

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07901

研究課題名(和文) 肺胞再生治療薬に適した吸入システムの構築と実用化研究

研究課題名(英文) Study on construction and practical application of inhalation system suitable for alveolar regeneration medicine

研究代表者

山下 親正 (Yamashita, Chikamasa)

東京理科大学・薬学部薬学科・教授

研究者番号：30622188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺胞上皮幹細胞の分化誘導を基盤とした世界初の肺胞再生治療薬を開発することを目的に、新規肺胞再生薬物の作用部位への効率的なデリバリー技術を見出すことを目指した。細胞内環境応答材料を用いた多機能性ナノ粒子ssPalmが効率よく肺胞修復効果を誘導するドラッグキャリアーであり、最適となる製剤粒子径や組成、薬物封入量、薬効を示す最小投与量を明らかにし、臨床応用を目指した吸入剤を作製できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：To develop the drug for alveolar regeneration based on inducing differentiation of alveolar progenitor cells, we aimed to find efficient delivery system of the drug to the site of action. Using the drug carrier ssPalm, the drug for alveolar regeneration showed alveolar repairing effect efficiently. The suitable particle size, enclosed capacity, and the minimum dose of drug were determined. Furthermore, ssPalm, which repaired collapsed alveoli, showed rapidly escaping from an endosome in a cell and we showed the possibility of making inhalations for clinical application.

研究分野：物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 吸入システム 再生医療

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は世界の死亡原因の第3位 (患者数2億人) であるにもかかわらず、破壊された肺胞を修復する有効な根治療法は開発されていない。研究代表者らは、これまでに、ヒト肺胞上皮幹細胞及び COPD モデルマウスにおいて、複数種類の分化誘導剤が肺胞再生候補薬物となり得ることを報告してきた。

本研究では、肺胞上皮幹細胞の分化誘導を基盤とした世界初の肺胞再生治療薬を開発することを目的としており、新規肺胞再生薬物の作用部位への効率的なデリバリー技術を見出すことを目指して検討を進める。

2. 研究の目的

世界初の肺胞再生治療薬を開発するために、ヒト肺胞上皮幹細胞及び COPD モデルマウスを用いて臨床を反映した製剤設計を行うと共に、申請者が見出した新規肺胞再生化合物に適用できる臨床用粉末吸入システムを構築することを目的としている。

- 1) ヒト肺胞上皮幹細胞に効率良く取り込まれるドラッグキャリアーの探索
- 2) 慢性閉塞性肺疾患の病態を考慮したドラッグキャリアーの粒子径と組成の最適化
- 3) 新規肺胞再生化合物の肺がんに対する影響の評価
- 4) 臨床応用を目指した高含量化とマルチドーズ化に対応できる吸入剤の設計

3. 研究の方法

1) ヒト肺胞上皮細胞は肺細胞の表面に存在しているので、肺胞へデリバリーすれば肺胞上皮幹細胞にターゲットできる。そのため、肺胞上皮幹細胞に効率良く取り込まれ、効率的に分化誘導効果を示すドラッグキャリアー組成を見出すことを目的に研究を進めた。既にヒト肺胞上皮幹細胞を用いて、新規に見出した分化誘導剤を膜融合性の高いカチオニックリポソームである Lipofectamine LTX に封入し、*in vitro* で分化誘導効果を検討した結果、未封入の分化誘導剤に比較して効率良く分化誘導効果が得られている。そこで、ドラッグキャリアー組成として、膜融合性脂質とカチオニック脂質の組み合わせを中心に検討を進めた。

2) COPD は肺胞が破壊された状態であり、効率良く肺胞上皮幹細胞に到達させるためには、最適な粒子径及び製剤設計が必要である。エラストーゼ誘導性肺気腫モデルマウスを用いて肺胞修復効果を最大限に引き出すドラッグキャリアーの粒子設計を行った。

