生じ、その組織本来の生体機能の損傷に至るとされていた(Scheme 1)。それ故、線維症の進行には、本来は正常な組織修復に働く、トランスフォーミング増殖因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)や結合織増殖因子(CTGF)を中心とした複数のサイトカインが関与していることが報告されていた。

こうした肺線維症の病状と機序の解明を受け、初期の炎症を抑えるステロイドや抗インターロイキン(IL)-4 抗体や核因子(NF)- κ B アンチセンスオリゴ DNA、線維化の中核となる TGF- $\beta 1$ の作用を抑制するインターフェロン γ やデコリン、肺胞上皮の再生を促す肝細胞増殖因子(HGF)[1]やケラチノサイト増殖因子(KGF)、線維芽細胞の細胞死を誘導するスタチン、細胞外マトリックスの代謝回転を促進するレタキシン投与など、国内及び海外で様々な治療が試みられていた。申請者の所属していた研究室では、コラーゲンを分解するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)蛋白質ならびに MMP 遺伝子プラスミドを収着したゼラチン粒子を用い、腎臓の線維化の解除を試みていた[2]。線維化の進行抑制についても、siRNA を用いた TGF- $\beta 1$ 信号の阻害による腎線維症進行の阻害について報告していた[3]。これらはそれぞれ一定の改善効果を疾患モデル動物や臨床で示しているものの、進行した線維症の正常化にはほど遠く、予後をいくらか延長するに留まっていた。

引用文献

1. S. Oe, Y. Fukunaka, T. Hirose, Y. Yamaoka, Y. Tabata, A trial on regeneration therapy of rat liver cirrhosis by controlled release of hepatocyte growth factor. *Journal of Controlled Release* 88(2), 193-200 (2003).
2. T. Aoyama, S. Yamamoto, A. Kanematsu, O. Ogawa, Y. Tabata, Long delivery of matrix metalloprotease gene prevents the onset of renal sclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Tissue Engineering* 9(6), 1289-99 (2003).
3. T. Kushibiki, N. Nagata-Nakajima, M. Sugai, A. Shimizu, Y. Tabata, Delivery of plasmid DNA expressing small interference RNA for TGF-beta type II

receptor by cationized gelatin to prevent interstitial renal fibrosis. *Journal of Controlled Release* 105(3), 318-31 (2005).

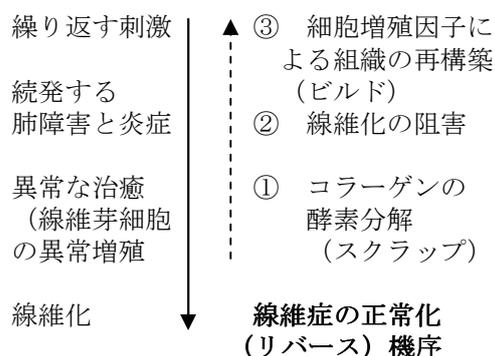
2. 研究の目的

本研究の目的は、コラーゲン性細胞外マトリックスの酵素分解と血管新生・組織線維化抑制・細胞死抑制に機能する細胞増殖因子・遺伝子・薬物の局所徐放・伝達を併用した、新規な線維症治療方法を開発することであった。

これを実現する上で、本研究の独創的着想として、過度に発達したコラーゲン性マトリックスを分解(スクラップ)して組織線維化を解除すると同時に、再線維化を抑制しつつ、本来の生体組織の再構築(ビルト)を促し、正常組織の再生を方向付ける、スクラップアンドビルトのコンセプトを考案した(Scheme 1)。このようなスクラップアンドビルトの各過程を組み合わせた研究・治療の報告はこれまで皆無であった。本研究では、異なる過程に働く複数の因子を複合化するドラッグデリバリーシステム(DDS)を開発することで、スクラップアンドビルト進行を促進させ、線維化した肺からの正常組織再生を試みた。

これを実現するため、まず、複数の異なる因子を複合化できる薬物キャリアの開発を試みた。特に、細胞増殖因子や siRNA などは生体内で速やかに分解されてしまうため、肺組織に到達するまで分解から保護するために DDS は不可欠であると考えられた。また、MMP は正常組織の消化や炎症を誘導する可能性があるため、標的とする部位に作用を限定するためにも、DDS は不可欠であると考えられた。

線維症の進行機序



Scheme 1.

