

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 12 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860026

研究課題名(和文) 炎症性肺疾患に対する温度応答DDSの基盤技術に関する研究

研究課題名(英文) Thermosensitive drug delivery against inflammatory pulmonary diseases

## 研究代表者

田上 辰秋 (Tagami, Tatsuaki)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：10609887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、炎症性の肺疾患部位特異的に効率的に薬物放出できるような、薬物送達システム(通称：DDS)技術の開発を行うことである。体温よりも温度が高い条件に敏感に応答して薬物放出するナノサイズの脂質カプセル(リポソーム)の開発に成功した。ある種の界面活性剤をリポソームに組み込むことで、温度応答性を示しつつも、肺組織内に対する炎症応答・細胞毒性はない経肺投与型製剤を作成することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The main purpose of this project is to understand about the pulmonary drug delivery system mediated by liposome which is nanosize lipid vesicle. We focused on the application of temperature-sensitive liposome for inflammatory site in lung.

研究分野：物理系薬学

キーワード：リポソーム DDS 経肺投与型製剤 温度応答性DDS

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに、筆者は、薬物ナノキャリアであるリポソームを研究対象として、ドラッグデリバリーシステム (DDS) に関する研究を行ってきた。リポソームは、細胞膜の構成成分であるリン脂質から構成されているため、生体適合性が高く、またリポソームは、分解性の高い薬物を封入することにより、安定性に寄与することができる。

現在、複数のリポソーム注射剤が市販されている一方で、経肺投与型のリポソーム製剤は市場には出ておらず、いくつかの製剤について臨床試験が行われている段階である。

筆者は、以前より温度感受性リポソームに関する研究を行ってきた。これは加温することにより、リポソーム内に含まれている薬物を高感度で放出するリポソームのことであり、温熱療法と併用することにより、加熱している目的部位に選択的に薬物を送達するような試みが行われてきた。

## 2. 研究の目的

リポソーム製剤を適用する際、肺炎や肺がんなどの炎症性肺疾患に対して、経肺投与型の刺激応答性リポソームをもし開発することができれば、非常に有用な DDS 戦略になると思われるが、現段階において、そのような研究はほとんど行われていない。

筆者は、温熱感受性リポソームを調製し、経肺投与に適した温熱感受性リポソームに関する研究を行った。

## 3. 研究の方法

### リポソームの調製：

リポソームの調製方法は、申請者が以前発表した論文を参考にする (Tagami et al., 2011, Journal of Controlled Release)。まず、リン脂質と PEG 系界面活性剤である Poloxamer 188 を有機溶媒に溶解し、減圧乾燥させることにより、薄膜脂質フィルムを作成した。その後、蛍光物質 (カルセイン) を含む水溶液を加えてよく混合しリポソームを調製後、エクストリューダーを用いて 100 nm ほどの粒子径に整えたリポソームを調製した。その後、HBS 緩衝液を用いてゲルろ過を行い、カルセインを含有するリポソームを調製した。

### リポソームから放出される薬物量の評価：

カルセイン封入リポソーム懸濁液を入れ

たマイクロチューブを温浴 (目的の温度に設定しておく) に入れた。各時間におけるリポソーム外部に漏れ出したカルセインの蛍光強度をプレートリーダーを用いて測定することにより薬物放出量・放出速度を評価した。

### ドキソルビシン封入リポソームの調製：

先述のようにリポソームの薄膜脂質フィルムを調製後、酸性の緩衝液 (硫酸アンモニウムもしくはクエン酸) を加えて混合し、エクストリューダーを用いてリポソームを調製した。その後、HBS 緩衝液を用いてゲルろ過を行い、リポソームの外水相を HBS で置換した。その後、ドキソルビシンを添加し、37°C でインキュベーションすることによりリポソーム内に薬物のローディングを行った。リポソームの粒子径を測定後、リポソームの濃度、ドキソルビシンの濃度を定量することにより、リポソームに封入された薬物の封入率を算出した。

### リポソームの毒性・炎症応答性に関する検討：

ヒト肺がん細胞株 A549、もしくはマウスマクロファージ様細胞株 Raw264.7 を 96well プレートに播種し、24 時間の前培養を行った。その後、各種濃度のリポソームを添加した。3 時間後、ウェルを洗浄し、21 時間の培養を行った。その後 WST アッセイ試薬を添加し、さらに培養を行った。各サンプルの吸光度をプレートリーダーを用いて測定し、細胞生存率の算出を行った。また、ラットに気管挿管の手術を行った。次にリポソームを経気管投与を行った。3 時間後、気管支・肺胞洗浄液を回収し、サンプルとした。サンプルについて、キットを用いて、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  量および細胞傷害の指標である乳酸脱水素酵素 (LDH) 量の測定を行った。

