

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：17K08449
研究課題名（和文）肺指向性・長期作用持続型ナノDDS製剤を基盤とした革新的肺線維症治療薬の創出

研究課題名（英文）Development of pulmonary fibrosis drug based on lung-targeting and long-acting nano-DDS

研究代表者
兒玉 幸修（KODAMA, Yukinobu）

長崎大学・病院（医学系）・准教授

研究者番号：50448510
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：肺指向性ナノ微粒子を基盤とした肺線維症治療薬の開発を行った。pDNAとカチオン性高分子、アニオン性高分子の混合比を最適化して自己組織化させることでナノ微粒子を構築できた。ナノ微粒子は肺線維芽細胞で高い遺伝子発現を示した。また、静脈内投与後、肺で選択的に高い遺伝子発現を示した。さらに、このナノ微粒子はsiRNAへも適応することができた。HGFをコードしたpDNAを内包したナノ微粒子を肺線維芽細胞に添加した結果、肺線維芽細胞に取り込まれ、HGFを発現および分泌することが示された。さらに、予備的検討ではあるが、肺線維症モデルマウスに投与した結果、コントロールと比較して生存率が延長する傾向が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、肺に選択的に送達できるナノ微粒子の調製に成功した。このナノ微粒子は肺線維芽細胞に良好に取り込まれ、遺伝子発現することができるため、肺線維症に対する遺伝子・核酸医薬開発へ応用することが可能である。未だに満足いく治療薬がない疾患である肺線維症治療薬に寄与できると考えている。さらに、他の肺疾患にも応用が可能であるため、幅広く医療貢献ができる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed gene and nucleic acid medicines for lung fibrosis based on lung-targeted nanoparticles. Nanoparticles could be constructed by optimizing the mixing ratio of pDNA, cationic polymer, and anionic polymer for self-assembly. Nanoparticles showed high gene expression in lung fibroblasts cell lines. In addition, High gene expression was selectively shown in the lung after intravenous administration, Furthermore, the nanoparticles were also able to adapt to siRNA. As a result of adding nanoparticles containing pDNA encoding HGF to lung fibroblasts, it was shown that they were taken up by lung fibroblasts and express and secrete HGF. Furthermore, although it was a preliminary study, as a result of administration to pulmonary fibrosis model mice, the survival rate tended to be prolonged as compared with the control.

研究分野：医療薬学

キーワード：遺伝子デリバリー 肺線維症 遺伝子・核酸医薬 ナノ粒子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF) は原因が同定できない慢性・進行性の線維化間質性肺炎であり、未だ有効な治療法が確立されていない。平均生存期間は IPF 診断確定後で 2.5 ~ 5 年、急性増悪後は 2 ヶ月以内と非常に予後が悪く、また高確率で肺癌を合併する。患者数は人口 10 万人あたり 20 名程度と推測され、本邦においては IPF を含む特発性間質性肺炎が難病指定されている。

肺線維症の発症機序には、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR)、線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) および血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) などの増殖因子受容体が関与している。2015 年にこれらの受容体を標的としたニテダニブが IPF に対する治療薬として承認されたが、線維化の進行を遅らせる効果はあるものの、線維化の抑制や改善は認められず、また副作用により使用できない患者も多い。そのため、IPF の根治治療を可能にする新規治療薬の開発は喫緊の課題である。

近年、アンチセンス医薬や siRNA などの核酸医薬が次世代の治療薬として注目され開発が進んでいる。核酸医薬は従来の低分子医薬品やバイオ医薬品では標的にできなかった分子を標的可能であり、規格化・品質管理が容易で特異性および効果が高いといった低分子医薬品と抗体医薬品の利点を併せ持つ。そのため、これまで有効な治療薬が存在しなかった難治性疾患に対する有力な治療手段として期待されている。IPF に対しても、線維化に関与する遺伝子が明らかになってきており、核酸医薬で標的遺伝子をノックアウトすることで遺伝子レベルでの病態制御ができ、線維化の抑制および改善が可能となる。特に Transforming Growth Factor (TGF)- 1 や VEGF は主要な因子として報告されている。しかし、遺伝子・核酸医薬は安定性や膜透過性が低く、細胞内へ安全に効率よく導入できる Drug Delivery System (DDS) 開発、とりわけ IPF においては肺選択的な DDS 開発が必須となる。