3) 見出された最適な処方について、ドラッグ

キャリアーに蛍光色素を封入し、肺胞修復効果を示すためのメカニズムの一部解明を行った。

4) COPD の患者は肺がんを併発していることが比較的多くみられている。見出した候補薬物が肺胞再生治療薬となるためには、肺がんを悪化させないことが必要条件である。ヒト肺がん細胞株である A549 および Calu-6 を用いて、候補薬物の細胞増殖抑制効果および抗腫瘍効果を検討した。

5) 申請者が見出した分化誘導効果を基盤とした新規 COPD 治療候補薬は主に難溶性の低分子薬物であるため、高分子医薬品に適したシステムである申請者が開発した Otsuka Dry Powder Inhalation (ODPI) システムへの適用に基本的には向いていない。そこで、難溶性薬物の ODPI 化手法をまず確立した。更に ODPI システムの問題点として、主薬が数 mg 以上になると、一般的に性能が低下することが挙げられる。申請者が見出した新規肺胞再生治療候補化合物の臨床用量は、動物実験の結果から、数 mg 以上であると想定されるものが多くあり、更に肺胞再生効果を最大限に引き出すためにドラッグキャリアーを用いた場合、全体の処方量も増加する。そこで、高含量でも高性能を有する ODPI 製剤を見出すことを目的に研究を進めた。

4. 研究成果

1) 細胞内環境応答材料を用いた多機能性ナノ粒子 (ssPalm) がエラストーゼ誘導性肺気腫モデルマウスにおいて、フリーの Am80 よりも少ない用量で効率よく肺胞修復効果を誘導するドラッグキャリアーであることを明らかにした。

2) ssPalm ナノ粒子の最適となる製剤粒子径の大きさやキャリアーの最適組成、薬物封入量、薬効を示す最小投与量を明らかにした。X線CTスキャンを用いた機能学的評価および高性能呼吸機能解析装置フレキシベントを用いた呼吸機能評価において Am80 を従来の投与量の4分の1量にまで減量できた。

3) 肺胞修復効果を示すためのメカニズムの一部解明を行った結果、肺胞修復効果がみられた ssPalm ナノ粒子は、エンドソーム脱出能と核内の薬物移行量が高く、これらが薬効発現に重要であることを明らかにすることができた。

4) 新規肺胞再生治療薬の候補の一つであるレチノイン酸誘導体 Am80 において、肺がん細胞に対する増殖抑制効果を示すことを明らかにした。加えて、ヌードマウスに対し肺がん細胞を皮下移植したモデルに対する抗腫瘍効果を明らかにすることができた。

5)ODPI System を難溶性薬物にも適用できるように改良した結果、生理食塩水で調整した ssPalm ナノ粒子を含有する状態でのケーキ形成に成功した。また、幾何学的粒子径評価において肺胞到達効率の高い処方を見出すことができた。

これらの知見は、本研究の目標である肺胞上皮幹細胞の分化誘導を基盤とした世界初の肺胞再生治療薬の開発に著実に貢献していると考えられる。

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 16 件)

1.Shigeo Yamaguchi, Tomoaki Fujii, Yuki Izumi, Yuki Fukumura, Min Han, Hideaki Yamaguchi, Tomomi Akita, Chikamasa Yamashita, Shunsuke Kato, Takao Sekiya. (2018.1) Identification and characterization of a novel adenomatous polyposis coli mutation in adult pancreatoblastoma. *Oncotarget*. 9(12):10818-10827. doi. 10.18632/oncotarget. 24017.(査読有)

2.Sachie Sasaki-Hamada, Taichi Funane, Yusuke Nakao, Rie Sasaki, Mio Nagai, Yudai Ueta, Kazumi Yoshizawa, Michiko Horiguchi, Chikamasa Yamashita, Jun-Ichiro Oka. (2018.1) Intranasal administration of neuromedin U derivatives containing cell-penetrating peptides and a penetration-accelerating sequence induced memory improvements in mice. *Peptides*. 99:241-246. doi. 10.1016/j.peptides.2017.10.010.(査読有)

