

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19940

研究課題名（和文）好中球を担体とした独創的DDSの開発と炎症性疾患治療への応用

研究課題名（英文）Development of a DDS technology using neutrophils for targeting inflammatory sites

研究代表者

浅井 知浩（Asai, Tomohiro）

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：00381731

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：脳梗塞の病態進行に着目した斬新なDDSの構築を目指し、好中球を薬物担体として利用するNeutrophil-mediated DDSに関する研究を行った。長期間の薬物徐放が可能なマイクロディスクを好中球に搭載し、長期的に細胞保護効果をもたらすDDSの開発を試みた。マイクロディスクの薬物担体部の組成を最適化し、タクロリムス徐放型のマイクロディスクを作成した。タクロリムスの放出試験を行ったところ、最適化したマイクロディスクを用いることで、2～4週間の薬物徐放が可能になった。急性肺障害モデルと中大脳動脈梗塞モデルを用いて好中球の動態を評価したところ、炎症部位に集積性を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、好中球に搭載可能な薬物放出制御型のマイクロディスクを開発し、免疫抑制薬の炎症部位選択的DDSが炎症を伴う難治性疾患の治療に応用できる可能性を示唆した。細胞医薬が拓く未来の医療のさらにその先を見据えた挑戦的な研究において有益な知見が得られた。本研究成果は、いまだ治療法が確立されていない炎症性疾患の治療研究やDDS製剤開発の一助となるものであり、よりよい医療の発展に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Aiming to construct a novel drug delivery system (DDS) focusing on the pathological progression of cerebral infarction, we conducted research on neutrophil-mediated DDS technology, which uses neutrophils as a drug carrier. We attempted to develop a DDS that has a long-term cytoprotective effect using neutrophils with microdiscs that enable sustained drug release. We optimized the composition of the drug reserve part of the microdiscs to release tacrolimus sustainably. In a release study of tacrolimus, the optimized microdiscs enabled sustained drug release for 2 to 4 weeks. Evaluation of neutrophil dynamics using an acute lung injury model and a middle cerebral artery infarction model suggested that neutrophils accumulate at the site of inflammation.

研究分野：薬物送達学

キーワード：drug delivery system マイクロディスク 好中球 炎症 脳梗塞

## 1. 研究開始当初の背景

我が国において脳梗塞は要介護に至る原因疾患の第2位であり、現在の超高齢社会においてその治療成績の向上は喫緊の課題である。これまでに我々は、脳梗塞モデル動物において粒子径 100 nm 程度のナノ粒子がペナンプラ領域に集積することを見出し、ナノ drug delivery system (DDS) の脳梗塞治療への応用に関して研究成果をあげてきた。脳梗塞時に血液脳関門の透過性が亢進することはヒトでも報告されており、ナノ DDS の臨床応用が期待される。しかし、脳梗塞モデルにおけるナノ粒子のペナンプラ領域への集積は、再灌流後は時間経過に伴って減少し、半日以内には検出限界以下になる。これはナノ粒子がペナンプラ領域に移行するためのルートが再灌流後に閉ざされるためであると考えられ、従来のストラテジーでは DDS の効果が得られる治療タイミングは限られるという課題があった。そこで我々は、好中球が脳梗塞急性期から修復期にわたって長期に障害部位へと浸潤することに着目し、Neutrophil-mediated DDS の開発と治療応用を目指すという着想に至った。

## 2. 研究の目的

これまでに我々は、血液脳関門の破綻をきたす脳梗塞の病態に着目し、ナノ粒子を用いた脳へ DDS に関して多くの知見を蓄積してきた。

脳虚血時あるいは再灌流後早期にナノ粒子化した脳保護剤を投与することで、DDS の効果による高い脳保護効果が得られることを動物試験で明らかにした。しかしながら、脳梗塞の病態進行に伴い血液脳関門のバリア能は経時的に変化するため、バリア能が回復した後ではナノ粒子化脳保護剤を投与しても DDS の効果があまり期待できない。そこで我々は、脳梗塞の病態進行に合わせた革新的 DDS の構築を目指し、好中球を用いて薬物を送達する Neutrophil-mediated

