

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17590041
 研究課題名（和文） 遺伝子治療タンパク質および抗結核薬の細胞内導入のためのナノ・マイクロ粒子の設計
 研究課題名（英文） Preparation of Nano-, Microparticles for Introduction of Therapeutic Protein and Anti-tuberculosis Drug into Cells

研究代表者
 尾関 哲也 (OZEKI TETSUYA)
 東京薬科大学・薬学部・准教授
 研究者番号：60277259

研究成果の概要:遺伝子組換えタンパク質の活性ペプチドである p53p と細胞膜を貫通する作用を有する Antennapedia (Ant) を融合させた p53p-Ant をマイクロカプセルに封入し、ラット脳腫瘍モデルの腫瘍内で長期にわたり放出させることで生存日数が延長し、抗腫瘍効果が得られた。抗結核薬のリファンピシン (RFP) ナノ粒子の経肺投与製剤を調製し、結核菌が潜む肺胞マクロファージ内に高効率で取り込ませることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	700,000	0	700,000
2006 年度	500,000	0	500,000
2007 年度	500,000	150,000	650,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	2,200,000	300,000	2,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：薬学、粒子設計、DDS、感染症

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子そのものを薬とする遺伝治療が期待され、非ウイルスベクターを用いた遺伝子導入に関する研究が盛んに行われているが、その効果は満足できるものではない。遺伝子そのものを薬とする場合、細胞への取り込み、エンドソームからの脱出、核移行、翻訳、細胞内での DNA の不安定さが障害となり、これらをすべてクリアするのは困難である。申請者らの用いる DNA 組換え修復タンパク質は相同 DNA 組換えにより損傷した DNA を修復する機能を持ち、ナノ微粒子化によって細胞内へ安定に導入することで、タンパク質

の有する遺伝子修復機能による癌や HIV などのウイルス感染症の根本治療が期待できる。
 (2) 現在、世界人口の 1/3 に相当する約 20 億人が結核菌に感染しており、毎年 800 万人が新たに結核を発症し、200 万人が死亡している。結核菌は肺胞マクロファージに貧食されても消化されずに生存し増殖するため根治療法が存在しない。結核薬を経肺投与により局所に到達させ、さらに肺胞のマクロファージに効率よく取り込ませることにより、きわめて有効な結核治療が期待できる。さらにこれらの技術を併用することで、治療タンパク質含有微粒子の経肺投与製剤の開発への

発展も期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、DNA 修復タンパク質および抗結核薬を、癌細胞や肺胞マクロファージなどの標的細胞へ効率良く送達し、細胞内へ導入するためのナノ・マイクロ微粒子の設計を、申請者らがこれまでに確立した製剤設計技術、特に、難溶解性薬物のナノ微粒子化技術、経肺投与製剤の設計技術、ナノ球形粒子を均一に含有したマイクロ粒子の設計技術を応用し達成することを試みるものである。すなわち、RecA (大腸菌由来) などのDNA組換え修復タンパク質の安定なナノ粒子の製剤設計、標的細胞へ高効率に導入し、細胞内で組換えDNA修復機能を発現させるための粒子設計、抗結核薬を肺へ高効率に送達可能な粉末吸入剤のための粒子設計、結核菌が潜み、その温床となる肺胞マクロファージ内へ抗結核薬を高効率に送達する製剤設計を目指す。DNA組換え修復タンパク質は、損傷したDNAを修復することができる。これを粒子設計によってナノ微粒子化して細胞内へ導入し、癌やウイルス感染症に対する遺伝子治療の基礎技術の確立を目指す。結核菌が潜む肺胞マクロファージが認識する各種担体を用いて抗結核薬を微粒子化し、肺胞マクロファージ内の結核菌まで確実に薬物を到達させることで有効性の高い治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) DNA 修復タンパク質活性ペプチド含有ナノ・マイクロ粒子の設計：DNA 組換えタンパク質活性ペプチド p53p と細胞膜透過性ペプチドの Ant を融合した p53p-Ant を含有する生体分解性ポリマー ナノ・マイクロ粒子を設計し、粒子の外観観察、粒度分布・粒子径測定、薬物封入率、薬物放出挙動を検討する。C6 ラットグリオーマ細胞を用いて治療タンパク・ペプチドの細胞内導入を評価する。ある温度 (LCST) を境にゾルゲルを繰り返す温度感受性ポリマーを用い、p53p-Ant 含有粒子が分散したがん治療に有効な薬物量を放出する drug delivery system (DDS) を設計する。p53p-Ant 含有ナノ・マイクロ粒子を分散した温度感受性ポリマーを低温でゾル (溶液) 状態に保ち、ラット脳内へ注入して体温でゲル化させて脳腫瘍部に注入して患部において治療タンパク・ペプチドを徐放させて常時、がん細胞へ送り込む。ラットの生存率、腫瘍の増殖抑制率によって制がん効果を評価する。

