

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06611

研究課題名（和文）潰瘍性大腸炎の寛解根治を目的とした経口投与型核酸医薬送達用ナノ粒子製剤の設計

研究課題名（英文）Design of nanoparticle as orally nucleic acid medicine delivery for treatment of inflammatory bowel disease

研究代表者

山本 浩充（Yamamoto, Hiromitsu）

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：30275094

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）：高分子ナノ粒子や高分子ミセルの組織浸透能を利用し、炎症性サイトカイン産生に関連するNF- $\kappa$ Bを抑制するオリゴデコイ核酸を封入したナノ粒子・ナノミセルを経口投与することで、困難とされてきた潰瘍性大腸炎を寛解根治可能とする経口投与型核酸医薬送達用新規高分子ナノ粒子・高分子ナノミセルDDS製剤の開発を目的として実施した。粒子径が微細なナノ高分子ミセルは高分子ナノ粒子に比べ高い組織移行性を示し、キトサン修飾することでその割合は更に向上した。デコイ核酸をカチオン性脂質と複合化することにより、ナノ粒子への薬物封入率が向上した。デコイ核酸封入ナノ粒子を投与することにより、サイトカイン産生が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高分子ミセルや高分子ナノ粒子へ、デコイ核酸を効率よく封入する調製法を確立した。この調製法はsiRNAやプラスミドDNAなどの核酸医薬に広く適用可能であり、様々な疾患の治療に応用できる。また、より微細な粒子である程、消化管組織への分布量が多くなることを示し、薬物送達の効率化ならびに薬物の作用時間の持続化も期待できることを明らかにした。病気に苦しむ多くの患者に有益な成果をもたらす有意義な結果を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop a new polymeric nanoparticle/polymeric nanomicelle DDS formulation for orally administered nucleic acid drug delivery that utilizes the tissue penetration ability of polymeric nanoparticles and polymeric micelles to orally administer nanoparticles/nanomicelles encapsulating oligodecoy nucleic acids that suppress NF- $\kappa$ B, which is related to inflammatory cytokine production, and that can achieve remission and complete cure of ulcerative colitis, which has been considered difficult to treat. Nanopolymer micelles with fine particle size show higher tissue migration than polymeric nanoparticles, and this rate was further improved by modifying them with chitosan. The drug encapsulation rate in the nanoparticles was improved by complexing the decoy nucleic acid with cationic lipids. Cytokine production was suppressed by administering nanoparticles encapsulating decoy nucleic acids.

研究分野：物理系薬学

キーワード：潰瘍性大腸炎 高分子ナノ粒子 高分子ミセル デコイ核酸 エマルション溶媒拡散法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

難治性炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎は、1973年より厚生労働省の特定疾患治療研究対象疾患のひとつに指定されている。国内での患者数も増加傾向にあり、平成20年度において約10万人で、毎年5,000人前後増加している。潰瘍性大腸炎とは、大腸粘膜に炎症が起こり、潰瘍ができる病気である。大腸において炎症が起こるため、下痢や粘血便、発熱や体重減少などの症状があらわれ、患者の生活の質(QOL)を著しく低下させてしまう。潰瘍性大腸炎の病因については、厚生労働省の特定疾患調査研究班により研究が進められており、自己免疫異常がその要因の一つとされている。病状は、寛解期と活動期を繰り返し、長期にわたって治療を受けなければならない。潰瘍性大腸炎の治療には、活動期に行われる寛解導入療法と寛解期に行われる寛解維持療法がある。これらの治療に用いられてきた従来の薬物治療法では、重篤な副作用の発現や症状の再発が問題となっている。例えば、現在、潰瘍性大腸炎の第一選択薬として、5-アミノサリチル酸製剤が広く用いられているが、下痢、腹痛、吐き気、発疹、頭痛などの重篤な副作用が生じる。このため、高い安全性と優れた治療効果を持つ画期的な医療薬の開発が求められていた。申請者らは、これまでに生体内分解性、生体適合性高分子であるポリ乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)を基剤としたサブミクロンサイズの薬物送達用ナノ粒子の開発に成功し、様々な治療法、投与経路の確立など、新規なドラッグデリバリーシステムの開発に取り組んできた。これら取り組みのうち、申請者らは、ナノ粒子に封入した核酸医薬が、一般的な遺伝子導入試薬に比べて、持続的な作用を示すこと、さらには、デキストラン硫酸ナトリウム水溶液の飲水により惹起させた潰瘍性大腸炎モデルラットに対して、NF- $\kappa$ B デコイオリゴ核酸を封入したナノ粒子を経口投与したところ、ナノ粒子が炎症部位に集積し、NF- $\kappa$ B デコイオリゴ核酸が炎症を引き起こしている細胞に取り込まれ、潰瘍性大腸炎の発症が抑制されることを世界で始めて明らかにした。さらに、胃(強酸)や小腸(生体内酵素)環境下でのオリゴデコイ核酸の分解を抑制可能であることも明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

