

平成30年6月25日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21534

研究課題名(和文) がん低酸素領域を送達範囲内に収める難水溶性薬物搭載粒子径可変ナノキャリアの開発

研究課題名(英文) Development of size-tunable nanoparticles for delivering hydrophobic drugs to hypoxic areas in tumor

研究代表者

鈴木 亮佑 (SUZUKI, Ryosuke)

神戸学院大学・薬学部・講師

研究者番号：80611540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は優れた薬物導入性と長期血中滞留性を併せ持ち、かつ粒子径制御によってがん低酸素領域を送達可能範囲に収める脂質-高分子複合ナノ粒子(LPNS)の開発を目的とし、以下の成果を得た。第一に、最適化した難水溶性薬物封入条件について粒子径が抗がん活性・薬物放出に及ぼす影響を明らかとした。第二に、マイクロリアクタを使用することで超微小・単分散からなるLPNS構築手法を確立した。当該成果はin vivoおよび臨床への応用に向けた基盤技術を確立した。

研究成果の概要(英文)：This study purposed to develop lipid-polymer hybrid nanoparticles (LPNs) that possess high loading efficiency of hydrophobic drugs and long blood circulation time and can deliver these drugs to hypoxic areas in tumor by tuning LPN size. Following two results were obtained. First, this study found the influence of LPN size on anti-tumor activity and drug release in optimized condition for encapsulating hydrophobic drugs. Second, using microreactors established a method to assemble ultrasmall and monodisperse LPNs. These results serve as a fundamental technology for application to in vivo experiments and clinical settings.

研究分野：薬物送達システム

キーワード：脂質-高分子複合ナノ粒子 がん化学療法 ナノメディシン フィトケミカル 疎水性薬物 薬物送達システム

## 1. 研究開始当初の背景

がん化学療法において、パクリタキセルなどといった難水溶性薬物は臨床現場において必要不可欠である一方、その難水溶性の解決は改善の余地を多く残している。当該製剤で水溶性向上を企図して添加されるエタノールや可溶化剤は過敏症など深刻な有害事象を伴うケースが報告されている。近年上市される低分子分子標的薬の一部も難水溶性であり、難水溶性薬物は今後も上市される可能性が高い。難水溶性薬物の現状および今後を考慮すると、有害事象を伴わない難水溶性の解決は患者の *quality of life* を向上させるために喫緊の課題である。

ナノ粒子への難水溶性薬物の搭載は上述した課題を解決する戦略の一つである。ナノ粒子は表面の分子設計によってがん組織への標的化能を付与するだけでなく、放出速度を制御することで抗がん活性の促進・有害事象の低減に寄与する。がん微小環境に関連する近年の報告に基づく、ナノ粒子には 1) より多くの薬物を搭載し、2) がん血管からより遠くに浸透させるために 30 nm 程度にまで粒子径を小さくし、3) 血中において長く滞留・循環する分子設計が求められる。しかしながら、既存ナノ粒子はこの 3 要素全てを満たすことができていない。脂質二重膜からなるリポソームは血中滞留性に優れる反面、搭載できる薬物導入量の上限が低い。対照的に、コア-シェル構造からなる高分子ナノ粒子は高い薬物導入性を有するが、血中滞留性はリポソームに劣る。粒子径に至っては 30 nm からなる難水溶性薬物搭載ナノ粒子はほとんど報告がなく、粒子径の要素を満たしたナノ粒子も他の要求を達成するには至っていない。ナノ粒子を難水溶性解決戦略として実用化するためには、一つのナノ粒子が上記 3 要素全てを併せ持つことが必要不可欠である。

本研究代表者はリポソームおよび高分子ナノ粒子が有する長所・短所の相補性に着目し、両者を構造的に統合している。脂質-高分子複合ナノ粒子 (LPN) は高分子コアを脂質一重膜で被覆したコア-シェル構造からなる。この統合は高分子ナノ粒子の高い薬物導入性およびリポソームの長期血中滞留性を併せ持つことを可能にする。さらに、調製条件の最適化は 35 nm を最小粒子径とした粒子径制御を達成した。粒子径の最適化は、漏出したがん血管から離れた低酸素領域を送達可能範囲に収めることが期待される。低酸素領域は、がん組織の根源たるがん幹細胞や治療抵抗性のがん細胞が存在する「最後の砦」である。こうした細胞への薬物送達はがんを根治させるために非常に意義がある。

## 2. 研究の目的

優れた薬物導入性と長期血中滞留性を併せ持ち、かつ粒子径制御によって、がん低酸素領域を送達可能範囲に収める LPN の開発を目的とした。本目的の達成にあたり、(1) 難

水溶性薬物の封入条件最適化、(2) 実用化に耐えうる品質の LPN を調製する手法の確立、(3) *in vivo* における最適化・抗がん活性の評価を申請当初の計画とした。上記 3 項目のうち最初の 2 項目を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) 難水溶性薬物封入条件の最適化

