

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06753

研究課題名(和文)高性能デコイ微粒子による汎用抗ウイルス剤の開発と粘膜局所製剤への展開

研究課題名(英文) Development of versatile antiviral medicines using advanced decoy particles for topical mucosal formulations

研究代表者

田原 耕平 (Tahara, Kohei)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30454325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々はリポソームや高分子ナノ粒子が、宿主細胞へのウイルス感染を強力に抑制することを見出した。この現象は、微粒子自体が細胞のおとり(デコイ)として働きウイルス感染を制御していることが予想され、画期的な感染症薬物治療につながる。しかしながら、ウイルス感染抑制メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、ヘルペスウイルスやインフルエンザウイルスを用いて、カチオン性を有するリポソームなど生体適合性微粒子が *in vitro* 及び *in vivo* において抗ウイルス効果を示すことを実証した。また、微粒子がウイルス粒子に吸着し、粒子凝集を引き起こすことで抗ウイルス効果を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体適合性微粒子の薬剤応用は、微粒子へ薬物を含有させ、薬物の運び屋として利用する 경우가ほとんどである。薬剤を搭載しない微粒子でウイルス感染を抑制しようとする本研究のコンセプトはこれまでにほとんど報告がなく、抗ウイルス微粒子の可能性を証明すれば創薬の新たなパラダイムとなる可能性がある。ウイルスの分子生物学的な形質の多様性は著しく高い。そのため、個々ウイルスの治療薬が必要となる。抗ウイルス微粒子の場合、感染の初期段階である細胞膜吸着を阻害するため、広域なスペクトルを有する治療薬となる。

研究成果の概要(英文)：We have found that liposomes and polymeric nanoparticles can potently inhibit viral infection of host cells. This phenomenon suggested that the nanoparticles themselves act as decoys for the cells and inhibit viral infection, leading to innovative drug therapeutics for infectious diseases. However, the inhibition mechanism of viral infection was unclear. In this study, we demonstrated that biocompatible nanoparticles such as cationic liposomes exhibited antiviral effects *in vitro* and *in vivo* using herpes and influenza viruses. In addition, it was shown that the nanoparticles adsorbed on the virus particles and caused particle aggregation, thereby exhibiting antiviral effects.

研究分野：製剤学、薬物送達学

キーワード：リポソーム ナノ粒子 ウイルス

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染機構には、宿主特異的な分子システムのほかに、細胞膜への膜吸着や膜融合という共通現象が深く関わっている。よって、細胞膜へのウイルス吸着を制御できれば、理論上多くのウイルスの細胞への感染を抑制することが可能となる。我々はこれまでに、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の薬物微粒子キャリアを経粘膜投与製剤として応用する研究を行い、粘膜付着性微粒子が薬物の生物学的利用能を向上させることを明らかにした。その研究過程において、薬剤未封入のカチオン性リポソームや高分子微粒子がウイルスの宿主細胞への感染を既存の抗ウイルス剤よりも強力に抑制することを発見した。この知見は、薬剤を用いず人工微粒子によりウイルスの宿主細胞への感染を阻害できる可能性を示すもので、抗ウイルス微粒子として新しい創薬コンセプトとなり得る。

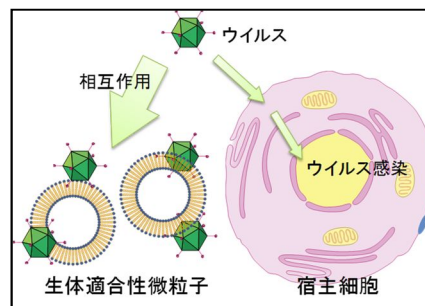


図1 微粒子によるウイルス感染抑制効果の概念図

現在のところ、微粒子にウイルスが吸着して、宿主細胞へのウイルス感染を阻害している(図1)と考察しており、ブロードなウイルスに対応できる薬剤基盤となる可能性を秘めている。しかし、抗ウイルス剤として臨床応用へ展開するには、微粒子の性能の高め、かつメカニズムを明らかにするための物理化学的特性の研究が必要である。

