

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：30108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06603

研究課題名(和文) 線維組織を足場とする放出制御型ナノ粒子による肺がん及び肺線維症治療システムの創製

研究課題名(英文) Efficient drug delivery to lung tumor and pulmonary fibrotic foci by intrapulmonary administration of the lipid nanoparticles

研究代表者

戸上 紘平 (Togami, Kohei)

北海道科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：20582357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺がん及び肺線維症の治療を目的とした線維病巣への指向性を搭載した吸入型Drug Delivery System (DDS)の構築を目指した。これらの疾患では、病態進行と共に肺胞構造が破壊され、病巣に線維が蓄積する。これが原因となり、従来型の吸入製剤では肺内滞留性及び肺胞深部への送達性が不十分となり、期待する治療効果を得難いことが過去の研究で明らかとなった。そこで本研究では、呼吸器疾患治療を指向した従来の吸入型DDSから、肺がんと肺線維症に特化した、病巣への選択的薬物送達を可能とする治療システムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性呼吸器疾患である肺がん及び肺線維症の治療を指向したDDSを構築することで、現在使用されている治療薬をより安全に、より有効に用いた治療可能性を見出すことができる。また、これまでin vivoで十分な効果が得られなかった治療薬候補化合物の再開発が可能となり、QOLの低い難治性呼吸器疾患の治療ツールとして大変意義深いものである。さらに、呼吸器疾患以外においても細胞外マトリックスなどの線維組織の存在により、薬物の到達不足が問題になる例が散見されている。したがって、線維組織による薬物送達障壁を克服する本研究は、呼吸器疾患のみならず幅広い疾患におけるDDS構築に新概念を提唱することを可能とする。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated the delivery efficiency of the intrapulmonary administration of antitumor small interfering ribonucleic acid (siRNA) and antifibrotic agents-containing nanoparticles to mice with metastatic lung tumor and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Fluorescence-labeled, siRNA-containing nanoparticles and liposomes were administered using Liquid MicroSprayer. Fluorescent signals in the whole lung and in the tumor region following the intrapulmonary administration of the nanoparticles and liposomes were strong and sustained. These systems may be useful for the sustained distribution of anti-tumor siRNAs and anti-fibrotic agents in tumor or fibrotic lungs and the optimization of therapy of respiratory diseases.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：肺がん 肺線維症 吸入型製剤 ドラッグデリバリーシステム リポソーム siRNA 蛍光イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

肺がんは、我が国のがん死亡数の第1位であることに加え、世界的にもがん死亡数の上位であり、最優先で克服すべき疾患である。また、肺線維症は指定難病とされており、希少疾病であることから臨床研究の進展が遅いのが現状である。これらの疾患では、呼吸困難によって QOL を著しく損なうことに加え、高い致死率が大きな問題となっており、有用性に優れた治療法の開発が急務である。

これらの疾患を治療するために、分子標的薬や核酸医薬など様々な化合物の薬理研究が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ずに実用に至らないものが多い。これまでに申請者は、肺内への効率的な薬物送達を可能な吸入型 Drug Delivery System (DDS) 製剤を開発し、肺がん及び肺線維症治療への応用を試みた。どちらの疾患も病態進行に伴って肺胞上皮細胞の断裂が起こるため、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。一方で、病態が進行した肺では、肺の腫瘍増大や線維化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問題点も発覚した。そこで、これらの疾患治療を指向した DDS として、それぞれの疾患に対応可能とする特定の分子を表面修飾した製剤を構築することを着想した。

## 2. 研究の目的

呼吸器疾患治療において、治療薬を直接肺投与することは、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と考えられる。しかしながら、肺がんや肺線維症の治療においては、前述のように線維組織の存在と肺胞上皮細胞の断裂といった肺胞構造の変化が大きな障壁となる。そこで、これらの問題点を克服し、より優れた治療成果を得られる新規吸入型 DDS を構築することを目的とし、病態進行時にも肺内滞留性を確保しつつ線維組織への親和性を搭載した新たな製剤の構築に着手した。

## 3. 研究の方法

### (1) 肺線維症および肺がんモデルマウスの作成

マウスに液体気管内噴霧投与器具 (Liquid MicroSprayer™, Model 1A-1C) を用いて、ブ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。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。なお、肺線維症の発症は、肺凍結切片のマッソントリクローム染色像の観察および肺中ヒドロキシプロリンの定量により行った。肺がんの発症は、肺外観の観察および肺凍結切片の HE 染色像の観察により行った。