(2) 抗結核薬 RFP 含有マンニトール (MAN) マイクロ粒子を調製とその評価：4 流体ノズルスプレードライヤーを用い、経肺投与に適した粒子径範囲である 0.5~3 μm の RFP 含有 MAN 粒子を調製する。調製した粒子について

カスケードインパクトを用いて、肺への薬物粒子送達性の *in vitro* 評価を

行う。これらの検討により、まず、薬物の肺への送達性の高い製剤の設計を行う。さらに、結核菌の潜む肺胞マクロファージを標的とした治療効果の高い製剤の設計を試みる。調製した粒子を肺胞マクロファージへ導入する。粒子を取り込んだマクロファージを分離し、細胞内の薬物濃度を測定することによって導入効率を検討する。

4. 研究成果

(1) がん抑制タンパク質であり、遺伝子組換えタンパク質である p53 の C 末端活性部位のペプチド p53p と細胞透過性ペプチドである Antennapedia (Ant) を融合させたペプチドの p53p-Ant を用い、悪性脳腫瘍のラットグリオーマ C6 細胞へ p53p-Ant を導入し、抗腫瘍細胞効果を検討した。C6 細胞に膜透過性ペプチド部位の Ant のみを 100 μM を反応させた場合、C6 細胞の生存率は 88.3%であった。p53p-Ant を 100 μM を反応させた場合の生存率は 3.5%と著しく減少した。この結果から、p53p-Ant の抗腫瘍細胞作用は、細胞膜透過性ペプチドである Ant により p53p-Ant が細胞内に侵入し、p53p の作用によって発揮されたものと考えられた。また、TUNEL アッセイの結果、これらの細胞死は C6 細胞のアポトーシスによって引き起こされたことが認められた。p53p-Ant を PLGA-MS に封入し、温度感受性ゲルによってラット脳腫瘍モデルの脳腫瘍内に固定し、長期にわたり腫瘍内に放出させることでラットグリオーマ細胞移植後未処置群と比較して生存日数が延長し、*in vivo* において抗腫瘍効果が得られることが明らかとなった。

(2) 抗結核薬としてリファンピシン (RFP)、水溶性の担体としてマンニトール (MAN) を用いた。脂質として、コレステロール (Chol) 及びホスファチジルコリン (EPC) を用いた。RFP をアセトン/酢酸エチル混液に溶解して RFP 溶液とし、MAN は水に溶解して MAN 水溶液とした。これらの溶液を 4 流体ノズルの 2 つの液路から別々に送液し、スプレードライすることにより、RFP ナノ粒子含有 MAN マイクロスフェアを調製した。得られた粒子はいずれも経肺投与に適した粒子径の 1~5 μm であった。カスケードインパクトを用いて評価した *in vitro* 吸入特性について、RFP 原末では FPF へほとんど送達されないが、RFP/MAN マイクロスフェアでは、1/20 の粒子において治療域である肺に 40%以上の RFP を送達可能であり、さらに肺胞に相当する 6、7 ステージへも約 8%送達可能であった。RFP/MAN 組成比が 1/20 のマイクロスフェアをラットに経肺投与し、肺内での薬物の残存性について検討した。投与後 5 分後は約 85%の

薬物が肺内に存在した。しかしながら、1時間後には残存率が約5%となった。経口投与、静注に比べて投与初期のRFP肺内滞留性は著しく高いが、その消失は速やかであり、4時間後には消失した。次に、ターゲット部位である肺でのRFPの滞留性を向上させるため、RFPに脂質を添加して粒子を調製した。この粒子を同様にラットへ経肺投与し、肺内のRFP残存率を測定した。その結果、脂質を添加したマイクロスフェアでは5分後のRFP残存率は増加し、わずかではあるが4時間後においても肺内にRFPの残存が認められた。以上、抗結核薬であるRFPを4流体ノズル・スプレードライヤーによってRFP/MANマイクロスフェアとすることにより、肺に効率よく薬物を送達可能な粉末吸入粒子の設計が可能であった。