DDS を開発するという着想に至った (図 1)。好中球は炎症に対して速やかに応答する免疫細胞であり、脳梗塞急性期から修復期にわたって脳に浸潤し、障害部位の修復に関与する。そのような好中球を担体にして細胞保護作用や神経再生作用を示す薬物を送達することにより、画期的な脳梗塞治療を可能にすることを目指した。このような細胞に薬を載せる創薬アプローチは、次世代の薬として期待が大きい細胞医薬のさらにその先を見据えたものである。これまでに我々は、好中球を担体とした脳梗塞部位への DDS を目的として、好中球の表面に結合するマイクロディスクを作成した (図 2)。この Neutrophil-mediated DDS を臨床に応用するためには、好中球の単回投与で長期的な脳保護効果が得られることが望ましい。細胞医薬品の繰り返し投与は、患者や医療経済に大きな負担がかかる。そこで本研究では、これまでの DDS 技術では達成し得なかったレベルでの脳機能の回復を目指し、単回投与で長期的に脳保護効果をもたらす革新的な Neutrophil-mediated DDS の開発を試みた。

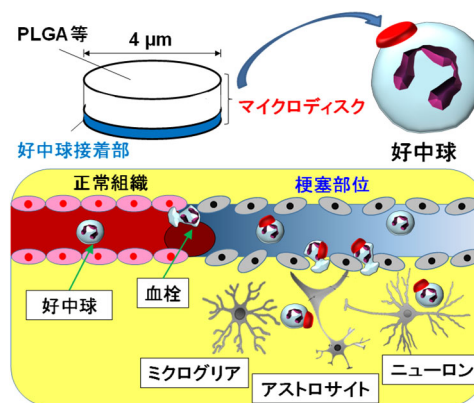


図 1 好中球を用いた脳梗塞部位への

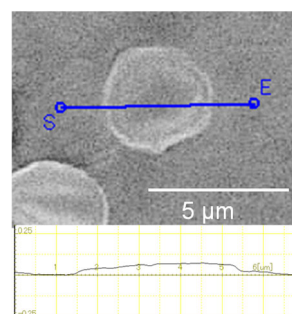


図 2 マイクロディスク  
直径約 4 μm、厚さ約 50 nm

### 3. 研究の方法

生分解性の乳酸-グリコール酸共重合体 (Poly(lactic-co-glycolic) acid: PLGA) と乳酸重合体 poly(lactic acid) (PLA) を基材として用いた放出制御型のマイクロディスクを新たに設計し、長期間にわたる薬物徐放を可能にした Neutrophil-mediated DDS を開発した。マイクロディスクは、マイクロコンタクトプリンティング法で作成した。マイクロディスクの細胞接着部は、好中球に発現する CD206 と CD44 にそれぞれ親和性があるキトサンとヒアルロン酸を Layer-by-layer 法で積層させて作成した。これまでの検討により、本手法でマイクロディスクを好中球に搭載でき、またマイクロディスクが好中球の浸潤能に影響を与えないことが示唆されている。本研究では、PLGA/PLA マイクロディスクにタクロリムスの封入を試みた。タクロリムスは、神経細胞に高発現するカルシニューリンの阻害作用を有し、脳梗塞時の NO synthase の産生やアポトーシスを抑制する。以前に脳梗塞に対してタクロリムスの臨床試験が実施されたが、腎不全等の副作用が原因で中止に至った。タクロリムスの脳梗塞治療への応用には DDS 技術の開発が有効と考えられる。好中球によって PLGA/PLA マイクロディスクが脳梗塞部位に送達されれば、局所でタクロリムスが長期間にわたって徐放され、持続的な脳保護効果が得られることが期待される。そこで本研究では、タクロリムスの徐放性を指標に PLGA/PLA マイクロディスクの組成を決定した。タクロリムス含有 PLGA/PLA マイクロディスクの作製、好中球との接着に与える影響の評価、タクロリムスの定量方法の確立、マイクロディスクからのタクロリムスの放出挙動について検討した。タクロリムス含有マイクロディスクと好中球を用いた DDS の POC 取得を目的とし、好中球の体内動態に関する検討を急性肺障害モデルと中大脳動脈梗塞モデルで実施した。蛍光標識した好中球を各疾患モデルに尾静脈内投与し、その体内動態を *in vivo* imaging system (IVIS) を用いて解析した。

