

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08455

研究課題名(和文)新規脂質構造体バイセルの医薬への応用

研究課題名(英文)Pharmaceutical application of novel lipid nanocarrier bicelle

研究代表者

板井 茂 (Itai, Shigeru)

静岡県立大学・薬学部・客員教授

研究者番号：80453059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：HSPC/DPPGのリン脂質をロール混合/高圧乳化処理することで、平均粒子径50 nmのナノディスク構造体バイセルが調製できることが分かってきた。本検討では、i) HSPC/DPPG (2/1)の組成比がバイセルを創るうえで重要なこと、ii) その他の薬物(ノビレチンやSN-38)などを内封しても物理化学的安定性の高いナノ粒子が調製できること、iii) さらに薬物単独と比べてバイセルに封入することで、有意な薬理作用の増大を示すことが明らかとなり、医薬用キャリアとして有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、現在までNMR等、構造解析をメインに利用されてきた脂質ナノ構造体バイセルを、今回、医薬用ナノキャリアとして応用しようという初めての試みであった。研究成果として、本バイセルの構造特性の詳細とDDSキャリアとしての有用性を示すことができ、今後本キャリアを用いた画期的な新薬開発に繋がることを期待している。

研究成果の概要(英文)：It has been found that nanodisk structure bicelles with an average particle size of 50 nm can be prepared by roll milling/ high-pressure emulsification of two types of phospholipids (HSPC/DPPG). This study clearly showed that i) the composition ratio of HSPC/DPPG (2/1) was an important factor to prepare bicelles, ii) the bicelles had high physicochemical stability even when other drugs (nobiletin and SN-38) were included, and iii) bicelles encapsulated with these drugs significantly enhanced the pharmacological effects compared with the drug alone. These data suggested that bicelles would be useful as one of pharmaceutical carriers.

研究分野：製剤学

キーワード：バイセル 脂質ナノ粒子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイセルとは、脂質二重膜構造を有するミセルであり、短いアシル鎖をもつ脂質分子がディスクの縁に、長いアシル鎖をもつ脂質分子がディスクの平面に集まることにより自発的に形成されるディスク状の脂質構造体である。これまで、生体内脂質二重膜モデルとして、種々の構造解析に応用されており、特に磁場中で分子が整列することから、脂質二重膜中での生体分子の構造・運動・位相を決定するための NMR 解析に用いられてきた。近年では、バイセル様ナノディスク脂質構造体のディスク形状と粒子径の小ささ (平均粒子径 40 nm) が、密なコラーゲンマトリクス構造をとり、容易な薬物送達ができない線維性腫瘍に効率良く送達されることが初めて報告され、バイセルの drug delivery system (DDS) への応用が期待され始めていた。

さて、代表者らは、近年、hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC)/1,2 - dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG) をロール混合後、ミキサーで粗分散液を調製し、その後、超高压乳化機を用いて溶液を処理することで、平均粒子径 50 nm の脂質ナノ粒子を調製できることを明らかにした。この脂質ナノ粒子は、4 ヶ月以上、冷暗所の条件でその粒子径を維持し続けること、種々の難溶性薬物 (検討物質 10 種以上) の可溶化を可能にすること、一切の薬物の漏出を起こさないこと、さらに、凍結補助剤であるマンニトール等を添加し、凍結乾燥したサンプルにおいて、良好な水への再分散性を示すなど、極めて安定な物理化学的特性を示すが、実際のナノ構造は明らかでなかった。そこで、preliminary な実験として、クライオ透過型電子顕微鏡 (Cryo-TEM) 及び原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた解析を実施したところ、その構造体がナノディスク構造体バイセルである可能性が示唆され (Fig.1)、本粒子の優れた物理化学的特性はこのナノ構造に由来することが推察された。上述したように、現在まで構造解析をメインに用いられてきたバイセルを医薬用キャリアとして応用しようという研究はほとんど行われていない現状を鑑みると、本バイセルの構造特性の詳細を理解し、かつ、DDS キャリアとしての送達能の詳細を評価することで、これまでにない新規ナノキャリア創製、そして画期的な新薬開発・治療戦略に繋がるものと考え、本研究の着想に至った。

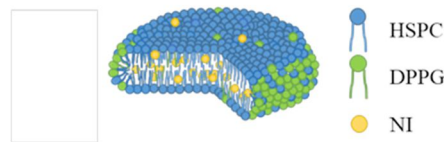


Fig. 1. HSPC/DPPG バイセル粒子の概略図

2. 研究の目的

本研究では、大きく分けて以下の 2 つを明らかにすることを目的とした。

モデル薬物としてニフェジピン (NI) を用いて、HSPC/DPPG 混合比を変化させて脂質ナノ粒子を調製し、Cryo-TEM、AFM を用いてそれぞれのナノ構造を確認し、全ての脂質ナノ粒子がバイセル様構造体であるかどうかを確認する。また、バイセル構造体を確認できた処方において、処方最適化を行う。