本申請研究では、高分子ナノ粒子や高分子ミセルの組織浸透能を利用し、炎症性サイトカイン産生に関連する NF- $\kappa$ B を抑制するオリゴデコイ核酸を封入したナノ粒子・ナノミセルを経口投与により炎症部位に効率よく直接的に蓄積させ、炎症を惹起している細胞に取り込ませることで、デコイ核酸の抗炎症作用を発揮させる。細胞に導入されたオリゴデコイ核酸は、ナノ粒子・ナノミセルから徐放化されることにより、持続的な効果を発揮して炎症を長期間抑制する。これにより、従来困難とされてきた潰瘍性大腸炎を寛解根治可能な経口投与型核酸医薬送達用新規高分子ナノ粒子・高分子ナノミセル DDS 製剤の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

本申請研究では、デコイオリゴ核酸の送達性を高めた経口投与型 DDS 製剤を用いることで、潰瘍性大腸炎の寛解と再発防止を達成できることを明らかにする。このためには、従来検討してきた製剤に比べて、潰瘍性大腸炎病変組織へ効率よく送達する剤形を設計する必要がある。

#### (1) 大腸炎症部位への浸透性の向上

ナノ粒子サイズの微細化、高分子ミセルの利用、表面特性の最適化などにより、大腸炎症部位への浸透性を最大限に高める。これには、潰瘍性大腸炎を惹起したモデルラットに対し、蛍光標識したナノ粒子製剤を投与し、ナノ粒子の炎症部位への浸透性を、共焦点レーザー顕微鏡を用いた定性的な解析ならびに蛍光光度計を用いた定量的な解析を行う。

#### (2) デコイ核酸の細胞内への送達性改善

申請者らは、カチオン性高分子と非イオン性界面活性剤でナノ粒子表面をハイブリッドコーティングすることで、細胞への取り込み量が向上することを明らかにしている。

この特性を利用し、(1)の大腸炎症部位への浸透性とデコイ核酸を細胞内への送達能の両機能を併せ持つナノ粒子製剤の設計を行う。

#### (3) ナノ粒子製剤の抗炎症効果

オリゴデコイ核酸を封入したナノ粒子の炎症性サイトカイン発現抑制効果を評価する。

### 4. 研究成果

#### 1) ナノ粒子・ナノミセルの消化管内分布

潰瘍性大腸炎のモデルラットとしてドデシル硫酸ナトリウムを溶解させた水を1週間自由引水させることにより作成した。炎症の発症の確認は、下痢様便と下血をスコア化した疾患活動指数(DAI)ならびに大腸の長さの短縮化から行った。DAIが上昇したモデルラットに対して、蛍光標識したキトサン修飾ポリ乳酸グリコール酸(PLGA)ナノ粒子(平均粒子径:約370nm)もしくは両親媒性高分子であるソルプラス®からなる高分子ミセル(平均粒子径:約120nm)をキトサン修飾した粒子懸濁液を投与した。その結果、粒子表面を修飾しているキトサンが胃粘膜との相互作用することにより、投与3時間後も粒子の半分以上が存在していることが定量的に観察された。その後、8時間、24時間と時間の経過とともに消化管上の粒子量は減少した。一方、対照となる未修飾のナノ粒子を投与した群では、投与3時間でほとんどの粒子は胃から排出され、小腸など