また、人工微粒子を抗ウイルス薬として実製剤化する場合、申請者等が独自に開発した粘膜付着性 DDS の特性を生かした粘膜局所投与が最も効果的である。具体的には、吸入による呼吸器関連ウイルス治療や、点眼による眼感染症治療、腔内投与による性感染症治療などが挙げられる。

2. 研究の目的

生体適合性微粒子によるウイルス感染制御メカニズムを明らかにし、抗ウイルス粘膜局所製剤として応用可能な学術的基盤を構築するために、以下の二点を明らかにする。

- (1) 微粒子の物理化学的性質がウイルス・宿主相互作用にどのように影響するのかを解析し、最も効果的にウイルス感染を制御できる微粒子組成を見出す。
- (2) 粘膜局所微粒子製剤として *in vivo* における抗ウイルス効果を実証し、臨床応用に供する指標を提示する。

3. 研究の方法

(1) 生体適合性ナノ粒子の調製

本研究では生体適合性微粒子としてリポソーム及びポリ乳酸グリコール酸(PLGA)ナノ粒子を使用した。リポソームは薄膜水和法により調製し、エクストルーダー処理を施した粒子径が約100 nm のものを中心に使用した。リポソームに組み込むカチオン性物質として、ステアリルアミンやスペルミンを用いる。PLGA ナノ粒子はエマルション溶媒拡散法により調製し、カチオン性ポリマーのキトサンまたはポリエチレンイミンにより表面修飾を行った。

(2) 培養細胞を用いた微粒子の安全性評価

微粒子を抗ウイルス剤として応用するためには、宿主細胞に対し安全性の高い微粒子を設計することが重要である。ヒト結膜細胞や A549 などの培養細胞を用いて抗ウイルス微粒子の安全性を評価した。

(3) 微粒子による宿主細胞へのウイルス感染阻害・吸着量評価

培養細胞に対して安全な微粒子を用い、宿主細胞へのウイルス感染阻害評価を行う。微粒子の50%ウイルス感染阻害濃度(IC50)を算出し、微粒子及び宿主細胞へのウイルス吸着数をリアルタイムPCRで評価する。モデルウイルスにはバキュロウイルス、HSV-1、インフルエンザウイルスを用いた。

(4) 生体適合性微粒子とウイルスの相互作用評価

生体適合性ナノ粒子とウイルスの相互作用について、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて視覚的に評価を行った。また、生体適合性ナノ粒子とウイルス粒子の粒子径分布を動的光散乱法により評価した。

(5) 粘膜局所微粒子の *in vivo* 抗ウイルス効果

ICR マウスに HSV-1 を点眼することでマウスヘルペス性角膜炎モデルを作製した。カチオン性リポソームをマウスへ点眼し、マウスの生存日数と体重減少を評価した。また、感染後 3 日目と 5 日目の涙液中ウイルス量の測定を行い、角膜の状態と眼周囲の病変のスコア化し評価した。

4. 研究成果

(1) 抗ウイルス作用を有する生体適合性微粒子のスクリーニング

ウイルスとの相互作用に大きく影響すると思われる微粒子物性は、コア組成・サイズ・表面修飾剤である。コア微粒子としてリポソーム及びポリ乳酸グリコール酸 (PLGA) ナノ粒子を使用した。粒子径、コア組成と表面修飾の組合せが異なる抗ウイルス微粒子を網羅的に調製した。次に培養細胞を用いた微粒子の安全性評価を行った。安全性の高い粒子組成を用いて微粒子による宿主細胞へのウイルス感染阻害・吸着量評価を行った。モデルウイルスとしてバキュロウイルス及びヘルペスウイルスを用いた。その結果、ステアリルアミンなどカチオン性化合物を含む微粒子のウイルス感染抑制効果が高いことを明らかにした。