モデル薬物を NI から高血糖およびインスリン抵抗性抑制効果を有するポリメトキシフラボノイド・ノビレチンと抗癌剤 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin monohydrate (SN-38) に変更したバイセル (ノビレチンバイセルと SN-38 バイセル) を調製し、実際の抗糖尿病効果及び癌細胞に対する抗腫瘍効果を、他のナノ構造体 (リポソーム) と比較して検討する。また、上記の結果から、安定な物性を示し、かつ、高い薬理効果が得られたバイセルについては、長期保存安定性等、詳細な物理化学的性質評価も行う。

3. 研究の方法

40 mg NI および 1000 mg 脂質混合物 (HSPC/DPPG (10/0, 10/1, 10/2, 10/5, 10/8, 0/10) (mol/mol) をロールミルにて混合後、超高压乳化分散機 Microfluidizer® M110-E/H による処理を 100 回行い NI-脂質ナノ粒子を調製した。また、NI を含まない薬物非含有脂質ナノ粒子も調製した。それぞれの脂質ナノ粒子の粒子径とゼータ電位を Zetasizer (Malvern) により、薬物内封率を HPLC (Shimadzu) で測定した。また、調製後、1, 2, 3 ヶ月間の冷暗所における物性の変化 (粒子径、ゼータ電位、薬物内封率) も測定した。得られたサンプルを Cryo-TEM, AFM で確認し、全ての脂質ナノ粒子がバイセルの構造体であるかどうかを確認した。また、本調製方法 (ロール混合/超高压乳化法) がバイセル構造体を調製しやすいのか、リポソーム調製法で汎用される薄膜静置水和法によりリポソームを調製し、その Cryo-TEM, AFM 画像を比較検討した。上記検討に加え、薬物を NI から他の難溶性薬物 (ibuprofen) に変更し作製したバイセル、また HSPC ではないアルキル鎖が異なる脂質 (DPPC, HSPC, DSPC など)

を用いたバイセルを追加で調製し、薬物や脂質が変わった場合のバイセルの構造特性も検討した。

ノビレチンバイセルと SN-38 バイセル を上述した方法で作製し、種々の物性評価（粒子径、ゼータ電位、薬物内封率）を評価した。ノビレチンバイセルにおいては、各種生体模擬液（模擬胃液として FaSSGF、模擬腸液として FaSSIF 及び FeSSIF）における安定性と、ヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 細胞を用いた膜透過性試験を実施した。SN-38 バイセルにおいては、癌細胞（C26 細胞）を用いて、WST-1 assay により細胞増殖抑制効果を検討した。また、SN-38 バイセルの静注後のマウスにおける基礎的な体内動態と C26 細胞由来担癌マウスに SN-38 単独および SN-38 バイセルを投与し、癌細胞への移行性を評価した。

4. 研究成果

脂質混合物 HSPC/DPPG (10/0) (mol/mol) の粒子は凹凸のあるリポソーム、(10/2)ではディスク状粒子 (0/10) の粒子はミセルと思われる粒子が Cryo-TEM 画像から観察された。また、(10/1) の粒子は (10/0) と (10/2) の中間の形態が観察され、リポソーム、ディスク状粒子及びミセルという3つの異なる構造体が混在することが明らかとなった。さらに、薬物封入の有無で構造に変化が見られないことが確認された (Fig.2)。HSPC/DPPG (10/0) の粒子は NI 濃度が低く、約2週間で凝集物が観察された。また、(0/10) の粒子は調製直後の NI 濃度は高いが、約3週間で粒子から漏出した NI の結晶が観察された。さらに、HSPC/DPPG (10/0) の粒子がリポソームであることを確認するため、Chol を加えて粒子を調製した結果、粒子表面が滑らかになり、リポソームであることを確認された。以上より、脂質混合体の構成比が変わることで得られる構造体は変化するが、そのなかでも従来より我々が調製を行っている標準処方(10/2)により調製した NI-LNs は、最も安定性に優れたナノディスク脂質構造体であることが明らかとなった。

HSPC/DPPG 混合体(10/2)の組成よりノビレチンをバイセルを調製した。調製したサンプルの外観は澄明であり、粒度分布は単峰性、見かけの溶解度は 137.0 ug/mL とノビレチン原末の約8倍に上昇した。ゼータ電位の値から良好な分散安定性を有していること、また大部分のノビレチンが粒子中に存在していることが明らかとなった。Cryo-TEM 画像から、扁平な粒子であることが示唆され、AFM 画像から粒子径が約 50 nm であるのに対し、高さが約 5 nm と小さいことが明らかとなり、ノビレチンを内封してもディスク状構造をとることが考えられた。模擬胃液として FaSSGF、模擬腸液として FaSSIF 及び FeSIF を用い 37 でインキュベートした結果、若干の粒子径の増大が確認されたが、比較的安定に粒子が存在することが、また細胞膜透過性は有意に高い値を示すことが明らかとなった (Fig. 3)。さらに、本バイセルを *in vivo* で投与した際、血糖値降下作用を示すことが明らかとなった。また、SN-38 バイセルにおいても、高い薬物内封率、癌細胞増殖抑制効と癌細胞への *in vivo* への移行性を示した。このように、バイセル粒子を用いることで、薬物単独のものと比較し、有意な薬理活性を示すことが明らかとなった。