3.Yuki Fujiwara, Hitoshi Ando, Kentaro Ushijima, Michiko Horiguchi, Chikamasa Yamashita, Akio Fujimura. (2017.8) Dosing-time-dependent effect of rivaroxaban on coagulation activity in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*. 134(4) 234-238. doi.10.1016/j.jphs.2017.08.001(査読有)

4.Hitomi Sakai, Michiko Horiguchi, Tomomi Akita, Chihiro Ozawa, Mai Hirokawa, Yuki Oiso, Harumi Kumagai, Yoshito Takeda, Isao Tachibana, Norikazu Maeda and Chikamasa Yamashita.(2017.6) Effect of 4-[(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-Tetramethyl-2-Naphthalenyl) Carbamoyl]Benzoic Acid (Am80) on Alveolar Regeneration in Adiponectin Deficient-Mice Showing a Chronic Obstructive Pulmonary Disease-Like Pathophysiology. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 361 (3) 501-505. doi.10.1124/jpet.117.240515. (査読有)

5.堀口道子、山下親正 (2017.3) 吸入薬剤による気腫肺再生の試み、分子呼吸器病、21 巻 1 号 19-23. (査読有)

6.Ryo Ohri, Chikamasa Yamashita. (2017.3) Effects of temperature ramp rate during the primary drying process on the properties of amorphous-based lyophilized cake, Part 1: Cake characterization, collapse temperature and drying behavior. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 39:131-139. doi.10.1016/j.jddst. 2017.03.013. (査読有)

7.Sachie Sasaki-Hamada, Ryuji Nakamura, Yusuke Nakao, Toshiki Akimoto, Emi Sanai, Mio Nagai, Michiko Horiguchi, Chikamasa Yamashita, Jun-Ichiro Oka. (2017.1) Antidepressant-like effects exerted by the intranasal administration of a glucagon-like peptide-2 derivative containing cell-penetrating peptides and a penetration-accelerating sequence in mice. *PEPTIDES*, 87:64-70. doi.10.1016/j.peptides. 2016.11.013. (査読有)

8.Yusuke Nakao, Michiko Horiguchi, Ryuji Nakamura, Sachie Sasaki-Hamada, Chihiro Ozawa, Taichi Funane, Ryo Ozawa, Jun-Ichiro Oka, Chikamasa Yamashita. (2016.12) LARETH-25 and β -CD improve central transitivity and central pharmacological effect of the GLP-2 peptide. *International Journal of Pharmaceutics*, 515:37-45. doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.054. (査読有)

9.Tomomi Akita, Ayumi Goto, Azusa Kameyama, Michiko Horiguchi, Chihiro Ozawa, Saki Akaguma, Chikamasa Yamashita. (2016.12) The Differentiation-Inducing Effect of a Retinoic Acid Derivative on a Pulmonary Carcinoma Cell Line. *Journal of Cancer Biology and Therapeutics*, 1:2:144-154. doi.org/10.1248/bpb. b15-00524 (査読有)

10.Ayumi Goto, Tomomi Akita, Shiori Nogami, Michiko Horiguchi, Ryo Abe, Chikamasa Yamashita. (2016.12) CD90-Target Liposomes Increase the Therapeutic Efficacy of a Retinoic Acid Derivative in Pulmonary Carcinoma. *Nano Research & Applications*, 2:2:1-12. doi.10.21767 /2471-9838.100017 (査読有)

11.山下親正 (2016.11) 吸入剤開発における現状と課題、PHARM STAGE、16 巻 8 号 47-53.