## 4. 研究成果

### リポソームの放出挙動に関する評価：

まず、蛍光マーカであるカルセインを各種リポソームに封入し、42°C (加熱条件) および 37°C (体温条件) におけるカルセインの放出挙動について検討を行った。リポソームはリン脂質である Di-*Palmitoyl*-Phosphatidyl-choline (DPPC) を用い、これに加えて、界面活性剤であり医薬品添加剤としてよく用いられているポロキサマー (Poloxamer 188) をリポソームに含有させた。Poloxamer は、疎水性であるポリオキシプロピレン鎖の両端に、親水性のポリオキシエチレン鎖 (POE) が結合したブロックコポリマーである。

検討の結果、DPPCに含有させる Poloxamer 188 の比率を調製することにより、温熱感受性を示すことを発見した。体温である 37°C においては、カルセインの漏出はほとんど見られず、42°C に加熱すると短時間でカルセインの放出が確認できた。

リポソームの温熱感受性は、用いるリン脂質においても影響を受けることが知られている。そこで、それぞれ異なるリン脂質に Poloxamer 188 が含有したリポソームを調製し、カルセインの放出挙動について検討を行った。その結果、DPPC 以外の異なる相転移温度をもつリン脂質を用いた場合、加熱してもカルセインの放出を示さないもの (HSPC、DSPC)、また 37°C においても容易にカルセインを放出してしまうもの (DLPC)、そして、リポソームを構成しないと推察されるもの (DHPC) があることがわかり、適切なリン脂質の選択が重要であることがわかった。以上の検討結果より、DPPC/Poloxamer 188 がモル比で 3/0.4 のものを使用した。

#### ネブライザーの使用がリポソームの安定性に与える影響：

次に、リポソーム製剤の経肺投与を行うことを想定し、ネブライザーがリポソームの品質・安定性に与える影響について検討を行った。検討にあたり、①先述した温熱感受性リポソームの他に、②長期血中滞留性リポソーム、③①のリポソームにおいて Poloxamer 188 を含まないリポソーム (対照) の 3 種のリポソームを用いて検討を行った。

検討の結果、ネブライザーを使用することにより、②③のリポソームにおいてほとんど影響は認められなかった。これに対し、開発した①のリポソームにおいては、少量のカルセイン漏出、および粒子径の変化が認められるものの、温熱感受性においてはほとんど影響がないため、ネブライザーの使用において問題は、ほとんどないことが示された。

#### 肺組織内環境がリポソームの安定性に与える影響：

そして、経肺投与し、肺組織に到達したリポソームを想定し、肺組織内環境がリポソームの安定性に与える影響について検討した。検討の結果、肺組織に多く含まれるタンパクであるムチンがリポソームを漏出させることがわかった。それに対し、肺組織内に同様に多く存在するアルブミンを用いた場合、漏出は認められなかったことより、ムチンが肺組織内におけるリポソームの安定性に寄与することが示唆された。

#### リポソームの毒性・炎症応答性に関する検討：

次に、今回調製した DPPC/Poloxamer 188 リポソームの毒性について検討を行った。界面活性剤は、その性質上、細胞と相互作用することにより、細胞傷害性を有することが知られている。そのことにより、炎症応答を引き起こすことが想定されるため、まず、2 種の細胞株を用いて、WST アッセイを行い、細胞毒性試験を行った。その結果、リポソーム、リポソームの構成成分であるリン脂質、Poloxamer 188 を添加したところ、高濃度においても細胞傷害性は認められなかった。

さらに、ラットに対し、高濃度にリポソームを経気管投与し、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  量および細胞傷害性の指標である LDH 量を定量した。その結果、リポソームを投与しても TNF- $\alpha$  および LDH の産生はほとんど確認されなかった。

従って、本リポソーム組成は経肺投与において安全であり、非常に有用であることが示唆された。

#### 経肺投与型ドキシソルビシン封入リポソームの調製と温熱感受性の評価：

最後に、肺がんに対する治療を目指し、DPPC/Poloxamer 188 リポソームに抗がん剤であるドキシソルビシンの封入を行った。

ドキシソルビシンをリポソーム内に効率的に封入する方法としてリモートローディング法が知られている。これはリポソーム内部を酸性に、外部を中性して、pH の勾配をつけることにより、塩基性薬物であるドキシソルビシンの分子形 $\leftrightarrow$ イオン形の変化を利用して、リポソーム内部に能動的に蓄積させる方法である。

新しい知見として、リポソーム内の緩衝液が、今回調製した温熱感受性リポソームの温熱感受性に影響することを発見したので報告をする。今回はリポソーム内部の緩衝液として、硫酸アンモニウムとクエン酸を用いた。