研究代表者らは、生体適合性の高い成分を静電的に自己組織化させ、臓器特異的に薬物取り込みや遺伝子発現できる画期的なナノ DDS 製剤の開発に成功した。このナノ DDS 製剤は表面が負電荷で細胞毒性や血液凝集を示さず、構成成分の性質により定量的に標的臓器へ医薬品を送達することができる。脾臓指向性ナノ DDS 製剤は、ワクチンへの応用が期待され、実際、メラノーマの増殖および肺転移を抑制した。また、肝臓指向性ナノ DDS 製剤は、インスリンをコードしたプラスミド DNA (pDNA) を用いることで血糖降下作用が観察され、実用的な薬理作用を示すことも証明した。研究代表者らは成分のスクリーニングを継続し、新たに肺指向性ナノ DDS 製剤のプロトタイプを構築することに成功した。さらに、この肺指向性ナノ DDS 製剤は、単回投与で肺において 6 週間もの長期間遺伝子発現が持続することを発見した。予備の実験ではあるが、siRNA を内包した肺指向性ナノ DDS 製剤をメラノーマ肺転移モデルマウスに投与した結果、メラノーマ肺転移において遺伝子抑制効果を示した。このナノ DDS 製剤の構築により、特発性肺線維症に対して選択的な核酸医薬送達が可能になるとともに、少ない投与回数での治療が可能になる。ナノ DDS 製剤はサプリメントや医薬品に使用されている既知成分により構築しているため、生体適合性および安全性が極めて高く、迅速な臨床応用が期待できる。

2. 研究の目的

研究代表者らは、遺伝子・核酸医薬、カチオン性化合物、アニオン性化合物を、調製条件をコントロールすることにより適宜自己組織化させ、肺指向性・長期作用持続型ナノ DDS 製剤のプロトタイプを開発した。本研究では、このナノ DDS 製剤を基盤とし、難治性肺疾患である IPF に対する遺伝子・核酸医薬の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) モデル遺伝子として、ルシフェラーゼをコードした pDNA (pCMV-Luc) を用いた。pDNA とカチオン性高分子 (Dendrigraft poly-L-lysine: DGL)、アニオン性高分子 (γ -polyglutamic acid: γ -PGA) を様々な混合比で自己組織化させることでナノ粒子製剤の構築を試みた。調製したナノ粒子製剤の粒子径や表面電荷などの物理化学的性質を測定し、また、安定性を電気泳動などで調べた。
- (2) マウス肺線維芽細胞を用いて、ナノ粒子製剤の細胞取り込みおよび遺伝子発現を調べた。また、細胞毒性を WST-1 assay によって測定した。
- (3) マウスへ各ナノ粒子製剤を投与した。投与後 24, 48, 72 時間に各臓器を摘出し、組織中のルシフェラーゼ活性を測定した。
- (4) siRNA としてホタルルシフェラーゼの発現を抑制する siRNA (siLuc) を用いた。siLuc と様々なカチオン性高分子、アニオン性高分子を自己組織化させ、siRNA 内包ナノ粒子製剤の構築を試みた。作製したナノ粒子製剤の粒子径や表面電荷などの物理化学的性質を測定し、また、安定性を電気泳動などで調べた。
- (5) ルシフェラーゼを恒常発現した細胞株への取り込みおよび遺伝子発現抑制効果を評価し、製剤のスクリーニングを行った。また、細胞毒性を WST-1 assay により評価した。
- (6) Hepatocyte Growth Factor (HGF) をコードした pDNA (pCpGfree-hHGF) を用いて、ナノ微粒子を調製した。pCpGfree-hHGF 内包ナノ微粒子をマウス線維芽細胞へ添加し、HGF の発現および分泌を評価した。
- (7) プレオマイシンを経肺投与することで肺線維症モデルマウスを作成した。モデルマウスに pCpGfree-hHGF を内包したナノ微粒子を投与した後の生存率を評価した。

4. 研究成果

pDNA とカチオン性高分子、アニオン性高分子を様々な混合比で自己組織化させた結果、ナノサイズの微粒子を構築できる最適な混合比を見出すことができた。調製したナノ微粒子製剤の粒子径と表面電荷をゼータサイザーで測定した結果、粒子径約 100 nm のアニオン性微粒子を形成していることが明らかになった。さらに透過型電子顕微鏡により球状であることが確認できた。電気泳動により安定性を評価した結果、pDNA の放出は認められず、安定に pDNA を内包していることが示された。

pCMV-Luc を用いてナノ微粒子製剤を作製し、*in vitro* における肺線維芽細胞への取り込みおよび遺伝子発現効率を評価した。その結果、naked pCMV-Luc は細胞に取り込まれず、遺伝子発現も示さなかったのに対し、ナノ微粒子製剤は肺線維芽細胞に高効率に取り込まれ、高い遺伝子発現を示した (図 1)。