12.Michiko Horiguchi, Mai Hirokawa, Kaori Abe, Harumi Kumagai, Chikamasa Yamashita. (2016.5) Pulmonary administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to the lungs induces alveolar regeneration in a mouse model of

chronic obstructive pulmonary disease. Journal of Controlled Release. 233:191-197. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.05.006. (査読有)

13. Chihiro Ozawa, Michiko Horiguchi, Tomomi Akita, Mai Hirokawa, Yusuke Nakao, Kaori Abe, Chikamasa Yamashita. (2016.2) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ Stimulation Induces the Differentiation of Human Alveolar Epithelial Progenitor Cell. Insights in Chest Diseases. 1;2;11,1-6. (査読有)

14. Tomomi Akita, Michiko Horiguchi, Chihiro Ozawa, Hiroshi Terada, Chikamasa Yamashita. (2016.2) The Effect of a Retinoic Acid Derivative on Cell-Growth Inhibition in a Pulmonary Carcinoma Cell Line. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 39:3:308-312. doi: 10.1248/bpb.b15-00524. (査読有)

15. Chihiro Ozawa, Michiko Horiguchi, Tomomi Akita, Yuki Oiso, Kaori Abe, Tomoki Motomura, Chikamasa Yamashita. (2016.2) Pulmonary Administration of GW0742, a High-affinity Peroxisome Proliferator-activated Receptor Agonist, Repairs Collapsed Alveoli in an Elastase-Induced Mouse Model of Emphysema. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 39:5:1-8. doi: 10.1248/bpb.b15-00909. (査読有)

16. Michiko Horiguchi, Yuki Oiso, Hitomi Sakai, Tomoki Motomura, Chikamasa Yamashita. (2015.9) Pulmonary administration of phosphoinositide 3-kinase inhibitor is a curative treatment for chronic obstructive pulmonary disease by alveolar regeneration. Journal of Controlled Release, 213:112-119. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.07.004. (査読有)

〔学会発表〕(計 52 件)

1. 熊谷春海、高桑和也、秋田智后、山下親正、「COPD モデルマウスにおけるレチノイン酸誘導体 Am80 の治療効果および併存症に対する影響」、日本薬学会第 138 年会、石川県立音楽堂他(金沢市)、2018 年 3 月 25 ~ 28 日

2. 金井綾香、藤井純輝、熊谷春海、秋田智后、山下親正、「COPD モデルマウスにおける活性型ビタミン D3 の細胞修復効果の検討」、日本薬学会第 138 年会、石川県立音楽堂他(金沢市)、2018 年 3 月 25 ~ 28 日(優秀発表賞受賞)

3. 長島彰太、加藤大貴、三浦可南子、秋田智后、田中浩揮、秋田英万、山下親正、「COPD 根治治療薬としての Am80 封入 ssPalm ナノ粒子の有用性の検討」、日本薬学会第 138 年会、石川県立音楽堂他(金沢市)、2018 年 3 月 25 ~ 28 日

4. 山下親正、「分化誘導を基盤とした COPD 根治治療薬の開発とその DDS の構築」、東京理科大学・日本医科大学 第 4 回合同シンポジウム(東京理科大学 森戸記念館(東京都新宿区)、2017 年 12 月 9 日

5. 秋田智后、廣川茉衣、阿部香織、小島央子、熊谷晴海、山下親正、「活性型ビタミン D3 の分化誘導を基盤とした慢性閉塞性肺疾患(COPD)に対する新規根治治療薬としての可能性」、東京理科大学・日本医科大学 第 4 回合同シンポジウム(東京理科大学 森戸記念館(東京都新宿区)、2017 年 12 月 9 日

6. 秋田智后、金井綾香、藤井純輝、山下親正、「活性型ビタミン D3 の分化誘導を基盤として慢性閉塞性疾患に対する新規根治治療薬の開発」、第 28 回日本レチノイド研究会学術集会、神戸薬科大学(兵庫県神戸市)、2017 年 11 月 18 日 ~ 11 月 19 日

7. 山下親正、「分化誘導を基盤とした COPD 根治治療薬の開発とその DDS の構築」、GastroPlus TM ユーザーミーティング 2017、品川シーズンテラスカンファレンス(東京都港区)、2017 年 10 月 27 日

