

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790044

研究課題名(和文) 肺がん治療を目的とした経肺投与ナノ製剤の開発

研究課題名(英文)

Development of inhalable nanoparticle formulation for treatment of lung carcinoma

研究代表者

友田 敬士郎 (TOMODA KEISHIRO)

東京理科大学薬学部 薬学科 助教

研究者番号：70516400

研究成果の概要(和文)：

肺がん治療用経肺投与ナノ粒子製剤の開発を行った。ナノ粒子の肺深部到達性を向上させるため、製剤調製時に賦形剤を添加した。賦形剤としてアミノ酸であるアルギニンとグルタミンを用いた場合、最も肺深部到達性が高くなった。製剤を肺がん細胞に投与したところ、投与量に依存して取込粒子数が増加し、400 nmと比較して100、200 nmのナノ粒子の取込量が高くなった。賦形剤及び粒子径を変化させることで肺内局所到達性を制御できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Inhalable nanoparticle formulation for treatment of lung carcinoma was developed. Excipients were added to enhance flowability of nanoparticles. When arginine and glutamine were applied as excipients, the flowability of nanoparticles reached the highest. When the nanoparticles were administered to lung carcinoma cells, taken-up nanoparticles increased as the applied dose increased. The uptake amount of nanoparticles with the size of 100 and 200 nm became higher than that of 400 nm. From these results, it was indicated that inhalable nanocomposite formulation using appropriate excipients and size of nanoparticle into the formulation has a potential for treatment of lung carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：DDS、ナノテクノロジー、肺がん治療、経肺投与

1. 研究開始当初の背景

(1)肺がん

日本では1980年以降、脳血管疾患を抜いてがんによる死亡が一位となっており、現在は更に増加傾向にある。その中でも特に、肺がんによる死亡が男女共に一位となっている。肺がんは肝臓に次いで5年生存率が低く、

非常に予後の悪いがんである。

肺がんは大きく分けて非小細胞肺がん、小細胞肺がんに分類される。非小細胞肺がんは全肺がんの80～85%を占めており、胸腔内のみ存在するケースで完全切除する以外に根治療法はない。局所再発、遠隔転移が多く見られる。一方小細胞肺がんは全肺がんの15

～20%であり、こちらは増殖率が高いため、化学療法、放射線療法の効果は高いが、化学療法、放射線療法の併用療法を受けた場合でも5年生存率は25%と非常に予後の悪い病気となっている。

(2)現在の肺がん治療法

肺がん治療法は種類・進行度によって異なるが、主に手術療法、放射線療法、化学療法の三種類が単独あるいは複合で適用される。手術療法はやはり人体への侵襲性が大きく、適用できる症例も限られている。放射線療法は非小細胞肺がん、あるいは一部の小細胞肺がんにも適用されるが、腫瘍部位周辺の正常組織への副作用が懸念される。化学療法は点滴静注で投与され、二剤あるいは三剤併用療法が用いられている。しかし投与法が点滴静注なため4時間～24時間持続静注と非常に投与時間が長く、患者への負担が大きい。また、投与された薬物が腫瘍部位で治療濃度に達するのが困難なため、治療効果が低い。さらに静注なので薬剤が全身へ分布するため、骨髄抑制など深刻な副作用が発生しやすいといった点が懸念される。

このように肺がんは非常に予後の悪い病気である上、何れの治療法を用いても治療効果が芳しくないのが現状である。そのため、治療効果を増大させ、副作用を減少させるような新たなシステムの構築が必要となっている。

2. 研究の目的

(1)がん治療を目的としたナノ DDS 製剤

近年では化学療法での治療効果増強、副作用軽減を目的としたナノ DDS 製剤の開発が盛んに行われている。しかし、現在研究がなされているがん治療用ナノ DDS 製剤は基本的に血中投与により血液を介して一度全身に分布し、EPR 効果により腫瘍部位へ集積するという、パッシブターゲティングを元にした製剤である。そのため、血中での製剤安定性や、全身に回ることによる副作用などの問題点が未だ大きく残っている。

(2)肺がん治療を目的とした経肺投与ナノ DDS 製剤

上述のような課題点に対し、我々は抗がん剤を内包させたナノコンポジット製剤を開発した。肺胞に到達可能な粒子径は1～5 μm であり、特に2～3 μm が最も効率よく到達すると言われている。このナノコンポジット製剤は粉末状態で直径 2-3 μm の大きさを持つ薬物内包ナノ粒子と賦形剤の複合体となっており、肺深部へ効率良く到達することが可能である。また、肺深部到達後ではサーファクタント層で粒子は濡れることにより賦形剤が溶解し、複合体が開裂して薬物内包ナノ