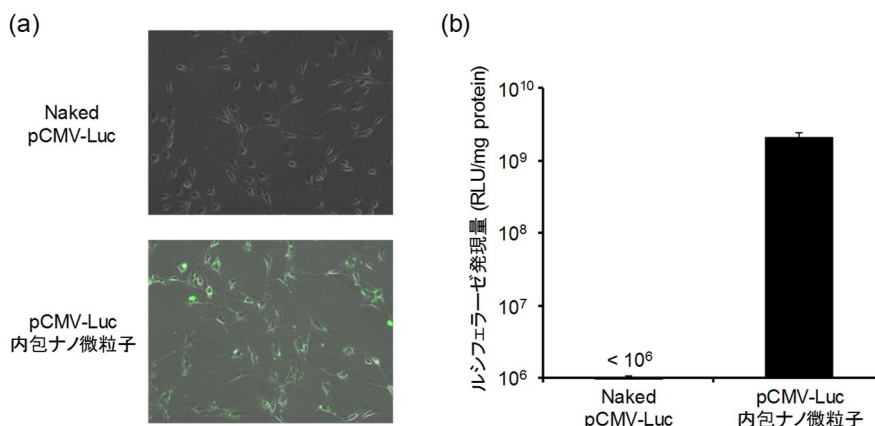


図 1 ナノ微粒子製剤の肺線維芽細胞への取り込み (a) および遺伝子発現 (b)

また、WST-1 assay により細胞毒性を評価した結果、調製したナノ微粒子製剤は一般的なカチオン性ベクターで認められる細胞毒性は示さなかった。そこで、pCMV-Luc を内包したナノ微粒子製剤をマウスへ尾静脈内投与後の、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺における遺伝子発現を測定した結果、肺において選択的に遺伝子発現を示した (図 2)。また、血液毒性を評価した結果、一般的なカチオン性ベクターで認められる血球凝集は起こさなかった。

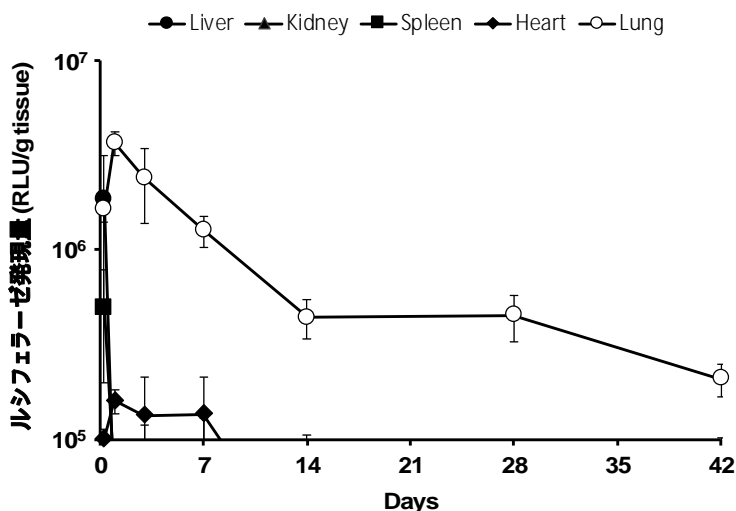


図 2 ナノ微粒子製剤をマウスへ尾静脈内投与後の各臓器における遺伝子発現

次に、このナノ微粒子製剤の small interfering RNA (siRNA) への応用を試みた。pDNA と比較して分子量が小さいため、全く同様の方法では調製ができなかったが、調製条件を整理して siRNA とカチオン性高分子、アニオン性高分子を自己組織化させることでナノサイズの製剤を調製することができた。調製した製剤は粒子径約 100nm のアニオン性微粒子であった。ルシフェラーゼをサイレンシングする siRNA を用いて製剤を調製し、ルシフェラーゼを恒常発現した細胞株における遺伝子発現抑制効果を評価した。その結果、高効率に取り込まれ、高いルシフェラーゼ抑制効果を示す製剤を見出すことに成功した。また、細胞毒性も示さなかった。

pCpGfree-hHGF 内包ナノ微粒子をマウス線維芽細胞へ添加し、HGF の発現および分泌を評価

した。その結果、肺線維芽細胞において、HGF を発現および分泌することが確認された(図3)。また、発現および分泌は投与量および曝露時間に依存する可能性が示唆された。一方、細胞毒性は示さなかった。また、マウスの血液と混合させたが、凝集も引き起こさないことが確認できた。

