

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06598

研究課題名(和文) 肝局所薬物動態と治療効果の最適化を図る製剤設計に基づく二層型シート製剤の開発

研究課題名(英文) Development of two-layer sheet formulation to improve local disposition and therapeutic effect of anticancer drug

研究代表者

西田 孝洋 (NISHIDA, Koyo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号：20237704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：臓器表面投与法の化学療法への臨床応用を目指し、抗癌薬doxorubicin(DOX)および添加剤を含有した二層型シート製剤を作製し、皮下担癌モデルマウスに適用した際の薬物動態と抗腫瘍効果を検証した。シート製剤貼付により、腫瘍部位への選択的な移行と効果および副作用軽減が期待された。製剤最適化のために肝臓表面からの薬物吸収と分布に関する動態情報は不可欠であるため、本研究課題では各種マーカー物質を用いて評価した。さらに、蛍光を有する抗癌薬Doxに着目し、脂質膜を保持して迅速な透明化を可能にする試薬を用いた組織透明化法によって肝臓表面投与後の肝臓内薬物空間分布を解析できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の投与方法の既存概念にとらわれず、局所動態・薬効の特性に優れたDDS (Drug Delivery System) 製剤を開発する斬新な発想に特色を有している。本研究課題において、二層型シート製剤の腹腔内臓器表面(肝臓、脾臓、腎臓など)への貼付により複数の抗癌薬や併用剤で癌病巣を選択的に治療する新しいDDSを確立できれば、従来は重篤な副作用や安定性に問題がある抗癌薬においては、臨床での適用拡大につながる可能性がある。さらに斬新な投与方法に関する検討が、外科手術後の腹膜播種の補助療法や腹膜硬化症などの難治性疾患に対する標的細胞選択的な遺伝子治療の確立にも寄与できるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：To apply the new administration system to the peritoneal organ surface for chemotherapy, we have tried to produce a two-layer sheet including anticancer drug doxorubicin and formulation additives, and examined the drug disposition and anticancer effect after application to the subcutaneous tumor model mouse. We could observe selective drug accumulation in the tumor, significant anticancer effect and less side-effect. In addition, we have examined the drug absorption and distribution of a drug after application to the liver surface in detail. We could analyze the spatial distribution of doxorubicin by utilizing new transparency agent.