8. 山下親正、廣川茉衣、阿部香織、小島央子、熊谷晴海、秋田智后、「活性型ビタミン D3 の分化誘導を基盤とした慢性閉塞性肺疾患(COPD)に対する新規根治治療薬としての可能性」、第 3 回 Neo VitaminD Workshop 学術集会、海運クラブ(東京都千代田区)、2017 年 8 月 25 日 ~ 8 月 26 日

9. 秋田智后、境 仁美、後藤 歩、小澤千尋、亀山あずさ、大磯裕輝、廣川茉衣、野上菜里、堀口道子、山下親正、「分化誘導を基盤として難治性肺疾患の根治的治療法に対する戦略」、医療薬学フォーラム 2017 第 25 回クリニカルファーマシーシンポジウム、鹿児島市民文化ホール他(鹿児島県鹿児島市)、2017 年 7 月 1 日 ~ 7 月 2 日

10. Tomomi Akita, Chikamasa Yamashita. 「Therapeutic strategy for intractable pulmonary disease based on inducing differentiation」、6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC)、Stockholm(stockholmsmässan)、2017 年 5 月 21 日 ~ 5 月 24 日

11. 加藤大貴、大磯裕輝、阿部香織、本村知己、秋田智后、山下親正、「小動物における新規自己吸入経肺投与方法の確立とその有用性評価」、日本薬剤学会 第 32 年会、大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)、2017 年 5 月 11 日 ~ 5 月 13 日

12. 山下親正、「吸入剤試験法に関する三極調

和の現状と課題」、日本薬剤学会経肺経鼻投与製剤 FG 研究会、名古屋城ドーム前キャンパス(名古屋市)、2017年1月20日

13.阿部香織、永井美於、段 孝、山下親正、「COPD根治治療薬としてのPAI-1阻害剤の有効性検討」、第14回東京理科大学薬学部DDS研究センターシンポジウム、東京理科大学森戸記念館(東京都新宿区)、2016年12月26日(RIDAI NG)

14.秋田智后、境仁美、後藤歩、小澤千尋、亀山あずさ、大磯裕輝、廣川茉衣、野上菜里、堀口道子、山下親正、「分化誘導を基盤とした難治性肺疾患の根治的療法に対する戦略」、第10回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、群馬(群馬大学 昭和キャンパス)、2016年11月5日~11月6日

15.本村知己、大磯裕輝、境仁美、堀口道子、山下親正、「ホスホイノシチド3キナーゼ阻害剤の経肺投与による肺胞修復を介した慢性閉塞性肺疾患の根治療法」、第10回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、群馬(群馬大学 昭和キャンパス)、2016年11月5日~11月6日

16.熊谷春海、秋田智后、境 仁美、廣川茉衣、堀口道子、山下親正、「COPDモデルマウスにおけるレチノイン酸誘導体 Am80 の薬物動態の評価および治療効果の検討」、第60回日本薬学会関東支部大会、東京大学本郷キャンパス山王会館(東京都文京区)、2016年9月17日

17.加藤大貴、大磯裕輝、阿部香織、本村知己、堀口道子、山下親正、「小動物における新規自己吸入経肺投与方法の確立とその有用性評価」、第60回日本薬学会関東支部大会、東京大学本郷キャンパス山王会館(東京都文京区)、2016年9月17日

18.多賀洋晃、山下親正、「ヒトの吸入力を反映させた Aerodynamic Particles Sizer を用いた簡便な空気学的粒度分布測定方法の開発」第60回日本薬学会関東支部大会、東京大学本郷キャンパス山王会館(東京都文京区)、2016年9月17日

19.長島彰太、本村知己、大磯裕輝、堀口道子、田中浩揮、秋田英万、原島秀吉、山下親正、「Am80封入多機能ナノ粒子を用いた肺気腫モデルマウスにおける細胞修復効果の検討」、第32回日本DDS学会学術集会、静岡県コンベンションアーツセンター「グランシップ」(静岡県静岡市)、2016年6月30日