線維症進行機序とスクラップアンドビルトによる正常化機序

3. 研究の方法

(1) 開発した複合体の例を以下に挙げる。線維症で蓄積するのは、タイプ I コラーゲン

なので、線維化の解除にはタイプ I コラーゲン分解酵素である MMP-1 (コラゲナーゼ) の利用を試みた。MMP-1 遺伝子プラスミド DNA を結合し、体内でそこから徐放できるカチオン化ゼラチン微粒子に、HGF の取着を促進する酸性高分子を導入した (Scheme 1. ①+③: スクラップアンドビルトの複合化)。なお、微粒子を肺の広範囲に均一に分散可能とするためには、その粒径は肺胞の直径 (100~200 μm) より十分小さくなければならない。この観点からしても、上述したゼラチン粒子への酸性分子導入は、微粒子の水性環境下での分散安定化のためにも有効であった。次に、スタチンを結合できるポリ乳酸分子に、TGFR siRNA 結合構造であるカチオン化ゼラチン分子を導入した複合体分子を開発した (Scheme 1. ②+③: 再線維化抑制とビルト過程の複合化)。こうした複合材料を用い、肺の気管からのインジェクションで投与可能とするため、これらの分散液を調製した。微粒子からの薬物放出プロフィールおよび薬物の生体内分布は、放射性同位体 (RI) 標識薬物を用い、マウス皮下に投与して測定した。こうして、キャリア分子や薬物結合法の最適化を行った。

(2) 市販の MMP-1 タンパク質による肺線維化組織の酵素分解性を、コラゲナーゼ / リンゲル液内で行った。治療実験には、肺線維症のモデルとして、ブレオマイシン水溶液の気管内投与により間質性肺炎を誘導したラットを作成し、治療実験を行った。無処置群をコントロールにとり、複合化薬剤の使用によって、正常組織の再構築へと方向付けが行われるかを検討した。薬物は前述の通り、経気管的に投与して行った。治療効果は、肺の組織学的評価・コラーゲン定量などによって評価した。

4. 研究成果

(1) カチオン化ゼラチン微粒子の微細化は、まず、ゼラチン水溶液への有機溶媒混合による再沈殿によって試みた。有機溶媒の混合は氷冷攪拌下、徐々に行った。粒子の架橋は、水/有機溶媒混合溶液 (反応溶液) 内へのグルタルアルデヒド添加による化学架橋、あるいは凍結乾燥の後、減圧下での熱脱水架橋反応により行った。得られた微粒子は長辺が 100 μm 以下の不均一なフレーク状であった。また、本粒子は、反応溶液内での分散性が高く、遠心法での精製において収率が非常に低く、乾燥後の再分散も困難であった。

そこで、油中水溶液 (oil-in-water) 懸濁法に変更し、ポリ乳酸を導入し両親媒性を賦与した酸性高分子誘導体を共存させたところ、再分散性のよい、粒径約 6 μm のゼラチン微粒子が調製できた (Figure. 1)。



Figure. 1 両親媒性高分子誘導体 (ポリ乳酸導入ゼラチン) を混合して調製したゼラチン微粒子の再分散実験。図中の黒線は 10 μm 。

ポリ乳酸導入ゼラチン複合型分子への疎水性薬物の内包率は、同様に疎水性のインジゴをモデル薬物として使用し、吸光測定により最適化した。

肺胞組織の細胞の生存性を改善するために、ファスジル酸を徐放するポリ乳酸微粒子の開発も試みた。微粒子は通常の水-in-oil-in-water 懸濁法により調製した。しかし、薬物内包率が約 1 %と低く、ラットの骨再生実験に用いた結果、組織再生や周辺の細胞生着性は改善されず、炎症性を示したため、以下の治療実験には使用できなかった。