研究分野：薬剤学

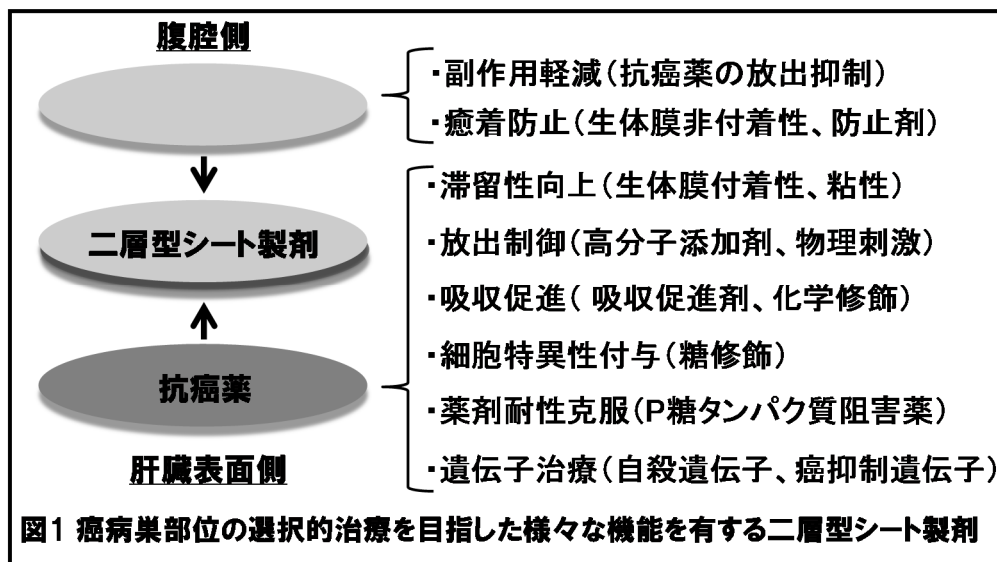
キーワード：コントロールドリリース 癌化学療法

1. 研究開始当初の背景

肝癌は早期発見が困難で、癌病巣部位を外科的に切除できない臨床例が多く、その死亡率は極めて高い。癌治療では、全身や臓器内非病巣への抗癌薬の分布に伴う重篤な副作用が大きな障壁となっている。肝癌の治療においても、病巣部位に抗癌薬を送達させる研究が、国内外で活発に展開されているものの、静注など一般的な投与方法では、肝臓全体へ薬物が一様に分布する。したがって、薬物の化学的、製剤学的修飾によるドラッグデリバリーシステム (Drug delivery System, DDS) の手法では、病巣部位における薬物濃度の精密なコントロールは難しいのが現状である。そこで、従来の血管系を介した投与方法の既成概念にとらわれない斬新な発想が必要となる。

肝癌に対する化学療法では、これまでに経カテーテル動脈塞栓療法など様々な投与の工夫が試みられている。しかし、血管系を介する投与であるため、全身や臓器内非病巣への抗癌薬の分布に伴う重篤な副作用の発現が大きな問題となっている。抗癌薬を直接癌病巣部位に注射する治療法も試みられているが、注射に伴う臓器への傷害性の課題が残されており、低侵襲的な治療法の開発が強く望まれている。

研究代表者は、投与経路や形態を工夫する DDS に着目し、腹腔内の肝臓表面から肝細胞内部へ薬物を浸透させる投与形態では、病巣部位近傍に薬物が滞留する可能性が極めて高いと推測した。肝臓に貼付するガラス製の拡散セルを用いて、ラット肝臓表面からの薬物吸収を評価する実験系をまず構築し、肝臓表面からの薬物吸収・分布特性および肝臓表面への薬物投与に最適な製剤の基本条件を明らかにした。さらに遺伝子治療薬への展開に関して、新規投与形態に基づく DDS としての臓器表面投与の有用性を示してきた。腹腔内の臓器表面からの薬物吸収を利用する投与形態の可能性を検証してきた一連の研究において、製剤自体の腹腔内での滞留性向上が臨床応用へ向けた重要な課題であることが示唆された。肝臓内病巣での治療効果を増強し、副作用を軽減できる臨床応用可能な DDS 製剤の開発が急務となる。そこで次の段階として、癌病巣へ安全に直接貼付できる、抗癌薬を含有させたシート状製剤の開発を企図した (図 1)。シート状の製剤により、抗癌薬が長期間にわたり局所で徐々に放出することで、薬効を持続でき肝臓の正常部位での副作用が軽減することが予想される。また、シート状製剤を二層型にすることで、腹腔側への抗癌薬の漏出を防ぐことも可能である。



一方、これまでの DDS 製剤の開発において、病巣部位における空間的・時間的な薬物濃度・効果を精密にコントロールした例はない。そこで、組織透明化の手法を活用して、局所薬物動態の詳細な解析を試みる。このように合理的に製剤設計した DDS 製剤により、治療効果の有意な向上や肝癌周辺での再発・合併症や転移の防止が期待でき、癌化学療法上の意義は高く、社会に大きく貢献できる。

2. 研究の目的

本研究課題では、血管系ではなく腹腔内の臓器表面に二層型シート製剤を貼付して、癌病巣部位に抗癌薬を長期間滞留させ、腹腔への薬物漏出も抑制することで、薬効の向上と副作用軽減を目的としている。臓器表面に貼付するための二層型シート製剤を数種類作製し、理想的な抗癌薬の放出速度を有するものを選別する。その二層型シート製剤を担癌モデル動物の癌病巣に貼付し、癌に対する治療効果・副作用と肝臓内動態との関係を、組織透明化を駆使して空間的・時間的に解析し、製剤設計の基本的指針を得る。