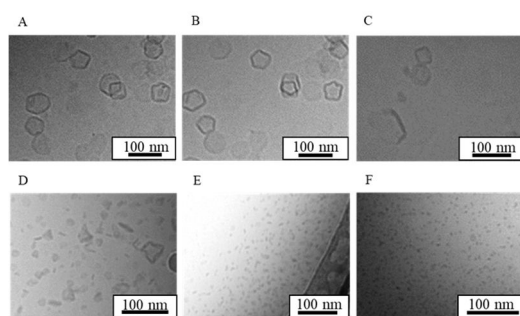


Fig. 2. Cryo-TEM イメージ。

- A-B) NI 封入粒子 (HSPC/DPPG (10/0)),
- C) 薬物未封入粒子 (HSPC/DPPG (10/0)),
- D) NI 封入粒子 (HSPC/DPPG (10/1)),
- E) NI 封入粒子 (HSPC/DPPG (0/10)),
- F) 薬物未封入粒子 (HSPC/DPPG (0/10))

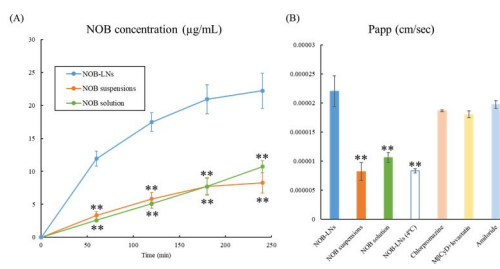


Fig. 3. ノビレチンバイセルは高い細胞内取り込みを示し (A), その取り込みにはクラスリン・カベオラ非依存性脂質ラフトエンドサイトーシスが関与する (B)

CD スペクトルの結果、native CryJ1 において 228 nm 付近にピークが認められ、CryJ1 が α ヘリックス構造を有していることがわかった。その後、2週間、4週間インキュベートした際、その時間依存的にピークは 218 nm へシフトした。これは、CryJ1 が β シート構

以上、本バイセルは優れた物理化学的性質を有すると同時に、種々の薬物を内封し、優れた薬理効果を示すナノキャリアとして、今後益々活用されることが期待される。本研究はその基礎的知見を与える有用な情報になると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuo S, Higashi K, Moribe K, Kimura SI, Itai S, Kondo H, Iwao Y	4. 巻 8
2. 論文標題 Combination of Roll Grinding and High-Pressure Homogenization Can Prepare Stable Bicelles for Drug Delivery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nanomaterials (Basel)	6. 最初と最後の頁 998
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nano8120998	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松尾 聖羅, 岩尾 康範, 東 顕二郎, 森部 久仁一, 金子 雪子, 木村 晋一郎, 近藤啓
2. 発表標題 難溶性薬物Nobiletinの封入脂質ナノ粒子製剤の調製と経口製剤としての有用性の評価
3. 学会等名 製剤機械技術学会第28回大会（大阪）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seira Matsuo, Kenjiro Higashi, Kunikazu Moribe, Yukiko Kaneko, Shin-ichiro Kimura, Shigeru Itai, Yasunori Iwao, Hiromu Kondo
2. 発表標題 Oral formulation development of lipid nanoparticles encapsulated nobiletin, a poorly water-soluble compound
3. 学会等名 6th International Conference on Pharmaceuticals, Nutraceuticals and Cosmetic Science 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾聖羅, 岩尾 康範, 東 顕二郎, 森部 久仁一, 木村 晋一郎, 板井 茂
2. 発表標題 Cryo-TEM及びAFMによる脂質ナノ粒子の構造解析
3. 学会等名 第42年会製剤・創剤セミナー（淡路島）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松尾聖羅, 岩尾 康範, 東 顕二郎, 森部 久仁一, 木村 晋一郎, 板井 茂
2. 発表標題 Cryo-TEM及びAFMによる脂質ナノ粒子の構造解析
3. 学会等名 第34回製剤と粒子設計シンポジウム (小倉)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/pharmeng/result/2018.html 第34回製剤と粒子設計シンポジウム 奨励賞 (カラコン賞) 受賞 http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/pharmeng/images/2017_ryuusisekkei.pdf
--

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
研究分担者	岩尾 康範 (Iwao Yasunori) (30433022)	静岡県立大学・薬学部・客員准教授 (23803)	
研究分担者	東 顕二郎 (Higashi Kenjiro) (40451760)	千葉大学・大学院薬学研究院・准教授 (12501)	
研究分担者	森部 久仁一 (Moribe Kunikazu) (50266350)	千葉大学・大学院薬学研究院・教授 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 啓 (Kondo Hiromu) (10825110)	静岡県立大学・薬学部・教授 (23803)	
研究分担者	木村 晋一郎 (Kimura Shin-ichiro) (20791338)	静岡県立大学・薬学部・助教 (23803)	