粒子に再分散する。ナノサイズの粒子だと気管支粘膜及び肺胞マクロファージによるクリアランスを回避でき、さらに腫瘍上皮細胞にも取り込まれることが可能である(図1)。

これまでの研究で我々はこのナノコンポジット製剤の調製法を確立した(PCT/JP2006/055388)。また、抗がん剤であるTAS-103(トポイソメラーゼ I、II 共阻害薬)をポリ(乳酸・グリコール酸)共重合体(PLGA)ナノ粒子に含有させ、賦形剤としてトレハロースを添加してナノコンポジット製剤化し、SDラットへ経肺投与を行うことで肺内薬物濃度を飛躍的に上昇させた。さらにナノコンポジット製剤化した状態でヒト肺腺がん細胞(A549細胞)に投与すると、原末を培地に溶解させて投与した場合と比較してIC₅₀値を3倍以上に低下させた(製剤:10 nM、原末:30 nM以上)。本研究ではさらにこのナノコンポジット製剤の肺内への到達性を向上させるため、賦形剤が与える製剤物性への影響について検討した。また、製剤が肺内へ到達した後を想定し、粒子物性が肺がん細胞内取込量に与える影響についても検討した。

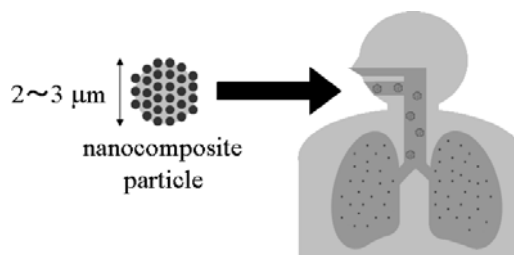


図1 ナノコンポジット製剤概念図

3. 研究の方法

(1)ナノコンポジット製剤の肺深部到達性向上検討

モデル薬物としてリファンピシンを含有させた平均粒子径100、200、400 nmのPLGAナノ粒子をエマルション-液中乾燥法で調製し、その後スプレードライを行うことでナノコンポジット製剤を作成した。ナノ粒子調製時に分散安定剤としてアルギニン(Arg)を用い、従来から用いられていたポリビニルアルコール(PVA)で作成した製剤との比較を行った。比較には人工肺モデルであるアンダーセンカスケードインパクターに、吸入デバイスであるジェットヘラーを接続した装置を用いた。経肺投与製剤特性として、ジェットヘラー内に充填したナノコンポジット製剤量に対する、カスケードインパクター内測定部分到達量の割合(ED値)と、吸入デバイスに充填した製剤量に対する製剤肺深部到達性(FPF値)を評価した。また、スプレードライ時に賦形剤としてトレハロース(Tre)、バリン(Val)、トレオニン(Thr)、グルタミン(Gln)を添加し、これら賦形剤の添加が与えるナノ

コンポジット製剤の ED 値、FPF 値への影響についても検討した。

(2) ナノ粒子径が与える肺がん細胞取込量への影響検討

蛍光標識としてクマリン 6 を含有させた平均粒子径 100、200、400 nm の PLGA ナノ粒子を調製し、ヒト肺腺がん細胞株である A549 細胞に投与した。細胞一つ当たりに対する投与ナノ粒子個数を変化させて投与した(100 nm では 3,000~1,500,000、200 nm では 3,000~500,000、400 nm では 3,000~50,000 個)。ナノ粒子を投与後、37°C あるいは 4°C でインキュベーションし、細胞内からクマリン 6 を抽出して定量を行うことでナノ粒子取込量を算出した。

4. 研究成果

(1) 分散安定剤として PVA を用いた場合は ED 値 96%、FPF 値 15% であったが、Arg を分散安定剤として用いた場合は ED 値 48.5%、FPF 値 5.5% と低下した。一方、スプレードライ時に賦形剤を加えて製剤を調製したところ、Val 以外の賦形剤でのナノコンポジット粒子調製が可能であった。ED 値も向上し(Tre: 80.78 ± 5.96%、Gln: 84.29 ± 8.17%、Thr: 79.57 ± 12.35%)、FPF 値は Gln を用いた時に最高値を示した(Tre: 19.03 ± 6.02%、Gln: 25.01 ± 4.75%、Thr: 18.00 ± 1.97%、図 2)。