第一段階として、臓器表面投与法の化学療法への臨床応用を目指し、抗がん薬

doxorubicin(DOX)および添加剤を含有した二層型シート製剤を作製し、皮下担癌モデルマウスに適用した際の薬物動態と抗腫瘍効果を検証した。製剤の最適化には臓器表面からの薬物吸収と分布に関する動態情報は不可欠である。そこで第二段階として、各種マーカー物質を用いて臓器表面からの薬物吸収と分布を評価した。さらに、蛍光を有する抗癌薬 DOX に着目し、脂質膜を保持して迅速な透明化を可能にする試薬 Seebest(Fumoto et al, Pharmaceuticals, E1070, 2020)を用いた組織透明化法によって肝臓表面投与後の肝臓内薬物空間分布を解析した。

3. 研究の方法

(二層型シート製剤の担癌モデルマウスでの動態と抗腫瘍効果)

シート製剤の基剤には、生分解性高分子 poly (D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA)を用い、添加剤として polyethylene glycol (PEG) を選択した。PLGA 溶液をガラス製の円筒に滴下し一層目とし風乾させた。続いて DOX、PLGA および PEG の混合液を滴下し二層目とし、乾燥後、直径 12 mm の半円に切り取り PLGA のみのカバー(薬物非含有シート)と重ね合わせ、二層型とした。C57BL/6J 雄性マウスの皮下あるいは腫瘍にシート製剤を貼付し、1, 3, 6 日後の DOX の貼付部位、肝臓、腎臓、脾臓、肺、心臓、血漿中濃度を分光蛍光光度計により定量した。

(DOX およびマーカー物質の肝臓表面投与後の分布)

ICR 雄性マウスの肝臓にガラス製拡散セルを貼付し、DOX や FITC-デキストランなど各種マーカー物質を拡散セル内に滴下した。一定時間後に拡散セル内残存液、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、血漿中の薬物濃度を測定した。LSA 後の肝臓内薬物分布の比較には蛍光実体顕微鏡を用いた。また、LSA 後の肝臓を Seebest に 2 時間浸漬して組織透明化後、共焦点レーザー顕微鏡で肝臓内 DOX 空間分布を評価した。

4. 研究成果

(二層型シート製剤の担癌モデルマウスでの動態と抗腫瘍効果)

DOX 含有量、基剤量、添加剤含有量等を総合的に判断して 15%PEG を添加剤として併用したシート製剤の作製に成功した。作製したシート製剤を in vivo で動物に貼付する前に、シート製剤からの DOX の放出性を評価する必要がある。そこで in vitro においてシート製剤からの薬物放出性の評価を行った。今回作製したシート製剤は PEG をシート内に 15% (w/w) 含有した DOX 含有二層型シート製剤である。初期バーストが見られたものの、DOX は 6 日後まで持続放出が確認された。高い放出性と持続放出が得られる PEG は持続性シート製剤を開発していく上で有用な添加剤であることが示唆された。

次の段階として、DOX 含有二層型シート製剤を腫瘍部位に適用し、DOX の体内分布評価を行うことは、抗腫瘍効果の評価を行う上で有益な知見になると考えられる。今後シート製剤の消化器癌への適用を目指すにあたり、腫瘍部位に適用した際の抗腫瘍効果を評価していく必要がある。腫瘍が表面に生じることで腫瘍径による評価が簡便で、かつ担癌モデルマウスとして汎用される皮下担癌モデルマウスを作製し、シート製剤設計に向けた評価を行った。今回はシートの組成を一種類に固定し、正常マウスの皮下あるいは皮下担癌モデルマウスの腫瘍表面に適用し、結果を比較した。

シート製剤を正常マウスの皮下に貼付 1, 3, 6 日後のいずれにおいても、投与部位である皮下選択的に DOX が分布していることが明らかとなった。また、DOX の副作用が問題となる心臓においては低い分布が見られた。さらに血漿においても DOX は低い分布を示しており、血漿中への移行が抑制できることが示された。また、シート製剤からの持続放出により、貼付 6 日後まで DOX が観察された。一方、シート製剤を皮下担癌モデルマウスの腫瘍部位に貼付後 1 週間後においても貼付部位直下である腫瘍部位選択的に DOX が分布した。心臓・血漿においても正常マウス同様低い DOX 濃度となり、副作用の軽減につながると考えられる。