カチオン性リポソームの呼吸器感染症への適用を目指して、インフルエンザウイルスを用いて *in vitro* で評価を行った。ステアリルアミン含有リポソームはヘルペスウイルスと同様にインフルエンザウイルスにおいても、高い抗ウイルス効果を示すことを明らかにした。インフルエンザの場合、正に帯電していないリポソームでも若干ではあるが抗ウイルス効果を示したことから、ウイルス種に応じてリポソーム処方最適化が必要であることが示唆された。

(2) 生体適合性微粒子によるウイルス感染抑制メカニズム評価

バキュロウイルスやヘルペスウイルスに対して抗ウイルス効果を有するナノ粒子を見出すことができ、特に効果が高かったステアリルアミンを含有したカチオン性リポソームに着目して検討を進めた。ヒト結膜細胞や A549 細胞を用いて、安全性が高く最も効率的にウイルス感染を抑制するリポソーム処方を決定した。

カチオン性リポソームとヘルペスウイルスの相互作用を電子顕微鏡ならびに動的光散乱法により評価した。いずれの手法を用いた場合でも、リポソームとヘルペスウイルスを混合することで、粒子凝集が観察されたことから (図 2)、ウイルスのリポソームへの吸着が宿主細胞への感染抑制メカニズムの一つであることが示唆された。

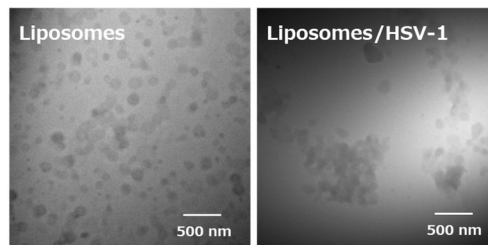


図2 TEM によるリポソームと HSV-1 の相互作用観察

(3) マウスヘルペス性角膜炎モデルを用いた *in vivo* 評価

マウスヘルペス性角膜炎モデルに対して、リポソームを点眼したところ炎症の改善傾向が確認されたことから、*in vivo* においても抗ウイルス効果を示すことを実証した。

(4) 薬剤封入カチオン性リポソームによる相乗的な抗ウイルス効果

カチオン性リポソーム単独でも抗ウイルス効果を示すことが明らかとなったが、より効率的に抗ウイルス効果を示す薬剤設計を行うことを目的として、カチオン性リポソームに既存抗ウイルス薬であるアシクロビルや siRNA を封入することで、相乗的な治療効果を達成することを試みた。アシクロビル及び siRNA を封入したカチオン性リポソームを調製することができた。培養細胞を用いた実験では、siRNA とカチオン性リポソームの相乗的な抗ウイルス効果を確認することができ、現在再現性のチェックを行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tahara Kohei	4. 巻 31
2. 論文標題 Pharmaceutical formulation and manufacturing using particle/powder technology for personalized medicines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Powder Technology	6. 最初と最後の頁 387 ~ 392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.appt.2019.10.031	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 Tahara Kohei, Kobayashi Manami, Yoshida Satoko, Onodera Risako, Inoue Naoki, Takeuchi Hirofumi	4. 巻 543
2. 論文標題 Effects of cationic liposomes with stearylamine against virus infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 311 ~ 317
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpharm.2018.04.001	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 田原耕平、竹内洋文	4. 巻 48
2. 論文標題 生体適合性ナノ粒子を利用した非侵襲的・局所 DDS 製剤の開発	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	6. 最初と最後の頁 735-741
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 無
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0件

〔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
研究 分担者	井上 直樹 (Inoue Naoki) (90183186)	岐阜薬科大学・薬学部・教授 (23701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	竹内 洋文 (Takeuchi Hirofumi) (50171616)	岐阜薬科大学・薬学部・特任教授 (23701)	

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