

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：30111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19165

研究課題名(和文) 病巣の肺胞構造制御に基づく難治性呼吸器疾患治療DDSの創出

研究課題名(英文) Novel drug delivery systems based on the regulation of alveolar functions for treatment of lung diseases

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺がん及び肺線維症といった難治性呼吸器疾患治療を指向したドラッグデリバリーシステム(DDS)を構築した。肺がん治療を指向したDDSとして、肺がんの発症及び進展に關与する因子を抑制するsiRNAを封入した、肺の腫瘍部位への送達効率に優れた肺投与型ナノ粒子製剤によって肺がんモデルマウスの生存期間を有意に延長した。また、肺線維症に対しては、肺内滞留性を高めた肺投与型リポソーム製剤を用いることで、肺胞内の線維化病巣への効率的な薬物送達を達成した。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer and 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 delivery efficiency after intrapulmonary administration of nanoparticles to mice with metastatic lung tumor and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. The anti-tumor siRNA-containing nanoparticles for intrapulmonary administration had tumor-cell specificity and delivery efficiency effectively silenced the oncogenes in the lung metastasis. Aerosolized PEGylated liposomes were efficiently delivered to fibrotic legions. This study suggests that aerosol-based novel nanoparticles are a new therapeutic strategy.

研究分野：製剤学

キーワード：肺線維症 肺がん 細胞外マトリックス 微粒子製剤 イメージング siRNA 抗線維化薬

1. 研究開始当初の背景

肺がんや肺線維症などの難治性呼吸器疾患では、呼吸困難を伴う場合が多く、QOLを著しく損なうことから有用性に優れた医薬品の開発が急務である。これらの疾患を治療するために、分子標的薬などの薬理研究が盛んに行われているものの、薬効不足や他臓器における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。そのため優れたドラッグデリバリーシステム(DDS)による新規治療法が切望されている。

研究代表者は、これまでに肺線維症発症時には病態進行に伴って肺胞上皮細胞の断裂といった肺胞構造の変化が起こるため、肺投与した薬物が速やかに血液中へ漏出し、肺内滞留性が著しく低下することを明らかにした。一方、近年の研究において、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの存在により、薬物の送達が妨げられる例が報告されている。そのため、肺がんや肺線維症の進行過程において生じる、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、薬物の肺胞深部への分布が妨げられる可能性も考えられた。そこで、これらの疾患治療を指向した DDS として、それぞれの疾患における肺胞構造変化に対応できる微粒子製剤を構築することを着想した。

2. 研究の目的

難治性呼吸器疾患治療において、薬物を肺投与することは、直接的に薬物を病巣へ送達できることに加え、血液を介した全身分布を回避できることから副作用を軽減できるなど、有用性の高い投与方法である。しかしながら、疾患発症時の肺内薬物動態についての報告はほとんどない。そこで本研究では、肺がんおよび肺線維症治療を指向した肺投与型 DDS 製剤の構築を最終的な目標に据え、疾患発症時に薬物を肺投与した際の肺内分布特性について、様々な手法を用いて検討した。さらに、これらの疾患の進行によって生じる肺胞構造変化に対応可能な肺投与型微粒子製剤を構築した。

3. 研究の方法

(1) 病態モデル動物の作成

マウスにマウスメラノーマ B16F10 を静脈内投与し、14-19 日間飼育することで転移性肺がんを誘発した。また、マウスに液体気管内噴霧投与器具 (Liquid MicroSprayer™, Model 1A-1C) 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を誘発した。

(2) 各病態進行時に生じる肺投与型薬物の肺内分布の変化

転移性肺がんモデルマウスに、モデル薬物

としてドキソルビシンを、肺線維症モデルマウスにインドシアニングリーンまたは DiI をそれぞれ肺投与した。投与後、ズーム蛍光顕微鏡 (Axio Zoom V.16, Zeiss) を用いてインドシアニングリーンの肺内分布を可視化した。また、生体内凍結技法により凍結薄切片を作成し、ドキソルビシンおよび DiI の病巣における分布特性を評価した。