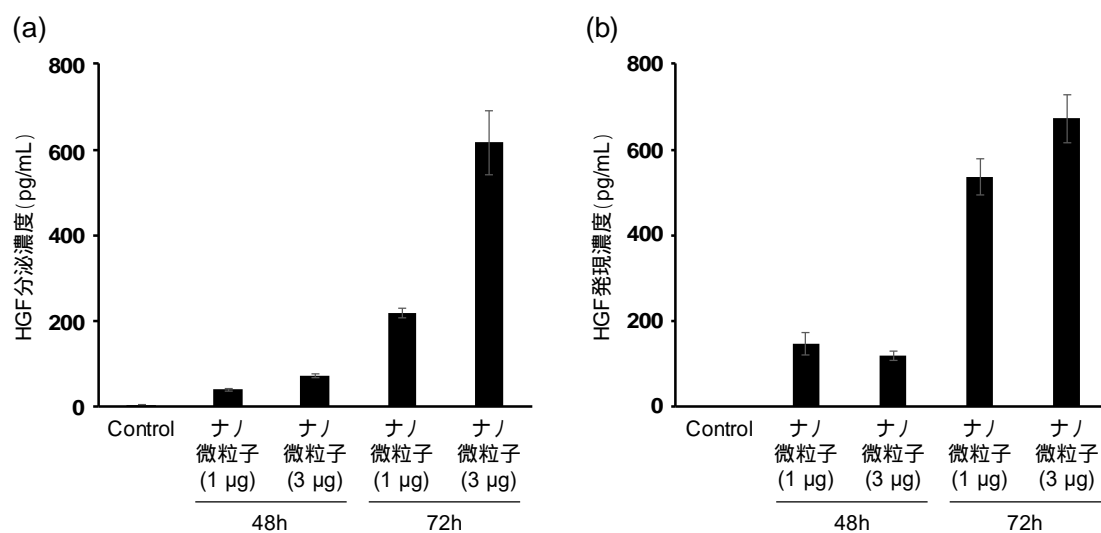


図3 肺線維芽細胞におけるナノ微粒子製剤曝露によるHGF分泌(a)および発現(b)

最後に、肺線維症モデルマウスで薬理効果の検討を行った。肺線維症モデルマウスに糖液(コントロール)あるいはpCpGfree-hHGFを内包したナノ微粒子を投与した結果、pCpGfree-hHGFを内包したナノ微粒子を投与した群で生存率が延長する傾向がみられた。しかし、肺線維症モデルマウスの病態にバラつきがあったため、現在モデルの見直しを行っている。安定したモデルの構築後に再検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kodama Y, Nishigaki W, Nakamura T, Fumoto S, Nishida K, Kurosaki T, Nakagawa H, Kitahara T, Muro T, Sasaki H.	4. 巻 41
2. 論文標題 Splenic Delivery System of pDNA through Complexes Electrostatically Constructed with Protamine and Chondroitin Sulfate.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological & Pharmaceutical Bulletin.	6. 最初と最後の頁 342-349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1248/bpb.b18-00144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kodama Y, Noda R, Sato K, Harasawa H, Kurosaki T, Nakagawa H, Nakamura T, Kitahara T, Muro T, Sasaki H.	4. 巻 41
2. 論文標題 Methotrexate-Coated Complexes of Plasmid DNA and Polyethylenimine for Gene Delivery.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological & Pharmaceutical Bulletin.	6. 最初と最後の頁 1537-1542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1248/bpb.b18-00144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kodama Y, Hanamura H, Muro T, Nakagawa H, Kurosaki T, Nakamura T, Kitahara T, Kawakami S, Nakashima M, Sasaki H.	4. 巻 26
2. 論文標題 Gene delivery system of pDNA using the blood glycoprotein fetuin.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Drug Targeting	6. 最初と最後の頁 604-609
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1080/1061186X.2017.1405425.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 兒玉 幸修
2. 発表標題 生体適合性素材の自己組織化による標的化DDS製剤の開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒崎 友亮、兒玉 幸修、中川 博雄、中村 忠博、大山 要、中嶋 幹郎、川上 茂、佐々木 均
2. 発表標題 静電的相互作用を基盤としたaptamer被膜型遺伝子ベクターの開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸田 由佳理、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均
2. 発表標題 大腸がん腹膜播種に対するMDM2-siRNA複合体の有効性評価
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三枝 由香莉、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均
2. 発表標題 c-Myc-siRNA三重複合体によるメラノーマ増殖抑制に関する基礎的検討
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大倉 真生、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均
2. 発表標題 大腸がん腹膜播種に対するVEGF-siRNAナノ粒子の開発
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田 明莉, 兒玉 幸修, 加藤 由佳, 北原 隆志, 佐々木 均
2. 発表標題 VEGF-siRNA複合体によるメラノーマ肺転移の抑制
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柿木 優希, 佐々木 均, 北原 隆志, 兒玉 幸修
2. 発表標題 生体分解型siRNAベクターの構築と有用性評価
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤 由佳, 兒玉 幸修, 上田 由貴, 北原 隆志, 佐々木 均
2. 発表標題 メラノーマに対する生体分解型VEGF-siRNA複合体の有用性評価
3. 学会等名 日本薬剤学会第32年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 肺指向性薬物送達体	発明者 佐々木 均, 兒玉 幸修, 川上 茂	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-098677	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	川上 茂 (KAWAKAMI Shigeru) (20322307)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授 (17301)	
連携研究者	柳原 克紀 (YANAGIHARA Katsunori) (40315239)	長崎大学・病院(医学系)・教授 (17301)	