### 4. 研究成果

PLGA の LG 比および PLA の薬物担体部への混合は、マイクロディスクと好中球との接着に影響を与えないことが明らかになった。また、タクロリムスを薬物担体部に封入しても、未封入のマイクロディスクと同程度の好中球接着率を示した。これらの結果から、タクロリムス含有マイクロディスクは好中球と接着し、Neutrophil-mediated DDS に応用可能であることが示唆された。次に作製したマイクロディスクのタクロリムスの放出挙動について検討した。図 3 に示すようにマ

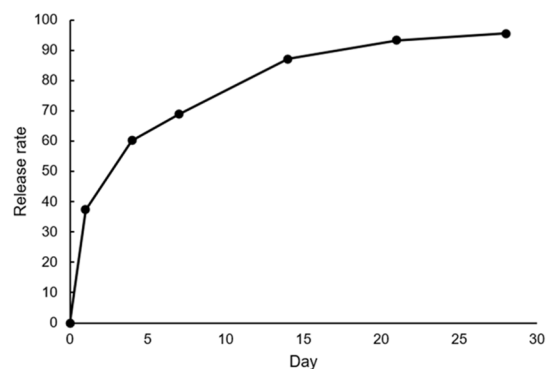


図 3 タクロリムスのマイクロディスクからの放出挙動

イクロディスクはタクロリムスを 2~4 週間徐放することができる製剤であることが示された。PLGA は疎水性の PLA と親水性の PGA がランダム共重合したポリマーであり、L/G 比によりポリマーの疎水性やガラス転移点、体内での分解速度が異なる。本研究では L/G 比を最適化しさらに PLA を混合させることで、2~4 週間の薬物徐放型マイクロディスクを作成することが可能になった。今回は血漿を模倣した酢酸リンゲル液で試験したが、体内においても同様の徐放性を持つことが期待される。またタクロリムスの封入はマイクロディス

ク的好中球への接着に影響を及ぼさなかった。

急性肺障害モデルマウスを用い、尾静脈内投与した好中球が炎症部位ターゲティング能を持つかについて検

討した。マウスにLPS

を投与してから24時

間後に蛍光標識した

好中球を静脈内投与

し、好中球の投与か

ら1時間後にIVISを

用いて各臓器への分

布を解析した。その

結果、LPS投与群の方

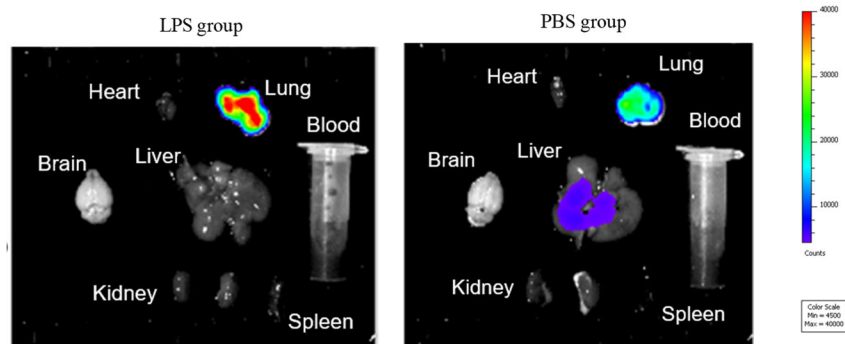


図 4 急性肺障害モデルマウスにおける好中球の体内動態

が対照の PBS 投与群と比較して、有意に多くの好中球が炎症を起こした肺に集積した。また、PBS 群は LPS 群と比較して肝臓に好中球が集積した (図 4)。次に、中大脳梗塞モデル

マウスにおいて尾静脈内投与した好中球が炎症部位ターゲティング能を有するかについて

検討した。中大脳動脈梗塞から3時間後に、蛍光標識した好中球を尾静脈内投与した。好中

球の投与から1時間後に解剖し、各臓器への好中球の集積の様子をIVISで観察した。その

結果、投与する細胞数に応じて脳梗塞により炎症を起こした脳への好中球の集積が変化す

る様子が観察された。炎症を起こした脳への好中球の集積は、 $5 \times 10^5$  cells/mouse で投与し

た際が最も高かった。本研究では、急性肺障害モデルと中大脳動脈梗塞モデルの両モデルに

おいて、好中球が炎症組織に集積することを明らかにした。適切な細胞数を投与することにより、

脳梗塞を起こした脳への DDS が可能性が示唆された以上より、マイクロディスクと好中球を用いた DDS 技術の研究開発により、炎症部位への薬物送達が可能になることが示唆された。

急性肺障害を治療するための根本的な治療薬はいまだに開発されておらず、脳梗塞に対

する治療薬も血栓溶解剤の t-PA の他にない。両疾患とも様々な薬の開発が進められてきた

が、薬効の不十分さや副作用により実用に至った例はほとんどない。こうした理由から炎症

部位特異的に薬を送達する DDS 技術の開発は、現状を打破するために有効な手段であると

考えられる。本研究では、好中球に搭載可能な薬物放出制御型のマイクロディスクを開発し、

免疫抑制薬の炎症部位選択的 DDS が炎症を伴う難治性疾患の治療に応用できる可能性を示

唆した。細胞医薬が拓く未来の医療のさらにその先を見据えた挑戦的な研究において有益

な知見が得られた。本研究成果は、いまだ治療法が確立されていない炎症性疾患の治療研究

や DDS 製剤開発の一助となるものであり、よりよい医療の発展に繋がることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koide H, Ochiai H, Suzuki H, Hirata S, Watanabe M, Yonezawa S, Dewa T, Oku N, Asai T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Easy preparation of a liposome-mediated protein delivery system by freeze-thawing a liposome-protein complex.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Mater Chem B	6. 最初と最後の頁 6768-6776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2tb00271j.	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 柳田洋翼, 奥 直人, 本田美樹, 柳田光昭, 浅井知浩	4. 巻 31
2. 論文標題 リポソーム化Fasudilの薬物放出性が脳虚血再灌流障害の治療効果に及ぼす影響	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 製剤機械技術学会誌	6. 最初と最後の頁 271-276
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 -

1. 著者名 Koide H, Saito K, Yoshimatsu K, Chou B, Hoshino Y, Yonezawa S, Oku N, Asai T, Shea KJ	4. 巻 335
2. 論文標題 Cooling-induced, localized release of cytotoxic peptides from engineered polymer nanoparticles in living mice for cancer therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Control Release	6. 最初と最後の頁 745-759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel	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 -

1. 著者名 Koide Hiroyuki, Kiyokawa Chiaki, Okishima Anna, Saito Kaito, Yoshimatsu Keiichi, Fukuta Tatsuya, Hoshino Yu, Asai Tomohiro, Nishimura Yuri, Miura Yoshiko, Oku Naoto, Shea Kenneth J	4. 巻 145
2. 論文標題 Design of an Anti-HMGB1 Synthetic Antibody for <i>In Vivo</i> Ischemic/Reperfusion Injury Therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 23143 ~ 23151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.3c06799	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 -

1. 著者名 Hashimoto Masahiro, Yonezawa Sei, Furan Song, Nitta Chiori, Maeda Noriyuki, Tomita Koji, Yokouchi Ayano, Koide Hiroyuki, Asai Tomohiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Increasing the siRNA knockdown efficiency of lipid nanoparticles by morphological transformation with the use of dihydrosphingomyelin as a helper lipid	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 3269 ~ 3277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d3bm00068k	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 -