(3) 肺投与型ナノ粒子製剤の機能評価

腫瘍増殖および転移を促進する VEGF、c-Myc および MDM2 をコードする遺伝子を標的とする 3 種類の siRNA を 1:1:1 のモル比で混合封入したナノ粒子製剤を調製し、転移性肺がんモデルマウスに肺投与後の抗腫瘍効果を評価した。また、肺内滞留性を付与可能なポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームを調製し、肺線維症モデルマウスにおける肺投与型薬物の肺内動態改善を図った。

4. 研究成果

(1) 肺がん及び肺線維症発症時における肺投与型薬物の肺内分布特性

転移性肺がんモデルマウスにおいて、通常の投与経路である静脈内に投与した場合と比較して、肺投与した場合のドキソルビシン由来の蛍光は腫瘍部位に強く観察されたが、それ以外の部位への分布も認められた (Fig. 1)。

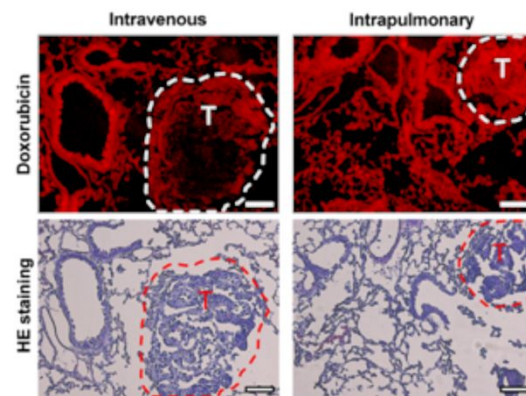


Fig. 1 Doxorubicin distribution in the lung following intrapulmonary and intravenous administration to mice with metastatic lung tumor

The dotted line represents the tumor region (T). Scale bar is 100 μ m.

一方、肺線維症モデルマウスでは、肺投与したインドシアニンググリーンが到達していない箇所が複数認められた (Fig. 2)。さらに、線維病巣を明確にした凍結切片観察において、一部の空胞に DiI が局在し、大部分の線維組織には分布していないことが示された (Fig. 3)。

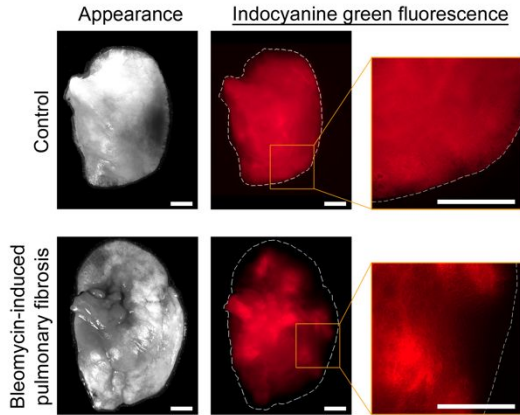


Fig. 2 Indocyanine green distribution in mouse lung with bleomycin-induced pulmonary fibrosis
The Scale bar is 2 mm.

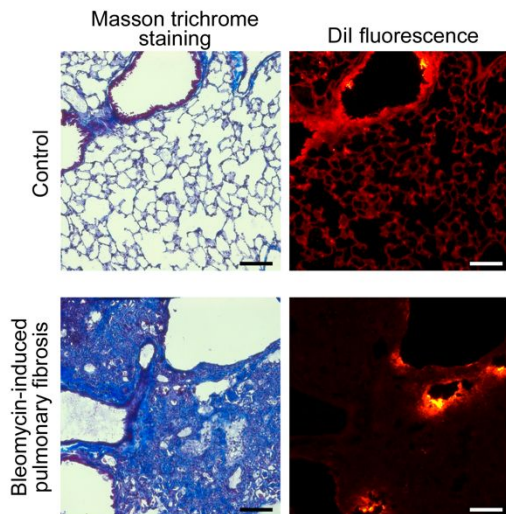


Fig. 3 DiI distribution and Masson trichrome staining of lung tissue sections of mouse with bleomycin-induced pulmonary fibrosis
The scale bar is 200 μ m.