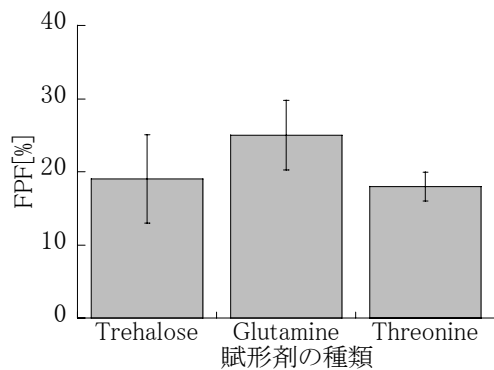


図 2 賦形剤の種類が与える FPF 値への影響

(2) 100、200、400 nm のナノ粒子全て投与量依存的に取込量は増加した(図 3.1-3)。

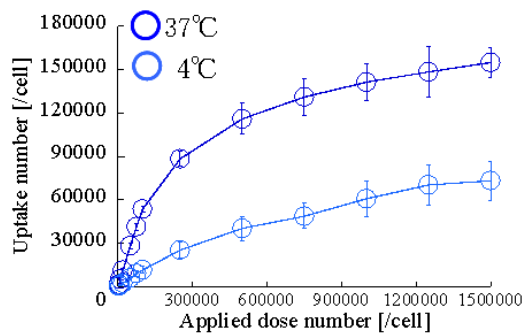


図 3.1 ナノ粒子投与数と細胞内取込数の関係 (粒子径:100 nm)

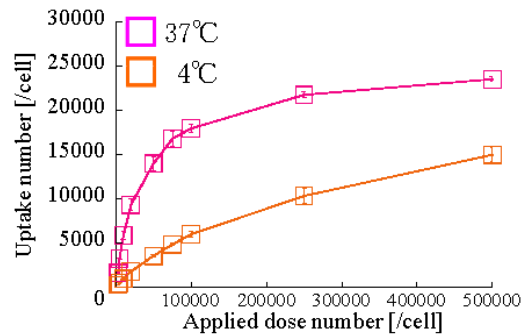


図 3.2 ナノ粒子投与数と細胞内取込数の関係 (粒子径:200 nm)

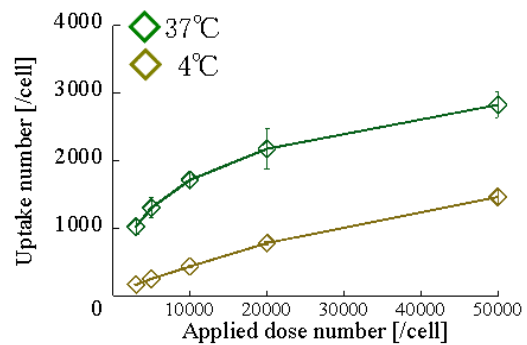


図 3.3 ナノ粒子投与数と細胞内取込数の関係 (粒子径:400 nm)

また、37°C でインキュベーションを行った場合の取込量から 4°C での取込量を減じたところ、各粒子径でエネルギー依存性飽和取込量が存在することが確認され、100 nm では約 80,000 個/細胞、200 nm では約 14,000 個/細胞、400 nm では約 1,300 個/細胞がエネルギー依存性の飽和取込量であることが示された(図 4.1-3)。

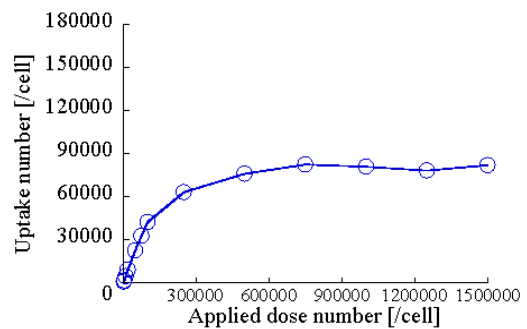


図 4.1 エネルギー依存性取込量(100 nm)

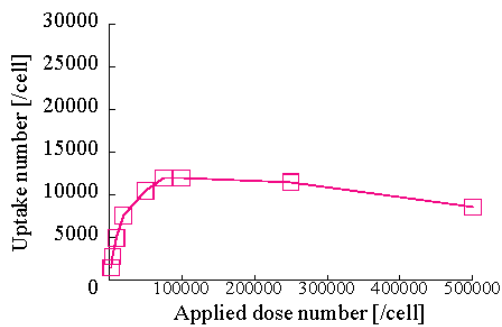


図 4.2 エネルギー依存性取込量(200 nm)

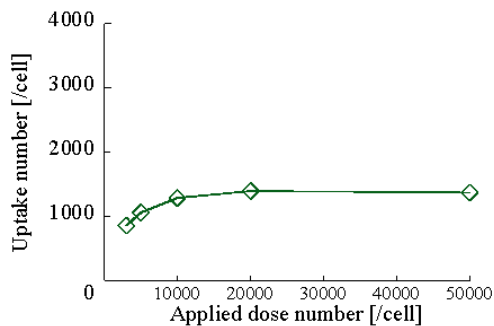


図 4.3 エネルギー依存性取込量(400 nm)