1. 著者名 Asai T, Yokota M, Isomura H, Koide H, Sakurai N, Okamoto A, Ando H, Dewa T, Oku N	4. 巻 112
2. 論文標題 Treatment of PTEN-Null breast cancer by a synthetic lethal approach involving PARP1 gene silencing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Pharm Sci	6. 最初と最後の頁 1908-1191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs	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19件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 浅井知浩
2. 発表標題 電荷反転型LNP製剤の精密設計と核酸デリバリーへの応用
3. 学会等名 日本薬物動態学会第37回年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅井知浩
2. 発表標題 電荷反転型脂質ナノ粒子を用いた核酸送達技術の研究開発
3. 学会等名 第43回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋沙也加、龍 聡平、沙 沛瀚、又吉克樹、宋 復燃、尾崎奈穂子、田中陽平、浅井知浩
2. 発表標題 ペプチドを基盤とする新規pH応答性脂質の設計とmRNA/LNP製剤の開発
3. 学会等名 第43回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 又吉克樹、龍 聡平、高橋沙也加、米澤 正、尾崎奈穂子、田中陽平、浅井知浩
2. 発表標題 新規 pH 応答性ペプチド脂質を基盤とするmRNA/LNP製剤の設計
3. 学会等名 第43回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沙 沛瀚、龍 聡平、高橋沙也加、宋 復燃、横内綾乃、富田康治、前田典之、浅井知浩
2. 発表標題 電荷反転型脂質誘導体を用いたmRNA送達技術の開発
3. 学会等名 第27回創剤フォーラム若手研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新田千織、宋 復燃、尾崎奈穂子、田中陽平、浅井知浩
2. 発表標題 ペプチドを基盤とする新規pH応答性脂質を用いたsiRNA内封LNPの開発
3. 学会等名 第27回創剤フォーラム若手研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河合明佑未、宋 復燃、横内綾乃、富田康治、前田典之、浅井知浩
2. 発表標題 電荷反転型脂質誘導体を用いたsiRNA内封型脂質ナノ粒子の設計
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 龍 聡平、高橋沙也加、沙 沛瀚、宋 復燃、尾崎奈穂子、田中陽平、浅井知浩
2. 発表標題 ペプチドを基盤とする新規pH応答性脂質を用いたmRNA内封LNPの開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本正寛、米澤 正、宋 復燃、前田典之、富田康治、横内綾乃、浅井知浩
2. 発表標題 脂質ナノ粒子のモルフォロジーが有効性に与える影響
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 影山依央、米澤 正、浅井知浩
2. 発表標題 好中球を用いた炎症部位に対するDDS技術の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 渡邊 翠、小出裕之、平田真也、米澤 正、出羽毅久、奥 直人、浅井知浩
2. 発表標題 多官能性リポソームによるタンパク質送達技術の開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第38年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 又吉克樹、高橋沙也加、龍 聡平、米澤 正、尾崎奈穂子、倉田麻希子 浅井知浩
2. 発表標題 pH応答性ジペプチド脂質を含有するmRNA/LNP製剤の開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第8回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平田真也、小出裕之、渡邊 翠、江上寛通、濱島義隆、出羽毅久、奥 直人、浅井知浩
2. 発表標題 タンパク質の細胞内送達を目的とした多官能性リポソームの開発
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinya Hirata, Hiroyuki Koide, Midori Watanabe, Hiromichi Egami, Yoshitaka Hamashima, Takehisa Dewa, Naoto Oku, Tomohiro Asai
2. 発表標題 Development of multi-functionalized liposomes with high affinity for target proteins for intracellular protein delivery
3. 学会等名 2023 Nanomedicine and Drug Delivery Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Katsuki Matayoshi, Sayaka Takahashi, Sohei Ryu, Sei Yonezawa, Nahoko Ozaki, Makiko Kurata, Tomohiro Asai
2. 発表標題 Development of mRNA-loaded LNPs with novel pH-responsive dipeptide-conjugated lipids
3. 学会等名 2023 Nanomedicine and Drug Delivery Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新田千織、鈴木悠平、浅井知浩
2. 発表標題 免疫細胞を標的とした核酸送達技術とがん免疫療法への応用
3. 学会等名 第44回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 影山依央、米澤 正、浅井知浩
2. 発表標題 好中球を用いたDDS技術の開発と炎症性疾患治療への応用
3. 学会等名 第44回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊 翠、小出裕之、平田真也、落合広樹、出羽毅久、奥 直人、浅井知浩
2. 発表標題 タンパク質の細胞内送達を可能とする多官能性リボソームの開発
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 沙 沛瀚、高下朋之、黒崎寿夫、浅井知浩
2. 発表標題 新規電荷反転型脂質を用いた PEG-free mRNA 内封 LNP の開発
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 米澤正 浅井知浩	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 580
3. 書名 RNA干渉を誘導する全身投与型脂質ナノ粒子の設計	

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡県立大学薬学部医薬生命化学分野ホームページ <a href="https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/radiobio/">https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/radiobio/</a>
--

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
---------	---------