(2) 肺投与型ナノ粒子製剤の有用性

抗腫瘍薬の多くは、腫瘍細胞のみならず他の多くの細胞に対して強い殺細胞作用を示すことから、肺投与すると肺の正常細胞に対する毒性発現の危険性が否定できない。そのため、より良い肺がん治療を行うためには、腫瘍細胞に対して選択的に作用する薬物を、腫瘍部位へ効率良く送達する必要がある。そこで、従来の抗腫瘍薬とは異なり、腫瘍細胞に対して選択的な作用を示すことが期待される siRNA に着目し、肺投与型 siRNA 封入ナノ粒子製剤を構築した。

転移性肺がんモデルマウスに siRNA 封入ナノ粒子製剤を肺投与し、抗腫瘍効果を評価した。ナノ粒子製剤を肺投与した群では、コントロール群と比較して生存期間が有意に延長した (Fig. 4)。一方、ナノ粒子製剤を静脈内投与しても、生存期間の延長は認められなかった。これらの結果から、抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤の肺投与は肺がん治療に有用な肺投与型 DDS であることが示された。

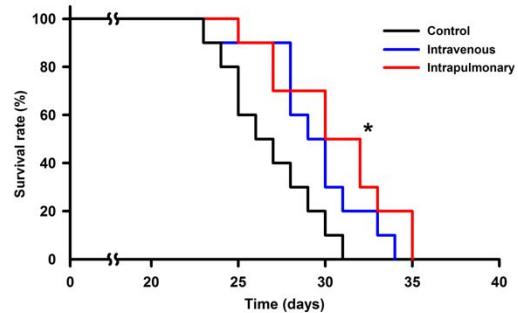


Fig. 4 Survival rate of mice with metastatic lung tumor following intrapulmonary and intravenous administration of nanoparticle formulations containing antitumor siRNA
n = 10. * $p < 0.01$ as compared to control.

一方、肺線維症発症時に肺投与した薬物が一部に局在する問題に対応するために、肺内に長く滞留するリポソーム製剤を構築し、肺投与後の肺内分布を評価した。DiI 標識したリポソーム製剤は、肺線維症の病巣部位においても広く分布することが示された (Fig. 5)。現在、抗線維化薬を封入したリポソーム製剤を調製し、その治療効果に関する検討を進めており、近くその成果を公表できる見込みである。

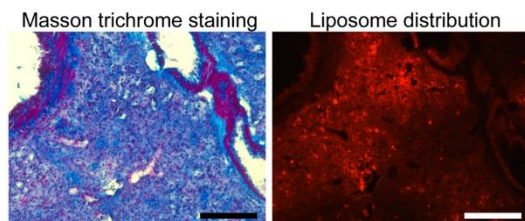


Fig. 5 Liposome distribution and Masson trichrome staining of lung tissue sections of mouse with bleomycin-induced pulmonary fibrosis
The scale bar is 200 μ m.

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計5件)

Togami K, Chono S, Tada H.: Alteration in intrapulmonary pharmacokinetics of aerosolized model compounds due to disruption of the alveolar epithelial barriers following bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *J. Pharm. Sci.*, 105 (3), 1327-1334, 2016. 査読有.
Doi: 10.1016/j.xphs.2015.12.010

Kanehira Y, Togami K, Tada H, Chono S.: Tumor distribution and anti-tumor effect of doxorubicin following intrapulmonary administration to mice with metastatic lung tumor, *J. Drug Deliv. Sci. Tech.*, 33, 143-148, 2016. 査読有.
Doi: 10.1016/j.jddst.2016.04.001