### (2) 肺線維症治療を指向した吸入型リポソームの調製

線維化肺に蓄積するコラーゲンに対する親和性、治療薬の封入性及び放出性の観点から適切な脂質組成を決定し、薄膜水和法でリポソームを調製した。肺内滞留性および線維組織への親和性のバランスを、リポソームの表面に修飾するポリエチレングリコール (PEG) 鎖の長さ及び修飾率の調整により決定した。

### (3) 肺がん治療を指向した吸入型脂質ナノ粒子の調製

がん細胞に特異的に発現する  $\sigma$  レセプターのリガンドであるアニスアミドを表面修飾した、siRNA 送達用の脂質ナノ粒子を調製した。siRNA のコアにはヒアルロン酸とプロタミンを、粒子のシェルにはカチオン性脂質を主成分とするリポソームを選択した。

### (4) 肺線維症モデルマウスにおける吸入型リポソームの肺内動態評価

肺線維症モデルマウスにインドシアニングリーンで標識したリポソームを肺投与した。投与後、*In vivo imager* (MIIS, Molecular Device) を用いてリポソームの肺内滞留性および他臓器への分布を評価した。また、6-carboxyfluorescein を封入したリポソームを肺投与し、一定時間経過後に血漿及び肺組織を得た。試料中の 6-carboxy-fluorescein を定量し、内封したモデル薬物の肺内滞留性および血中への移行性を評価した。

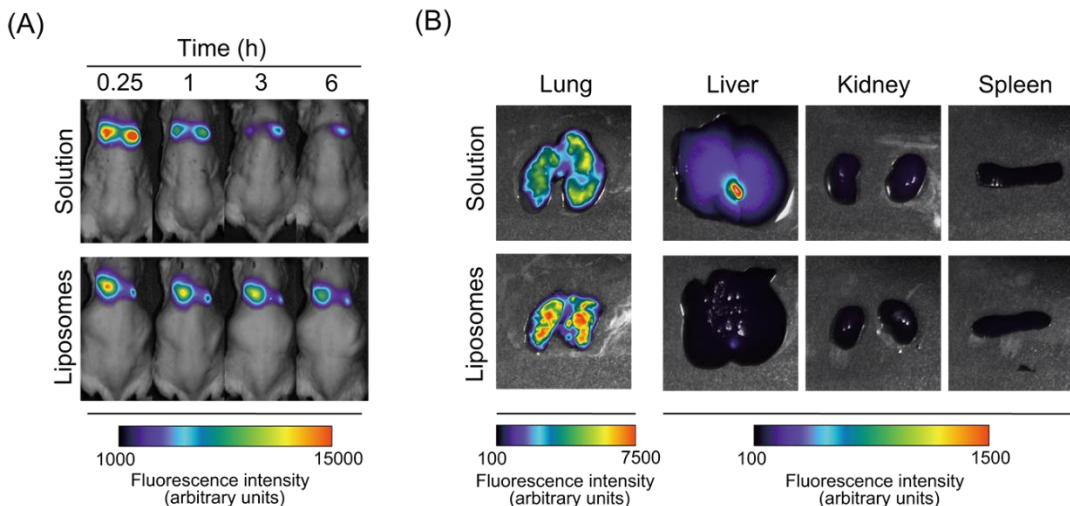
### (5) 肺がんモデルマウスにおける吸入型リポソームの肺内動態評価

肺がんモデルマウスに蛍光標識 siRNA を内封した脂質ナノ粒子を肺投与した。投与後、*In vivo imager* (MIIS, Molecular Device) を用いてリポソームの肺内滞留性を評価した。また、肺凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡で観察することで、肺内分布特性を評価した。

#### 4. 研究成果

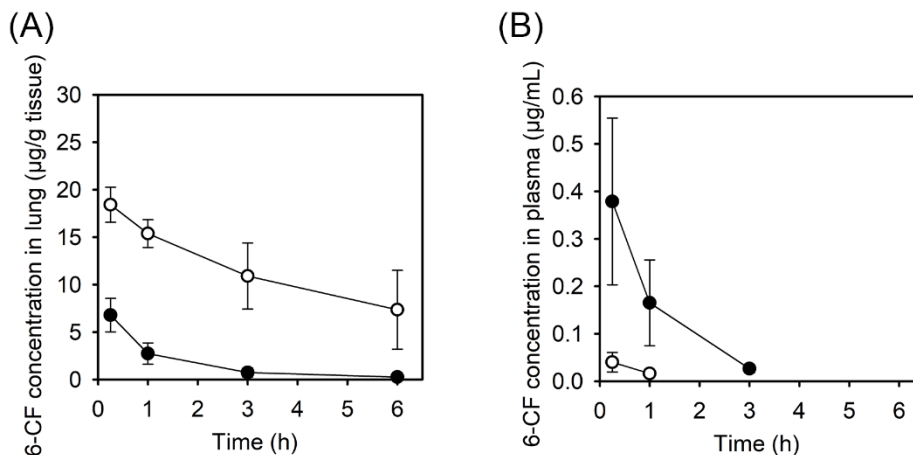
##### (1) 肺線維症モデルマウスにおける吸入型リポソームの肺内滞留性

肺線維症モデルマウスに最適な PEG 修飾を施したリポソームを肺投与し、*in vivo* および *ex vivo* imaging を行った。得られた蛍光画像を Fig. 1 に示す。蛍光プローブであるインドシアニン グリーンの水溶液を肺投与した場合と比較し、最適なりポソーム化を施すことによって高い肺内滞留性が得られた。また、他臓器への分布量を軽減することが可能となった。



**Fig. 1** *In vivo* (A) and *ex vivo* (B) imaging of indocyanine green after the intrapulmonary administration of its liposomal formulation and solution to mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Indocyanine green-encapsulated liposomes and indocyanine green solution were intrapulmonary administered to mice. At each time point after administration, *in vivo* fluorescence images were obtained using a multi-functional *in vivo* Imaging system (MIIS; Molecular Devices). At 6 h after administration, *ex vivo* fluorescence images in the lung, liver, kidney, and spleen were obtained using MIIS.

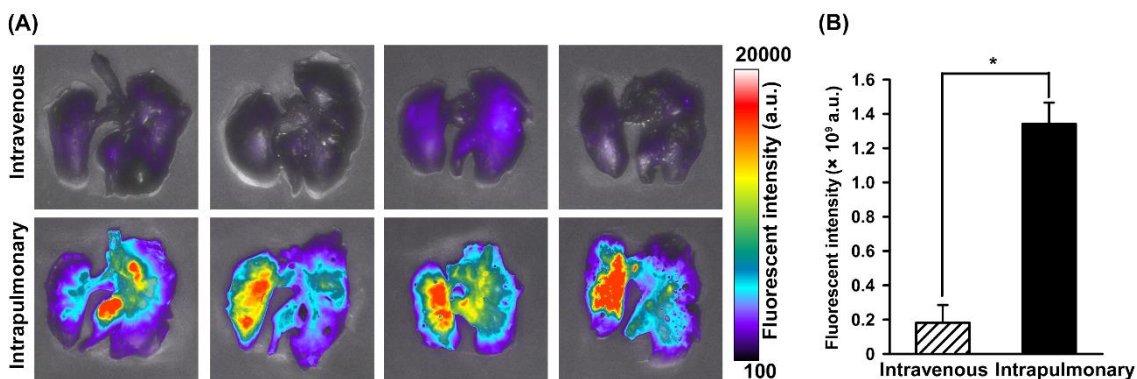
6-carboxyfluorescein 封入リポソームを肺投与後の、肺組織および血漿中 6-carboxyfluorescein 濃度推移を Fig. 2 に示す。6-carboxyfluorescein 水溶液を肺投与した場合と比較して、6-carboxyfluorescein 封入リポソームを肺投与した場合は、肺組織中濃度は高い値で、血漿中濃度は低い値で推移した。以上の結果は、肺線維症発症時においても本研究で調製した PEG 修飾リポソームが高い肺内滞留性を有していることを示している。



**Fig. 2** Time-course of the 6-CF concentrations in the lung tissue (A) and plasma (B) after the intrapulmonary administration of its liposomal formulation and solution to mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. 6-CF-encapsulated liposomes and 6-CF solution were intrapulmonary administered to mice. At each time point after administration, the lungs and plasma were collected, and then, 6-CF concentrations in each sample were determined. ○, liposomal formulation; ●, solution. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (n = 4). \*

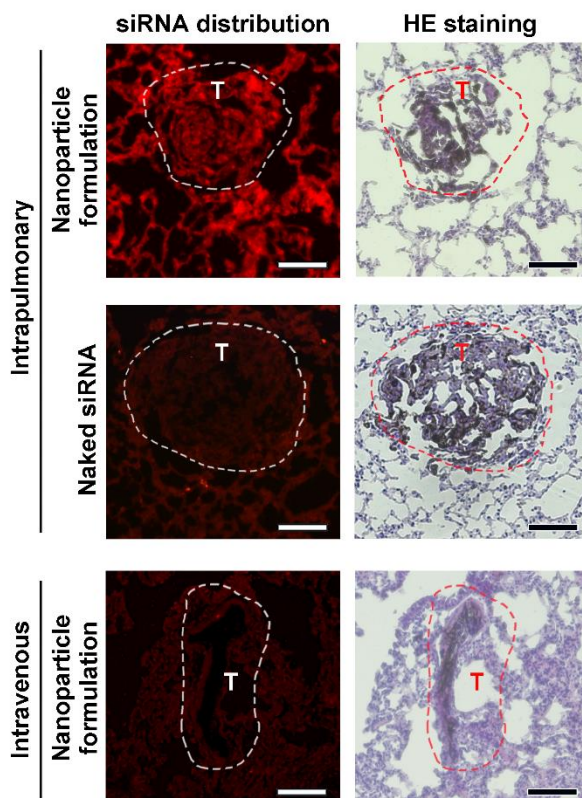
(2) 肺がんモデルマウスにおける吸入型脂質ナノ粒子の siRNA 送達性

肺がんモデルマウスに脂質ナノ粒子を肺投与したときの siRNA の肺内送達能を評価するため、*ex vivo* imaging を行った。Alexa Fluor 750-siRNA 封入ナノ粒子を肺がんモデルマウスに肺投与し、4 時間経過した後の肺の *ex vivo* imaging 像を Fig. 3 に示す。肺投与した場合の siRNA 由来の蛍光は、静脈内投与時に比べて強く検出された。



**Fig. 3** *Ex vivo* imaging of Alexa Fluor 750-siRNA in lungs after intrapulmonary administration to mice with metastatic lung tumor. Nanoparticle formulation containing alexa fluor 750-siRNA was administered intrapulmonarily or intravenously to mice with metastatic B16F10 lung tumor. (A) Fluorescence imaging in the lung using MIIS. (B) The fluorescence intensity in region of interest calculated in the lung using MIIS measurement and display software (Meta Vue ver. 7.10.1 (Molecular Devices)). Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (n = 4). \* $p$  < 0.01.

脂質ナノ粒子の肺投与により肺内の腫瘍部位に siRNA を送達可能か否かを評価するため、生体内凍結技法により得た肺凍結切片の蛍光観察を行った。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 siRNA 由来の蛍光は腫瘍部位に強く観察された。以上の結果は、調製したアニスアミド修飾脂質ナノ粒子の肺投与が、腫瘍細胞への効率的な siRNA 送達を可能とすることを示唆している。



**Fig.4** siRNA distribution in lung sections following intrapulmonary and intravenous administration to mice with metastatic lung tumor. HiLyte Fluor 555-siRNA-containing nanoparticles were intrapulmonarily and intravenously administered to mice with metastatic lung tumor. At 4 h after administration, serial sections were prepared by cryobiopsy. Red fluorescence indicates the distribution of siRNA in lung tissue. The dotted line represents the tumor region (T). Scale bar is 100  $\mu$ m.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kanehira Yukimune, Togami Kohei, Ishizawa Kiyomi, Sato Shingo, Tada Hitoshi, Chono Sumio	4. 巻 24
2. 論文標題 Intratumoral delivery and therapeutic efficacy of nanoparticle-encapsulated anti-tumor siRNA following intrapulmonary administration for potential treatment of lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Development and Technology	6. 最初と最後の頁 1095 ~ 1103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10837450.2019.1633345	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 Togami Kohei	4. 巻 140
2. 論文標題 Intrapulmonary Pharmacokinetics and Drug Distribution Characteristics for the Treatment of Respiratory Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 345 ~ 354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.19-00155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Togami Kohei, Daisho Takayuki, Yumita Yuki, Kitayama Anri, Tada Hitoshi, Chono Sumio	4. 巻 562
2. 論文標題 Evaluation of various tissue-clearing techniques for the three-dimensional visualization of liposome distribution in mouse lungs at the alveolar scale	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 218 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpharm.2019.03.032	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 Togami Kohei, Fukuda Kenta, Yamaguchi Kotaro, Tada Hitoshi, Chono Sumio	4. 巻 10
2. 論文標題 Facile and sensitive HPLC-UV method for determination of nintedanib in rat plasma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science	6. 最初と最後の頁 133-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishizawa Kiyomi, Togami Kohei, Tada Hitoshi, Chono Sumio	4. 巻 46
2. 論文標題 Evaluation of tissue-clearing techniques for intraorgan imaging of distribution of polymeric nanoparticles as drug carriers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Development and Industrial Pharmacy	6. 最初と最後の頁 2061 ~ 2069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03639045.2020.1843476	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 Togami Kohei, Maruta Yuki, Nanbu Mao, Tada Hitoshi, Chono Sumio	4. 巻 46
2. 論文標題 Prolonged distribution of aerosolized PEGylated liposomes in the lungs of mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Development and Industrial Pharmacy	6. 最初と最後の頁 1873 ~ 1880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03639045.2020.1825473	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 Ishizawa Kiyomi, Togami Kohei, Tada Hitoshi, Chono Sumio	4. 巻 109
2. 論文標題 Multiscale Live Imaging Using Förster Resonance Energy Transfer (FRET) for Evaluating the Biological Behavior of Nanoparticles as Drug Carriers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 3608 ~ 3616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2020.08.028	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 Togami Kohei, Ozaki Hiroaki, Yumita Yuki, Kitayama Anri, Tada Hitoshi, Chono Sumio	4. 巻 2020
2. 論文標題 Three-Dimensional Imaging of Pulmonary Fibrotic Foci at the Alveolar Scale Using Tissue-Clearing Treatment with Staining Techniques of Extracellular Matrix	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Biomedical Imaging	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/8815231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Togami Kohei, Yamaguchi Kotaro, Tada Hitoshi, Chono Sumio	4. 巻 75
2. 論文標題 Assessment of transporter-mediated efflux of nintedanib using in vitro cell line models of idiopathic pulmonary fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmazie	6. 最初と最後の頁 371-374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1691/ph.2020.0048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計15件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 戸上紘平, 岩田健嗣, 小笠原安理沙, 入江紗世, 山口広太郎, 多田均, 丁野純男
2. 発表標題 シクロデキストリン複合体化による抗線維化薬ニンテダニブの肺内動態および肺線維症治療効果の改善
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸上紘平, 小笠原安理沙, 入江紗世, 岩田健嗣, 山口広太郎, 多田均, 丁野純男
2. 発表標題 抗線維化薬ニンテダニブ-シクロデキストリン複合体の肺投与による肺内動態および肺線維症治療効果の改善
3. 学会等名 第36回日本DDS学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石澤清心, 戸上紘平, 多田均, 丁野純男
2. 発表標題 Real-time FRET imagingによるドラッグキャリアの体内動態の可視化
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 石澤清心, 戸上紘平, 多田均, 丁野純男
2. 発表標題 ドラッグキャリアの体内動態を可視化するreal-time FRET imaging
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸上 紘平、小笠原 安理沙、入江 紗世、岩田 健嗣、山口 広太郎、多田 均、丁野 純男
2. 発表標題 ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンを用いた抗線維化薬ニテダニブ肺投与の有用性
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kohei Togami, Hirotsugu Ishii, Ryota Abe, Hitoshi Tada, Sumio Chono
2. 発表標題 Efficient delivery to fibrotic regions of liposomes modified with fibroblasts and collagen targeting for treatment in idiopathic pulmonary fibrosis
3. 学会等名 CRS 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyomi Ishizawa, Kohei Togami, Hitoshi Tada, Sumio Chono
2. 発表標題 Multiscale live-imaging using Förster resonance energy transfer to evaluate the distribution of nanoparticles for drug delivery
3. 学会等名 CRS 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 戸上紘平、石井大嗣、阿部亮太、多田均、丁野純男
2. 発表標題 肺線維症治療を指向したリポソームの肺線維芽細胞への集積性およびcollagen Iへの付着性に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyomi Ishizawa, Kohei Togami, Hitoshi Tada, Sumio Chono
2. 発表標題 Multi-scale imaging using Forster resonance energy transfer for evaluating drug carrier distribution
3. 学会等名 AAPS 2018 PHARMSCI 360 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石澤清心、戸上紘平、多田均、丁野純男
2. 発表標題 ドラッグキャリアに用いるナノ粒子と内封薬物の体内分布評価のためのFRET現象を応用したmulti-scale imaging
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 石澤清心、戸上紘平、多田均、丁野純男
2. 発表標題 FRET現象を応用したmulti-scale imagingによるドラッグキャリアと内封薬物の体内分布評価法の確立
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 石澤清心、戸上紘平、多田均、丁野純男
2. 発表標題 FRET現象を応用したmulti-scale imagingによるDDSの機能評価法の確立
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第145例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藏所楓、兼平幸宗、多田均、丁野純男、戸上紘平
2. 発表標題 肺線維症発症時における肺投与型リポソームの肺内滞留性に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第145例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口広太郎、丁野純男、多田均、戸上紘平
2. 発表標題 肺線維症の病巣細胞によるニンテグニブの取り込みに及ぼす排出トランスポーターの影響
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第145例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸上紘平
2. 発表標題 呼吸器疾患治療のための薬物の肺内動態および肺組織分布特性の解明
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第145例会奨励賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------