(2) 肺線維症モデルの作製は、先ず異なる薬量のブレオマイシンの静脈内投与により試みたが、均一な症状の個体を得ることができなかったため、気管内への溶液投与に変更し、肺線維症モデルラットを得た。

次に、同モデルの肺線維化の解除を試みるため、異なる薬量のコラゲナーゼ溶液を同様に投与した。結果、急性期には炎症による組織の傷害が認められたが、投与後一週間の組織学的観察では部分的なコラーゲンの減少と上皮細胞の脱落が見られた。

MMP-1 遺伝子や TGFR siRNA による治療の可能性を検討するため、初年度に開発した複合型ゼラチン微粒子にレポーター遺伝子を取着させ、経気管的にモデル動物の肺に投与した。また、再生を促すビルド過程の試みとして、肝細胞増殖因子 (HGF)、あるいは血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を取着したゼラチン粒子の投与を行った。結果、線維化に伴った上皮細胞の損傷・炎症などにより、有意な遺伝子の導入、あるいは肺組織の再生は得られなかった。

本研究の結果では、肺組織の線維化のみな

らず、酵素処理や薬剤複合体投与に伴う炎症によって、有意な治療効果が見られなかった。そのため、MMP-1による肺線維化の解除には、より低侵襲な投与法の開発と炎症の制御が不可欠であり、水溶性キャリア分子の開発やビルフェニドンなどの抗炎症剤との複合化がより効果的であると考えられた。また、疾患モデル動物個体間での状態差が大きく、比較が困難であったことから、同一個体内で片側ずつ処置を行い、一方をコントロールに用いることができるよう、手技とモデル系の改良が必要であると考えられた。

(3) 複数の治療過程を複合化するという、本研究のコンセプトが、他の組織の再生において有効であるかを検討した。用いた治療系は、以前より生体組織再生の検討に使用し、実験系として確立してきたラット骨再生モデルである。VEGFとBMP-2をそれぞれ収着した2種類のゼラチン微粒子を複合化した場合、単一因子による治療と比較して有意な組織再生の促進効果を示した。この結果から、治療過程の組み合わせや投与系の最適化が必要ではあるが、複数の治療過程を複合化したDDS薬剤による治療は、他組織の疾患治療にも幅広い応用性があると期待できた。

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3件)

- ① Simon Young, Zarana S. Patel, James D. Kretlow, Matthew B. Murphy, Paschalia M. Mountziaris, L. Scott Baggett, Hiroki Ueda, Yasuhiko Tabata, John A. Jansen, Mark Wong, Antonios G. Mikos, Dose Effect of Dual Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein-2 on Bone Regeneration in a Rat Critical-Size Defect Model. *Tissue Engineering: Part A* Volume 15, Number 00, 該当なし、(2009)、査読有
- ② Zarana S. Patel, Masaya Yamamoto, Hiroki Ueda, Yasuhiko Tabata, Antonios G. Mikos, In vitro and in vivo release of vascular endothelial growth factor from gelatin microparticles and biodegradable composite scaffolds. *Pharmaceutical Research* Vol. 25, No. 10, 2370-2378 (2008)、査読有
- ③ Toshihiko Sato, Hiroyuki Tao, Masato Araki, Hiroki Ueda, Koichi Omori, Tatsuo Nakamura, Replacement of the left main bronchus with a tissue-engineered prosthesis in a canine model. *The Annals of Thoracic*

Surgery 86(2), 422-428 (2008)、査読有

[学会発表] (計1件)

- ① Hiroki UEDA and Yasuhiko TABATA, In Vitro Evaluation of TGF-beta1 Interaction with Collagen Sponges Dehydrothermally Crosslinked. The 9th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems. 2007.12.16-20 Hawaii

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 寛樹 (UEDA HIROKI)
兵庫医療大学・薬学部・講師
研究者番号：70432325