RFP及びポリ乳酸・グリコール酸 (PLGA) のアセトン/メタノール混液と水溶性担体のマンニトール (MAN) 水溶液を4流体ノズルの2つの液路から導入してRFP/PLGA ナノ粒子 (NS) 含有MANマイクロ粒子 (MS) を調製し、RFP/PLGA-MSと比較した。RFP/PLGA-NSは450 nm、MSは $3 \cdot \mu\text{m}$ であった。ラット肺胞由来マクロファージへの *in vitro* 取り込み性を検討したところ、NSにおいても肺胞マクロファージへ取り込まれることが明らかとなった。また、リガンドとしてフコースを添加することで取り込みを増加させることに成功した。人工肺モデルのカスケードインパクトによる *in vitro* 吸入送達性では、RFP/PLGA-NS含有-MSにおいて、肺胞に相当する6-7ステージへ約6%送達可能であった。これらの粒子をラットに経気管的に投与し、*in vivo* 肺内滞留性を検討したところ、RFP/PLGA-NS、MSいずれも投与4時間後においても約10%のRFPが肺内に残留することが明らかとなった。以上、RFP/PLGA-NS含有MAN-MSは、肺深部への送達性がよく、肺における滞留性が向上した肺結核治療粒子としての応用が期待できることを示した。次に調製したRFP/PLGA-NSは213 nm、MSは $2.1 \cdot \mu\text{m}$ であった。これらの粒子をラットに経肺投与し、肺胞マクロファージへの *in vivo* での取り込み性を検討したところ、MSの取り込み率はわずかであったのに対し、NSはよく取り込まれ4時間後では9.3%のRFPが取り込まれることが明らかとなった。In vivo 蛍光イメージングによって、投与後の粒子の肺内の分布を検討したところ、MSは投与後直ちに肺の粘液繊毛運動によって排泄されるが、NSは長時間、肺深部に滞留することが判明した。この長時間の滞留は、肺胞マクロファージがNSを取り込む時間を与え、そのため、取り込み率が增大したものと推察された。さらにステアリル化マンノースを合成し、ステアリル部分をPLGA中にスパイクさせることで、マクロファージの認識

するリガンドであるマンノースで表面を修飾したPLGA-NSを調製した。マンノースを10%修飾することで有意に粒子取り込みが増大した。抗結核薬であるRFPを4流体ノズル・スプレードライヤーによってRFP/MANマイクロスフェアとすることにより、肺に効率よく薬物を送達可能な粉末吸入粒子の設計が可能であった。以上、ナノ・マイクロ粒子設計によって、難治性疾患である悪性脳腫瘍および結核に対する有用な治療法を提案できた。

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)

[雑誌論文] (計 4件)

- ① Katsuya Ohashi, Takahiro Kabasawa, Tetsuya Ozeki, and Hiroaki Okada, One-step preparation of rifampicin/poly(lactic-co-glycolic acid) nano-article-containing mannitol microspheres using a four-fluid nozzle spray drier for inhalation therapy of tuberculosis, *J. Control. Release*, 135, 19-24, 2009, 査読有
- ② Takuto Mizoe, Tetsuya Ozeki, and Hiroaki Okada, Application of a four-fluid nozzle spray drier to prepare inhalable rifampicin-containing mannitol microparticles, *AAPS PharmSciTech*, 9, 755-761, 2008, 査読有
- ③ 尾関 哲也, 岡田 弘晃, ナノ粒子含有マイクロスフェアの設計と経肺投与製剤への応用、*薬剤学*, 66, 249-253, (2006) 査読無
- ④ 尾関 哲也, 岡田 弘晃, ナノ薬物粒子含有マイクロスフェアによる経肺投与DDS、*日本エアロゾル研究*, 21, 10-15, (2006) 査読有

[学会発表] (計 16件)

- ① 樺澤 尚宏, 尾関 哲也, 岩崎 泰憲, 鈴木 寧真, 吉田 一平, 三宅 正紀, 今井 康之, 岡田 弘晃, リファンピシン/PLGA ナノ粒子含有マンニトールマイクロスフェアの設計と肺胞マクロファージ内寄生菌に対する抗菌効果、日本薬学会第129年会、2009年3月26日、京都市、京都府
- ② 樺澤 尚宏, 渡辺 悦也, 尾関 哲也, 岡田 弘晃, 結核治療用マンノース修飾PLGA ナノ粒子の設計と肺胞マクロファージへの取り込み、日本薬学会第129年会、2009年3月26日、京都市、京都府