Togami K, Yamaguchi K, Chono S, Tada H.: Evaluation of permeability alteration and epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β_1 in A549, NCI-H441, and Calu-3 cells: development of an *in vitro* model of respiratory epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis, *J. Pharmacol Toxicol Methods*, 86, 19-27, 2017. 査読有.
Doi: 10.1016/j.vascn.2017.02.023

Togami K, Kitayama A, Daisho T, Wang R, Tada H, Chono S.: Tissue-clearing techniques enable three-dimensional visualization of aerosolized model compound and lung structure at the alveolar scale, *Biol. Pharm. Bull.* 41, 24-28, 2018. 査読有.
Doi: 10.1248/bpb.b17-00348

Togami K, Fukuda K, Yamaguchi K, Chono S, Tada H.: Facile and sensitive HPLC-UV method for determination of nintedanib in rat plasma, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 10(6), 133-137, 2018. 査読有.
Doi: 10.22159/ijpps.2018v10i6.25504

〔学会発表〕(計13件)

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した薬物の肺内動態特性、日本薬剤学会第30年会(長崎) 2015.5

Togami K, Tada H, Chono S: Altered intrapulmonary pharmacokinetics of aerosolized drugs due to the disruption of the alveolar epithelial barrier in animals with bleomycin-induced pulmonary fibrosis, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, (Orlando, USA), 2015.10

戸上 紘平、丁野純男、多田均: 肺線維症発症時における肺胞上皮細胞のタイトジャンクション障害に基づく肺投与型薬物の肺内動態変化、日本薬学会第136年会(横浜) 2016.3

兼平幸宗、戸上 紘平、多田均、丁野純男: 転移性肺ガンモデルマウスにおける肺投与したドキシソルピシンの肺組織分布特性及び抗腫瘍効果、日本薬剤学会第31年会(岐阜) 2016.5

齋藤捷宜、大原宏司、戸上 紘平、安齋凜子、佐藤安訓、上野明道、多田均、早坂正孝: 細胞外 ATP と TGF- β_1 が特異性肺線維症にみられる肺線維芽細胞の遊走能に及ぼす影響の検討、第55回日本薬学会東北支部大会(郡山) 2016.9

Togami K, Kitayama A, Tada H, Chono S: Influence of the accumulation of extracellular matrix on the intrapulmonary distribution of aerosolized drugs in mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis, 第31回日本薬物動態学会(松本) 2016.10

山口広太郎、戸上 紘平、多田均、丁野純男: 肺線維症発症時の肺胞上皮細胞の *in vitro* モデル確立のための上皮間葉移行及び薬物透過性の評価、日本薬学会第137年会(仙台) 2017.3

戸上 紘平、北山晏利、大聖貴之、丁野純男、多田均: 肺線維症における肺胞閉塞に伴う肺投与型薬物の肺内動態変化、日本薬学会第137年会(仙台) 2017.3

戸上 紘平、弓田有輝、大聖貴之、王鋭、多田均、丁野純男: 肺線維症発症時における肺胞閉塞に伴う肺投与型薬物の肺内分布の変化、日本薬剤学会第32年会(さいたま) 2017.5

戸上 紘平、丁野純男: DPPC リポソームはインスリン未封入体よりも封入体の経肺吸収を優位に促進する、第33回日本 DDS 学会年会(京都) 2017.7

Togami K, Yumita Y, Daisho T, Kitayama A, Tada H, Chono S: Influence of extracellular matrix in fibrotic lesions on the distribution of aerosolized drugs, Drug discovery and therapy World Congress 2017, (Boston, USA), 2017.7

金澤楓、戸上 紘平、多田均、丁野純男: 肺線維症モデルマウスにおける薬物封入リポソーム肺投与後の肺内滞留性に関する検討、日本薬学会第138年会(金沢) 2018.3

石澤清心、戸上紘平、多田均、丁野純男：
ドラッグデリバリーシステムに用いるナノ
粒子の体内分布特性評価を目的としたマル
チスケールイメージング手法の確立、日本薬
学会第 138 年会（金沢） 2018.3

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