次に各粒子径のナノ粒子投与量を一定にして投与してみたところ(1 ng/cell)、400 nmと比較して100 nm、200 nmの粒子細胞内到達量は高くなったが、100 nm、200 nmの二者間に有意差は確認されなかった(図5)。

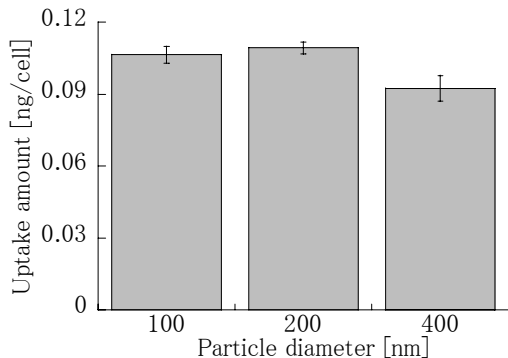


図5 ナノ粒子径と細胞内粒子取込量の関係
(投与粒子量:1 ng/cell)

以上の結果より、ナノコンポジット製剤は経肺投与製剤として有用である可能性が示唆された。また、賦形剤を用いることで肺内到達性の向上が期待できることが示された。さらに、含有ナノ粒子の粒子径を変化させることで肺がん細胞への到達性を制御させることが可能であることが示唆された。経肺投与で抗がん剤を腫瘍部位へ送達することが

可能となれば、直接患部へ薬剤を届けることが可能となるので治療効果の向上、投与量の削減、副作用の減少が期待できる。今後は正常細胞への到達性を評価し、肺がん細胞のみへの到達性を向上させるような製剤修飾を検討している予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

① Keishiro Tomoda, Takumi Ohkoshi, Keiji Hirota, Ganeshchandra S. Sonavane, Takehisa Nakajima, Hiroshi Terada, Masahito Komuro, Kenji Kitazato, Kimiko Makino, Preparation and properties of inhalable nanocomposite particles for treatment of lung cancer, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 査読有, V01. 71, Issue 2, 2009, 177-182

② Keishiro Tomoda, Hidehiko Ariizumi, Takatomo Nakaji, Kimiko Makino, Hydroxyapatite particles as drug carriers for proteins, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 査読有, V01. 76, Issue 1, 2010, 226-235

〔学会発表〕(計32件)

① 友田敬太郎, 肺がん細胞標的化ナノ粒子製剤の開発, 第62回コロイド及び界面化学討論会, 2009年9月19日, 岡山理科大学(岡山)

② 友田敬太郎, Inhalable Nanoformulation For Treatment of Lung Carcinoma, 17th International Symposium on Microencapsulation, 2009年9月29日, 名古屋国際会議場(愛知)

③ 友田敬太郎, 肺がん細胞を標的とした経肺投与ナノ粒子製剤の開発, 第13回バイオ治療法研究会, 2009年12月5日, 社会福祉総合センター(香川)

④ 友田敬太郎, 肺がん治療用ナノ粒子製剤, 日本薬学会第130年会 2010年3月27日, 岡山桃太郎アリーナ(岡山)

⑤ 友田敬太郎, 肺がん細胞標的化蓄肺投与用製剤の開発, 第26回日本Drug Delivery System学会, 2010年6月19-20日, 大阪国際交流センター(大阪)

⑥ 友田敬太郎, 肺がん細胞を標的としたナノ粒子製剤, 日本油化学会第49回年会, 2010年9月15-17日, 北海道大学函館キャンパス(北海道)

⑦ Keishiro Tomoda, Nanoparticles for the treatment of lung carcinoma, International

Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science 35th Anniversary of Division of Colloid and Surface Chemistry, 2010年9月19-22日、International Conference Hall(千葉)

⑧Keishiro Tomoda, Treatment of lung carcinoma using inhalable nanoparticle formulation、第8回 東京理科大学 DDS研究センターシンポジウム、2010年10月15日、森戸記念館(東京)

⑨友田敬士郎、蓄肺投与を目的としたナノ粒子製剤、オレオナノサイエンスシンポジウム2010、2010年11月4日、森戸記念館(東京)

⑩Keishiro Tomoda, Treatment of Lung Carcinoma Using Inhalable Nanocomposite Particles、Third Indo-Japanese International Joint Symposium on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries、2010年12月13-14日、森戸記念館(東京)

⑪友田敬士郎、肺がん治療用蓄肺投与ナノコンポジット製剤、日本薬学会第131年会、2010年3月29-31日、ツインメッセ静岡(静岡)

[図書] (計1件)

①友田敬士郎 他、技術教育出版社、改訂版 界面活性剤の機能創製・素材開発・応用技術、2011、190-201

6. 研究組織

(1)研究代表者

友田 敬士郎(TOMODA KEISHIRO)

東京理科大学薬学部 助教

研究者番号:70516400