さらに、シート製剤の処置群は未処置群と比較して約 9 倍に腫瘍体積が低下し、シート製剤貼付による抗腫瘍効果が確認できた。したがって、シート製剤貼付により、腫瘍部位への選択的な移行および副作用軽減が期待される。

(DOX およびマーカー物質の肝臓表面投与後の分布)

マウスの肝臓表面からいずれのマーカー物質についても一次速度式に従い吸収され、良好な薬物吸収が認められた。マウスにおいては、分子量の増大に伴い肝臓表面からの吸収率が低下する傾向があり、透過係数と分子量の平方根の逆数には良好な相関が見られた。

マウスへの各マーカー物質の肝臓表面投与では、拡散セル貼付葉である applied lobe に選択的な薬物分布が見られ、到達深度は分子量に応じて変化した。DOX 投与群においては、applied lobe の濃度は non-applied lobe の 7.3 倍高かった。他の投与経路(静注、腹腔内注射)では applied lobe と non-applied lobe の DOX 濃度に有意な変化はなかったのに対し、LSA では、applied lobe の DOX 濃度が non-applied lobe よりも 7.3 倍高く、有意に高かった。また、肝臓以外の臓器に着目すると、静注、腹腔内注射では applied lobe と有意な差は見られなかったが、LSA は applied lobe に対し他臓器の DOX 濃度は有意に低くなった。

さらに、組織透明化法による肝臓表面投与後の肝臓内 DOX の空間分布と血管構造の可視化に成功した。血管近傍において DOX が肝臓表面から深部方向へ約 300 μm 到達していることが観察

できた。その大きさより DOX は細胞内の核に集積していると考えられ、LSA 後の肝臓において Dox の分布は血管構造と関係があることが予想される。血管の部分に沿って DOX の深度が大きくなることが確認できた。したがって、臓器表面投与後の薬物空間分布の可視化に初めて成功し、今後の製剤設計を進める上で有益な知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Peng JQ, Fumoto S, Suga T, Miyamoto H, Kuroda N, Kawakami S, Nishida K	4. 巻 302
2. 論文標題 Targeted co-delivery of protein and drug to a tumor in vivo by sophisticated RGD-modified lipid-calcium carbonate nanoparticles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Control Release	6. 最初と最後の頁 42-53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jconrel.2019.03.021	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 該当する

1. 著者名 Miyamoto H, Tsuda K, Honda T, Tokunaga A, Fumoto S, Nishida K	4. 巻 43
2. 論文標題 Influence of liver intoxication by carbon tetrachloride or D-galactosamine on absorption of fluorescein isothiocyanate-dextran-10 and other marker compounds with different molecular weights from the rat liver surface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 319-324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00686	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wang S, Fumoto S, Miyamoto H, Tanaka M, Nishida K	4. 巻 548
2. 論文標題 Edaravone, a cytoprotective drug, enhances transgene expression mediated by lipoplexes in HepG2 cells and mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Pharm	6. 最初と最後の頁 173-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpharm.2018.06.068	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 Nishida K, Fumoto S	4. 巻 33
2. 論文標題 臓器表面投与法 - 消化器疾患に対する新たなDDS	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 270-276
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西田孝洋、田中里奈子、宮元敬天、麓伸太郎
2. 発表標題 組織透明化法による肝臓表面投与後の肝臓内Doxorubicinの空間分布評価
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田孝洋、赤城友章、松本真由子、佐田ひかり、宮元敬天、麓伸太郎
2. 発表標題 Doxorubicin含有肝臓表面適用二層型シート製剤からの薬物放出性と体内分布に及ぼす添加剤の影響
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田孝洋、濱崎久司、前田理恵、宮元敬天、麓伸太郎
2. 発表標題 5-Fluorouracilと代謝阻害剤を含有した肝臓表面適用二層型シート製剤の作製と肝臓内動態評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎大学薬学分野ホームページ http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/dds/index.html

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