当該薬物として Trimethoxy-trans-stilbene (TMS) を選定した。TMS はフィトケミカル的一种であり、がん細胞を殺傷する直接的作用とともに、薬物耐性や転移・通常組織を疲弊させる悪液質を抑制する間接的作用を有することが特徴である。高分子としてポリ乳酸グリコールさん共重合体 (PLGA)、脂質として大豆由来リン脂質・ポリエチレングリコール (PEG) 結合脂質を使用した。シリンジポンプを用いて PLGA・TMS アセトン溶液を攪拌中の脂質水懸濁液に注入した後、アセトンを除去することで LPN を調製した。PLGA に対する脂質量が物性および封入性に及ぼす影響を評価した。最適な組成について 40, 60, 80, 100 nm からなる TMS 搭載 LPN を調製し、それぞれの細胞毒性を評価した。細胞毒性に起因する製剤学的要素を明らかとするために、*in vitro* 放出プロファイルおよび細胞内薬物蓄積量を評価した。

### (2) 実用化に耐えうる品質の LPN を調製する手法の確立

マイクロリアクタおよびシリンジポンプによる自動調製法の確立を試みた。マイクロリアクタは複雑な流路構造を連ねたデバイスであり、異なる 2 液の混合が効率的かつ均一で、スケールアップも容易であることが特徴である。アセトン溶液をクロスコネクタによって両側から挟み込むように緩衝液溶液と合流させ、マイクロリアクタで混合を行った。出口から流出した混合液をガラス容器にとり、水平しんとうによってアセトンを除去した。初めに、異なる分子量および末端官能基からなる PLGA について 40 nm またはそれ以下の粒子径を得るための最適化を行った。脂質組成の最適化は最適 PLGA 種を用いて行った。スケールアップ性の評価にあたり、液面高さが同等となるようガラス容器を選択した上で、穏和な条件とした水平しんとうを行った。精製・濃縮には限外ろ過を行った。均一性の評価には、動的光散乱法により得た粒子径分布とともに、透過型電子顕微鏡による LPN の直接観察を実施した。封入性を評価するために、TMS 初期導入量は PLGA 質量に対し 0-40% とした。並行して、TMS 初期導入量が細胞毒性および *in vitro* 放出プロファイルに及ぼす影響を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 難水溶性薬物封入条件の最適化

初めに、薬物封入性に優れたつも物性に影

響の少ない組成とするための組成最適化を行った。その結果、PLGA 質量に対し 25%の脂質量を油性成分である安息香酸ベンジル (BB) の有無にかかわらず最適な組成として見出した。粒子径の影響を明らかとするために調製した 40, 60, 80, 100 nm の TMS 搭載 LPN はいずれもほぼ 100%の回収率、90%以上の封入率、10%弱の薬物導入率であった。マウス乳がん由来 4T1 細胞において、TMS 搭載 LPN は粒子径が小さいほど細胞生存率曲線を低濃度側へとシフトさせ、安息香酸ベンジルを含有しない 40 および 100 nm の TMS 搭載 LPN においては IC50 値の有意な差が確認された (Fig. 1)。透析実験に基づく *in vitro* 放出プロファイルにおいては粒子径に起因する違いは見出されなかった。一方で、細胞内薬物蓄積量は粒子径が小さいほど多かった (Fig. 2)。上記の検討から、40 nm という超極小の粒子径はより大きな粒子径と同等の TMS 封入能を有しつつも細胞毒性を促進することを明らかとした。本結果は論文として現在投稿中である。

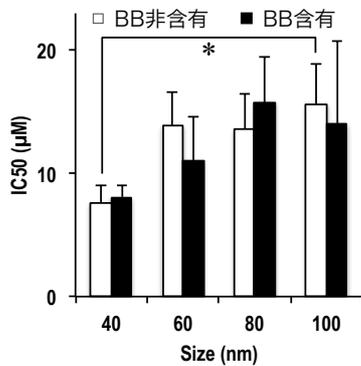


Fig. 1 粒子径が IC50 値に及ぼす影響

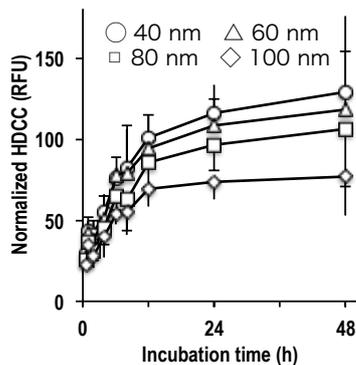


Fig. 2 粒子径が細胞内薬物蓄積量に及ぼす影響

(2) 実用化に耐えうる品質の LPN を調製する手法の確立

先に構築した LPN は未被覆の脂質や凝集 PLGA により粒子径分布が多分散であることが新たな課題として浮上した。実用化を考慮すると多分散度指数 (PDI) 0.1 未満である単分散とすることが必要不可欠であった。そこで、本項ではマイクロリアクタによる単分散 LPN の構築を目指した。初めに、前項と同等の粒子径を得るために PLGA 種の最適化を行