- ③ 尾関 哲也、岡田 弘晃、経肺投与用ナノ粒子含有マイクロスフェアのワンステップによる調製とその応用、第52回日本薬学会関東支部大会、2008年10月4日、野田市、千葉県
- ④ Daiki Kaneko, Tetsuya Ozeki, and Hiroaki Okada, Brain cancer therapy in rats using tumor-suppressor peptide, p53p-Ant, 35th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 15, 2008, New York, NY, USA.
- ⑤ Tetsuya Ozeki, Pharmaceutical application of polymeric and drug nanoparticles, Canadian Society of Pharmaceutical Sciences (CSPS) Symposium 2008, May 23, 2008, Banff, Alberta, Canada.
- ⑥ 榊澤 尚宏、中野 麻紀子、前田 千春、尾関 哲也、岡田 弘晃、結核治療用リファンピシン/PLGA ナノ粒子含有マイクロ粒子の in vivo 蛍光イメージングによる肺内分散性の評価、日本薬剤学会第23年会、2008年5月23日、札幌市、北海道
- ⑦ 榊澤 尚宏、大橋 克也、前田 千春、尾関 哲也、岡田 弘晃、結核治療用リファンピシン/PLGA ナノ粒子含有マニトールマイクロスフェアの設計と肺胞マクロファージへの取り込み評価、フィジカル・ファーマフォーラム2008、2008年3月24日、品川区、東京都
- ⑧ 榊澤 尚宏、大橋 克也、前田 千春、尾関 哲也、岡田 弘晃、リファンピシン/PLGA ナノ粒子含有マニトールマイクロ粒子の結核治療用経肺投与製剤としての応用、粉体工学会第24回製剤と粒子設計シンポジウム、2007年11月14日、浜松市、静岡県
- ⑨ Katsuya Ohashi, Takuto Mizoe, Takahiro Kabasawa, Tetsuya Ozeki, and Hiroaki Okada, One-step preparation of rifampicin/PLGA nanoparticles-containing microspheres using a 4-fluid nozzle spray drier for inhalation therapy of tuberculosis, 2007 AAPS Annual Meeting and Exposition, November 12, 2007, San Diego, CA, USA.
- ⑩ Tetsuya Ozeki, Design of nano-, microparticles delivery systems - Brain tumor therapy and one-step nanoparticles preparation, The BK21 International Symposium, September 10, 2007, Gwangji, Korea.
- ⑪ Daiki Kaneko, Ko Tanaka, Kosuke Hashizawa, Tetsuya Ozeki, and Hiroaki Okada, Brain cancer therapy in rats by combination use of PLGA microspheres containing anti-cancer drugs and thermoreversible gelation polymer, 34th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, July 9, 2007, Long Beach, CA, USA.
- ⑫ 金子 大樹、尾関 哲也、岡田 弘晃、脳腫瘍に対するがん抑制ペプチド p53p-Ant を用いた治療効果、日本薬剤学会第22年会、2007年5月21日、さいたま市、埼玉県
- ⑬ Tetsuya Ozeki, Novel nanoparticles delivery system and its pharmaceutical application, The 3rd Korea-Japan Joint Symposium on Drug Delivery and Therapy, April 21, 2006, Seoul, Korea.
- ⑭ 尾関 哲也、岡田 弘晃、ナノ・マイクロ粒子設計のためのニューテクノロジーと製剤への応用、製剤機械技術研究会第15回講演会2006年8月25日、東京都
- ⑮ Tetsuya Ozeki, Polymeric/drug nanoparticles delivery systems and its pharmaceutical applications, International Mini-symposium for Nano-Bio Drug Delivery System, September 1, 2006, Seoul, Korea.
- ⑯ Tetsuya Ozeki, Shuji Beppu, Takuto Mizoe, Kosuke Hashizawa, Daiki Kaneko, and Hiroaki Okada, Polymeric/drug nano- microparticles delivery systems and their pharmaceutical applications, The 15th Nisshin Engineering Particle Technology International Seminar (NEPTIS-15) - Nano-Technology in Life Science, December 10, 2006, Awaji, Hyogo, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾関 哲也 (OZEKI TETSUYA)
東京薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：60277259

(2) 研究分担者

岡田 弘晃 (OKADA HIROAKI)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：10339096

(3) 連携研究者

なし