ドキシソルビシンを封入したところ、硫酸アンモニウムを用いた場合の方が、クエン酸よりも高効率でリポソーム内に封入された。その一方で、クエン酸は加温下 (42°C) において短時間でドキシソルビシンが放出されるのに対し、硫酸アンモニウムは薬物放出しないという結果が得られた。このため、内部の緩衝液の選択が、温熱感受性リポソームの調製には重要であり、リポソーム内部における薬物の保持状態が、影響することが示された。これまででは、リポソーム刺激応答性の多くは、リポソームの組成が大きく影響することが知られているが、リポソーム内部の保持状態が影響するという知見を得ることができた。

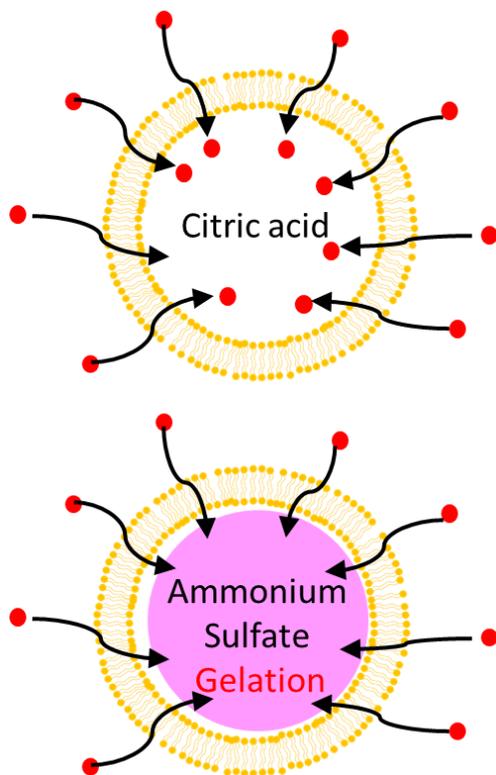


Figure. リモートローディング法を用いた場合の薬物（ドキシソルビシン）のリポソーム封入状態の違いに関する模式図。硫酸アンモニウムをリポソーム内水相の緩衝液として選択した場合、ドキシソルビシンと相互作用してゲル化するため、そのことが、不十分な薬物放出に影響するのではないかと考えられる。

以上、本研究において、経肺投与型の温熱感受性リポソームの調製を行い、経肺投与型リポソームを調製するのに重要な情報を得ることができた。今後は、それらの情報を活用し、さらに他の刺激応答性リポソームの開発に続けていきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

・ Effective Remote Loading of Doxorubicin into DPPC/Poloxamer 188 Hybrid Liposome to Retain Thermosensitive Property and the Assessment of Carrier-Based Acute Cytotoxicity for Pulmonary Administration. **Tatsuaki Tagami**, Masahito Kubota, Tetsuya Ozeki. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015 104 (11): 3824 - 3832. doi: 10.1002/jps.24593. Epub 2015 Jul 30. PMID: 26228287

〔学会発表〕（計7件）

・ 安藤 裕太, **田上 辰秋**, 尾関 哲也. リン脂質分解酵素応答型経肺投与リポソーム製

剤の粒子設計. 第24回 DDSカンファレンス, 清水テルサ(静岡県清水市), 2015年9月4日

・ **田上 辰秋**, 安藤 裕太, 尾関 哲也. Poloxamer188含有DPPCリポソームの経肺投与における急性毒性・炎症に関する検討, 2015年度京都薬科大学私立大学戦略的研究基盤形成支援事業合同成果発表会, 京都薬科大学(京都府京都市), 2015年8月18日

・ **田上 辰秋**, 安藤 裕太, 尾関 哲也: リポ多糖による急性肺組織炎症の誘導が肺組織内環境変化に与える影響および経肺投与型リポソームに与える影響, 日本薬学会第135年会, 神戸学院大学(兵庫県神戸市), 2015年3月25日~28日

・ **田上 辰秋**, 尾関 哲也: 肺気管支・肺胞環境における経肺投与型リポソームの安定性に関する検討, 第36回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 徳島大学(徳島県徳島市), 2014年11月20日~21日(口頭発表)

・ **田上 辰秋**, 久保田 雅仁, 尾関 哲也: 抗生物質封入Poloxamer修飾リポソームの調製と温度依存的な薬物放出制御に関する検討, 第30回日本DDS学会学術集会, 慶應義塾大学薬学部(東京都港区), 2014年7月30日~31日(ポスター発表)

・ 久保田 雅仁, **田上 辰秋**, 尾関 哲也: 非イオン性ブロックコポリマーによる温熱感受性リポソームの調製, 日本薬学会第134年会, ホテル日航熊本(熊本県熊本市), 2014年3月27日~30日

・ **田上 辰秋**, 久保田 雅仁, 布施 俊樹, 尾関 哲也: 経肺投与用吸入デバイスの噴霧が温熱感受性リポソームの物性に与える影響, 日本薬学会第134年会, ホテル日航熊本(熊本県熊本市), 2014年3月27日~30日

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 **田上辰秋** (Tatsuaki Tagami)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師  
研究者番号: 10609887

以上