った。アセトン/緩衝液流速比を 1 に固定し合計流速を 5-20 mL/min について検討した。エステル末端 PLGA では合計流速の増大および低 PLGA 分子量の利用に依存して粒子径が減少し、最小で約 65 nm、PDI は約 0.1 となった。カルボキシ末端 PLGA でも同様の傾向が確認された一方、最小粒子径は約 30 nm にまで微小化された。しかし、PDI は約 0.2 であったので、PDI だけを低減させるために脂質組成の最適化を行った。アセトン溶液への Palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine (POPC) の添加は TMS 封入下でも PDI を 0.09 にまで低減させることに成功した (Fig. 3)。さらに、水平しんとう条件を穏和としたことで、アセトン除去時スケールを先の 5 mL から 10 倍の 50 mL にまで増大させても粒子径および PDI はそれぞれ約 31 nm・0.06-0.07 で変化のないスケールアップ性を達成した。精製・濃縮を行った TMS 搭載 LPN の極低温電子顕微鏡法による直接観察は、副生成物を伴わない、極めて均一性の高い構造からなることを明らかとした。薬物封入性について、10, 20, 30%の TMS 初期導入量は 90%以上の収率・約 80%の封入率で同等であり、ほぼ直線的に薬物導入率が増大し最大で約 15%となった (Fig. 4)。40%導入時には、いずれのパラメータも減少傾向に転じた。次に、細胞毒性を評価した。TMS を含有しない LPN 単体は濃度に関係なく細胞生存率はほぼ一定であった。TMS 初期導入量 10, 20, 30%の LPN はいずれも DMSO 溶液よりも細胞生存率曲線を低濃度側へとシフトさせただけでなく、少ない TMS 初期導入量ほど IC50 値を低減させた (Fig. 5)。*In vitro* 放出プロファイルにおいて少ない TMS 初期導入量ほど一定時間での TMS 放出量が少なかったことから、TMS 放出速度が細胞毒性に影響を及ぼすことが示唆された。上記の成果は極低温電子顕微鏡法による直接観察を担当した生理学研究所との共同研究として論文投稿準備を進めている。

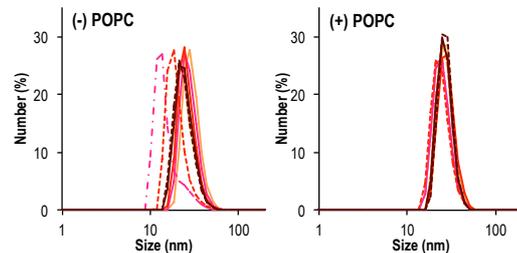


Fig. 3 POPC による LPN 分布の均一化

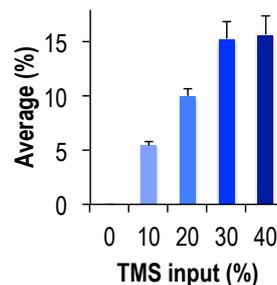


Fig. 4 TMS 導入効率

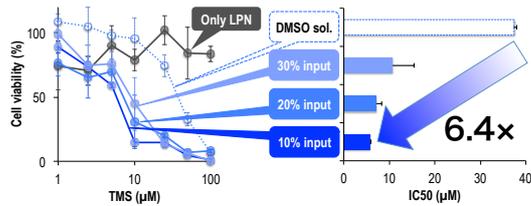


Fig. 5 LPN および TMS 搭載 LPN の細胞毒性

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 6 件)

1. 鈴木亮佑、岸本修一、福島昭二. 任意粒子径への容易な制御が広範囲かつ同一成分比で可能な疎水性薬物封入ナノカプセルの開発. 第 31 会 日本 DDS 学会学術集会. 2015 年 7 月. 京王プラザホテル
2. 鈴木亮佑、岸本修一、福島昭二. 粒子径制御が自在かつ容易なナノカプセルによる難水溶性薬物送達戦略の創出. 遺伝子・デリバリー研究会 第 15 回夏期セミナー. 2015 年 9 月. 定山溪ビューホテル
3. 鈴木亮佑、岸本修一、福島昭二. 100 nm 以下におけるナノカプセルの粒子径が抗腫瘍活性に及ぼす影響の解明. 第 32 回 日本 DDS 学会学術集会. 2016 年 7 月. グランシップ静岡
4. 鈴木亮佑、岸本修一、福島昭二. 疎水性フィトケミカル搭載ナノカプセルの粒子径が抗腫瘍活性に及ぼす影響とその寄与因子の評価. 遺伝子・デリバリー研究会 第 16 回夏期セミナー. 2017 年 9 月. やすらぎ伊王島
5. 鈴木亮佑、岸本修一、福島昭二. sub-100 nm 粒子径制御技術を用いたフィトケミカルの抗腫瘍活性促進. 遺伝子・デリバリー研究会 第 17 回シンポジウム. 2017 年 5 月. JEC 日本研修センター江坂
6. 鈴木亮佑、岸本修一、福島昭二. マイクロリアクタを用いた超極小脂質-高分子複合ナノ粒子の創成. 遺伝子・デリバリー研究会 第 17 回夏期セミナー. 2017 年 9 月. KKR ホテル熱海

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 亮佑 (SUZUKI Ryosuke)

神戸学院大学・薬学部・講師

研究者番号：80611540