20.秋田智后、堀口道子、亀山あずさ、後藤 歩、首藤統一、寺田 弘、山下親正、「レチノイン誘導体による肺がん細胞増殖抑制効果の

検討」、日本薬剤学会 第31年会、長良川国際会議場岐阜都ホテル(岐阜県岐阜市)、2016年5月19日

21.山下親正、「吸入剤・吸入デバイス開発における現状と課題 - 製剤・デバイス設計から非臨床試験や申請まで」、第13回神戸ポートアイランド創薬フォーラム、神戸(神戸臨床研究情報センター)、2016年1月28日~1月28日

22.堀口道子、境仁美、山下親正「肺胞再生治療薬の開発」、日本薬剤学会第30年会、ブリックホール(長崎県長崎市)、2015年5月21日~5月22日

23.大磯裕輝、堀口道子、山下親正「慢性閉塞性肺疾患モデルを用いた ATRA の肺胞修復効果と予防効果の検討」、日本薬剤学会第30年会、ブリックホール(長崎県長崎市)、2015年5月21日~5月22日

〔図書〕(計9件)

1.山下親正、「医薬品添加剤の処方設計と物性評価」(吸入剤の製剤設計における添加剤の山区割り)、シーエムシー出版、234(P37-43)、2016年1月29日

2.山下親正、「粉体・微粒子分析」(凍結乾燥ケーキのマトリックス構造を壊さずに観察できる蒸着方法)、技術情報協会、399(P114-115)、2015年11月30日

〔産業財産権〕

○出願状況(計6件)

1.名称:「Centrally-Acting Peptide Derivative, and Pharmaceutical Composition」
発明者: Chikamasa Yamashita, Jun-Ichiro Oka, Michiko Horiguchi, Sachie Sasaki-Hamada.
権利者: 東京理科大学
種類: 特許
番号: EP 3 190 129 A1
出願年月日: 2017年12月7日
国内外の別: 外国

2.名称:「Centrally-Acting Peptide Derivative, and Pharmaceutical Composition」
発明者: Chikamasa Yamashita, Jun-Ichiro Oka, Michiko Horiguchi, Sachie Sasaki-Hamada.
権利者: 東京理科大学
種類: 特許
番号: US 2017/0253643 A1
出願年月日: 2017年9月7日
国内外の別: 外国

3.名称:「Centrally-Acting Peptide Derivative, and Pharmaceutical Composition」
発明者: 山下親正、岡淳一郎、堀口道子、濱

田幸恵、
権利者：東京理科大学
種類：特許
番号：15/507,403
出願年月日：2017年2月28日
国内外の別：国内

4.名称：「P13 キナーゼ阻害剤を含む医薬組成物、ビタミンD受容体に作用する化合物を含む医薬組成物、凍結乾燥組成物、凍結乾燥組成物の製造方法、及び経肺投与用医薬組成物」

発明者：山下親正、堀口道子
権利者：東京理科大学
種類：特許
番号：2014-553227
出願年月日：2015年9月16日
国内外の別：国内

5.名称：「中枢作用性ペプチド誘導体及び医薬組成物」

発明者：山下親正、岡淳一郎、堀口道子、濱田幸恵
権利者：東京理科大学
種類：特許
番号：JP2015/074962
出願年月日：2015年9月2日
国内外の別：国内

6.名称：「肺胞幹細胞分化誘導剤、医薬組成物及び肺胞幹細胞分化誘導方法」

発明者：山下親正、堀口道子、伊豫田拓也、深井文雄
権利者：東京理科大学
種類：特許
番号：PCT/JP2015/067071
出願年月日：2015年6月12日
国内外の別：国内

取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
山下 親正 (YAMASHITA, Chikamasa)
東京理科大学・薬学部・教授
研究者番号：30622188

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし