

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：30111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870654

研究課題名(和文)線溶機能を搭載した経気道投与型DDSを基盤とする肺線維症治療の新発想

研究課題名(英文)New development of pulmonary fibrosis therapy based on pulmonary drug delivery technology with fibrinolysis functions

研究代表者

丁野 純男(Chono, Sumio)

北海道薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90347790

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)：経気道ルートで肺への投与が可能な抗線維化薬ピルフェニドン封入リポソームを調製し、肺線維症の治療を指向したドラッグデリバリーシステムとして有用であるかを検討した。ピルフェニドン封入リポソームを肺線維芽細胞に適用したところ、高効率で細胞内に送達され、かつ優れたコラーゲン産生抑制作用が認められた。本研究の成果は、経気道投与を基盤とするピルフェニドン封入リポソームが肺線維症治療の新戦略となることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Liposomal pirfenidone as a anti-fibrotic drug formulation was designed and prepared, and its efficacy as a pulmonary drug delivery system for treatment of pulmonary fibrosis was evaluated. Liposomal pirfenidone was efficiently delivered to fibroblasts and it inhibited collagen production in fibroblasts. This study suggests that aerosol-based liposomal pirfenidone is a new therapeutic strategy.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：肺線維症 肺線維芽細胞 システム コラーゲン産生 ピルフェニドン bFGF修飾リポソーム 経気道投与型ドラッグデリバリーシ

1. 研究開始当初の背景

肺線維症は、肺線維芽細胞による過剰なコラーゲン産生により発症し、肺組織の線維化をきたす難病指定特定疾患である。慢性かつ進行性の経過をたどり、予後不良であることから、有効かつ安全な優れた治療法の構築が望まれている。本症の治療薬としては、ピルフェニドンが知られており、経口投与と製剤が上市されている。しかし、光線過敏症などの重篤な副作用が高頻度で生じることが大きな問題となっている。これは、経口投与と製剤であるがゆえに、ピルフェニドンが血液を介して全身へ分布するために生じる全身性副作用である。この問題を解決する新発想のドラッグデリバリーシステム (DDS) として、肺に薬物を直接投与できる経気道投与製剤を開発することを着想した。

2. 研究の目的

研究代表者は、以前より肺がんや肺感染症の治療を指向し、経気道投与できるリポソーム製剤の設計・開発に従事している。この技術蓄積を活用し、本研究では、ピルフェニドンをリポソームに封入して線溶機能を搭載した製剤を設計・調製し、肺線維症の治療を指向した経気道投与型 DDS を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 製剤の設計・調製

肺線維芽細胞に発現している basic fibroblast growth factor (bFGF) レセプターに親和性を有する truncated bFGF (tbFGF) を合成した。この tbFGF で表面修飾したピルフェニドン封入リポソームを調製した。なお、取り込み実験の際には、リポソーム蛍光マーカーとして NBD-DPPE を用いた。

(2) 肺線維芽細胞によるピルフェニドン封入 tbFGF 修飾リポソームの取り込み実験

培養ヒト肺線維芽細胞 (WI-38) にピルフェニドン封入 tbFGF 修飾リポソームを適用し、37 °C で各時間培養した。細胞内の NBD-DPPE およびピルフェニドンを定量し、リポソームおよびピルフェニドン取り込み量を算出した。また、共焦点レーザー顕微鏡を用い、適用 4 時間後の細胞を観察した。さらに、取り込み機構解明のため、遊離の tbFGF を用いて、適用 2 時間後の取り込みに対する阻害実験を行った。

(3) ピルフェニドン封入 tbFGF 修飾リポソームの薬効評価実験

WI-38 に TGF- β 1 およびピルフェニドン封入 tbFGF 修飾リポソームを同時適用し、37 °C で 24 時間培養した。培養後、細胞を熱処理

することで細胞中コラーゲンを加水分解した。コラーゲンの加水分解産物であるヒドロキシプロリンを HPLC で定量し、コラーゲン産生抑制効果を評価した。

(4) ピルフェニドン封入 tbFGF 修飾リポソームの副作用評価実験

WI-38 にピルフェニドン封入 tbFGF 修飾リポソームを適用し、37 °C で 24 時間培養した。培養後、WI-38 の細胞数を計測した。

4. 研究成果

(1) ピルフェニドン封入 tbFGF 修飾リポソームの調製

粒子径が 100 nm のピルフェニドン封入 tbFGF 修飾リポソーム (Table 1) を調製し、以下の検討に供した。なお、比較のため、未修飾リポソームも調製した。

Table 1 Pirfenidone incorporated into liposome modified with bFGF

liposome	composition * (mol %)	particle size (nm)
non-modified	2/1/0.1/0	104
tbFGF-modified	2/1/0.06/0.04	110

*EPC/CH/PEG-DSPE/tbFGF-PEG-DSPE

EPC: egg-yolk phosphatidylcholine

CH: cholesterol

PEG-DSPE: *N*-(carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1, 2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

tbFGF-PEG-DSPE: tbFGF-modified PEG-DSPE

(2) 肺線維芽細胞によるピルフェニドン封入 tbFGF 修飾リポソームの取り込み

ピルフェニドン封入 tbFGF 修飾リポソームを WI-38 に適用したときのリポソーム取り込み量は、未修飾リポソームに比べて有意に高い値で推移した (Fig. 1)。共焦点レーザー顕微鏡からもこのことが視覚的に示された (Fig. 2)。

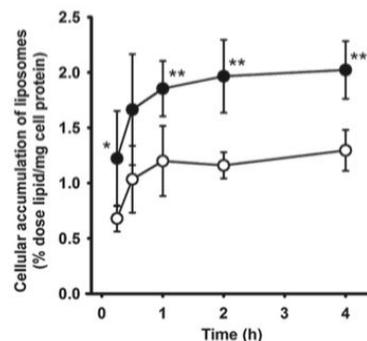


Fig. 1 Time profiles of cellular accumulation of tbFGF-liposome (●) and non-modified liposome (○) in WI-38 cells

Each point represents the mean \pm S.D. ($n=5$).

* $p<0.05$ and ** $p<0.01$: significantly different from non-modified liposome.

また、ピルフェニドン取り込み量も未修飾リポソームおよびピルフェニドン溶液に比べて有意に高い値で推移した (Fig. 3)。

取り込み阻害実験を行ったところ、ピルフェニドン封入 tbFGF 修飾リポソームの WI-38 細胞内取り込みが遊離 tbFGF 共存下で有意に抑制された (Fig. 4)。したがって、ピルフェニドン封入 tbFGF 修飾リポソームは、bFGF レセプターを介して WI-38 細胞内に取り込まれることが強く示唆された。

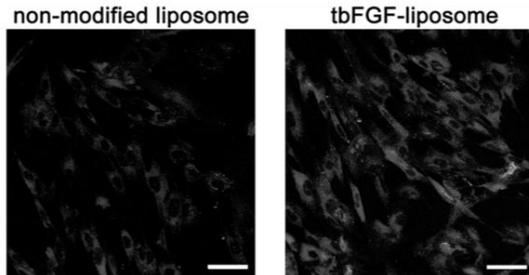


Fig. 2 Confocal microscopy images showing cellular distribution of tbFGF-liposome and non-modified liposome in WI-38 cells

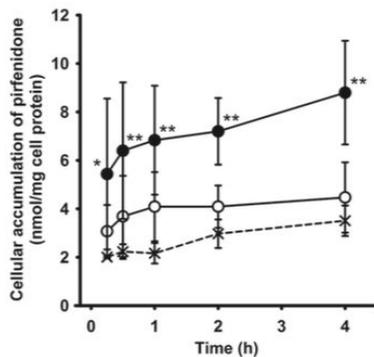


Fig. 3 Time profiles of cellular accumulation of pirfenidone in WI-38 cells

Symbols: tbFGF-liposome (●), non-modified liposome (○), pirfenidone solution (×)
Each point represents the mean ± S.D. (n=5).
* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$: significantly different from pirfenidone solution.

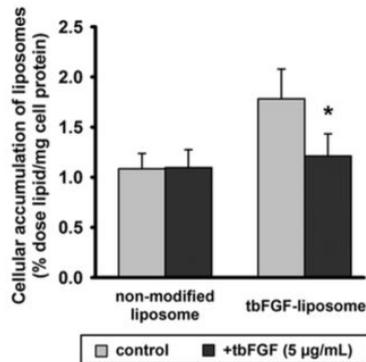


Fig. 4 Effect of bFGF on cellular accumulation of tbFGF-liposome and non-modified liposome in WI-38 cells

Each point represents the mean ± S.D. (n=5).
* $p < 0.05$: significantly different from non-modified liposome.

(3) ピルフェニドン封入 tbFGF 修飾リポソームのコラーゲン産生抑制効果

ピルフェニドン封入 tbFGF 修飾リポソームは、未修飾リポソームおよびピルフェニドン溶液に比べて優れたコラーゲン産生抑制作用を示した (Fig. 5)。

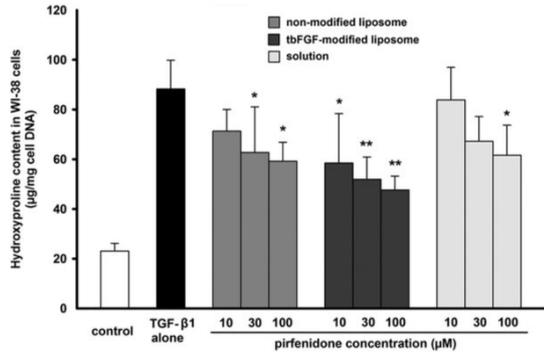


Fig. 5 Effects of pirfenidone incorporated into liposomes on the TGF-β1-stimulated increase in hydroxyproline in WI-38 cells

Each point represents the mean ± S.D. (n=4).
* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$: significantly different from TGF-β1 alone.

(4) tbFGF 修飾リポソームの副作用評価

bFGF は肺線維芽細胞の増殖を促し、病態の進行を促進してしまう可能性がある。しかし、tbFGF 修飾リポソームは、bFGF 溶液適用でみられたような WI-38 増殖作用を示さなかった (Fig. 6)。

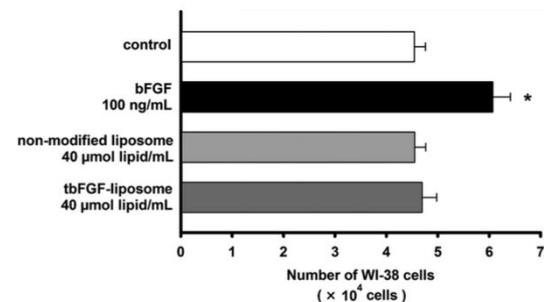


Fig. 6 Effects of tbFGF-liposome on proliferation of WI-38 cells

Each point represents the mean ± S.D. (n=4).
* $p < 0.01$: significantly different from control.

(5) 成果のまとめ

ピルフェニドン封入 tbFGF 修飾リポソームは、肺線維症の治療を指向した経気道投与型 DDS となりうる事が示された。国内外に類似の研究はなく、本研究の学術的意義は大きいと考えている。現在、実験動物を用いた詳細な検討を進めており、近くその成果を公表できる見込みである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

丁野純男: 研究の軸足を「基礎的研究」と「臨床的研究」の双方に置いて～製剤・DDSを「作り」・「活かす」ために～, 製剤機械技術学会誌, 25(3), ページ未定, 2016.
<https://www.seikiken.or.jp/books/kaishi/index.html>

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.
doi: 10.1016/j.xphs.2015.12.010

Togami K, Miyao A, Miyakoshi K, Kanehira Y, Tada H, Chono S: Efficient Delivery to Human Lung Fibroblasts (WI-38) of Pirfenidone Incorporated into Liposomes Modified with Truncated Basic Fibroblast Growth Factor and Its Inhibitory Effect on Collagen Synthesis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Biol. Pharm. Bull.*, 38(2), 270-276, 2015.
doi: 10.1248/bpb.b14-00659

〔学会発表〕(計9件)

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.

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, FL, USA, 2015.10.

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.

戸上紘平, 丁野純男, 多田均: 肺線維症モデル動物における肺投与型薬物の肺内滞留性及び肺胞深部への到達性に関する検討, 日本薬学会第135年会(神戸), 2015.3.

Togami K, Tada H, Chono S: Intrapulmonary pharmacokinetics of aerosolized drugs in animals with bleomycin-induced pulmonary fibrosis, 19th North American ISSX / 29th JSSX Meeting, San Francisco, CA, USA, 2014.10.

戸上紘平, 宮尾亜希, 宮腰恵生, 多田均, 丁野純男: 肺線維症の治療を指向した basic fibroblast growth factor (bFGF) 修飾リポソームの肺線維芽細胞への標的指向化, 第30回日本DDS学会(東京), 2014.7.

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型製剤の肺内動態に関する検討, 日本薬剤学会第29年会(大宮), 2014.5.

戸上紘平, 丁野純男, 多田均: 肺線維症モデル動物における肺投与後の肺内動態に関する検討, 日本薬学会第134年会(熊本), 2014.3.

宮尾亜希, 宮腰恵生, 戸上紘平, 多田均, 丁野純男: 肺線維症の治療を指向した basic fibroblast growth factor (bFGF) 修飾リポソームの肺線維芽細胞への標的指向化に関する研究, 日本薬学会第134年会(熊本), 2014.3.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丁野 純男 (CHONO Sumio)
北海道薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 90347790