下部組織に移行していた。また、キトサンで修飾したソルプラス粒子は、PLGA ナノ粒子に比べて臓器への送達量の増大が観察された。潰瘍性大腸炎モデルラットは、Normal 群のラットに比べ、腸管の蠕動運動が遅延しているため、粒子経口投与後 14 時間経過した大腸でもナノ粒子が存在していることが観察された。ただし、今回の定量的な粒子挙動の解析では、盲腸部位および炎症が惹起されている大腸部位でのナノ粒子の蛍光強度は検出限界以下となり、評価することができなかった。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ナノ粒子を投与して 8 時間後の潰瘍性大腸炎惹起ラットの大腸を観察したところ、管腔側組織全体に、蛍光が観察されたことから、ナノ粒子自体は大腸組織に到達していることが確認された。

また、ナノ粒子粉末に腸溶性加工した粉末を投与したが、粉末が消化管中で希釈されたもしくは投与するために懸濁した水に腸溶性高分子が一部溶解したためか、ナノ粒子単独投与時と同様、盲腸や大腸におけるナノ粒子残存量を定量的に評価することはできなかった。

## 2) デコイ核酸のナノ粒子・ナノミセルへの封入

ナノ粒子へのデコイ核酸の PLGA ナノ粒子への封入に関しては、デコイ核酸では検出限界以下の封入率であった。これに対し、カチオン性脂質とデコイ核酸の複合体を形成させることで封入率が向上した。この傾向は高分子ミセルにおいても確認された。

## 3) デコイ核酸封入ナノ粒子・ナノミセルのサイトカイン産生抑制効果

培養細胞を用いた *in vitro* 評価系によりデコイ核酸(DN)を封入した PLGA ナノ粒子およびソルプラス高分子ミセルの抗炎症効果の評価を実施した。PLGA ナノ粒子投与群では、LPS 刺激に対して産生される炎症性サイトカインである IL-1、IL-6 の産生量を投与量依存的に減少させる効果が認められた。これに対し、ナノ粒子に封入していない Nakid デコイ核酸投与群では、炎症性サイトカインの発現減少は認められなかったことから、高分子ナノ粒子に封入して投与することでデコイ核酸を細胞内に送達でき、その効果が発揮されることが確認できた。一方、粒子径が高分子ナノ粒子よりも微細な高分子ミセル粒子の投与群では、炎症性サイトカインの発現減少作用は確認できなかった。高分子ミセル粒子においてデコイ核酸の効果が発揮されなかった理由として、高分子ミセルでは含有率が低く、デコイ核酸投与量を一致させて投与したものの、基剤の量が非常に多くなったことで高分子ミセルの細胞内取り込み効率が低下したことが要因として考えられた。

高分子ミセルへのデコイ核酸の封入率向上を試みた。デコイ核酸に対して複合化するカチオン性脂質である DOTAP 量が少ない場合、複合体の粒子径が小さくなるため、高分子ミセルとしての曲率などの関係からデコイ核酸の回収率及び含有率はともに高値を示した。一方、デコイ核酸に対して DOTAP の濃度比率が高い場合、1 分子のデコイ核酸に対して多くの DOTAP 分子が相互作用することでデコイ核酸の疎水性は向上するものの、複合体の粒子径が大きくなることで複合体が高分子ミセル内に収まりきらなくなり、回収率及び含有率ともに低値を示した。細胞が産生する炎症性サイトカイン発現抑制効果について、デコイ核酸封入ナノ粒子を取り込ませた際の抑制効果についてバラツキが大きくなる現象が発生し、これには炎症を惹起するために用いたリポポリサッカライド(LPS)を作用させてからサイトカイン産生量を定量するまでの評価時間が関係していることが明らかになった。これまで、サンプル採取の時間を 24 時間インキュベートしてから実施していたが、LPS 刺激に対してサイトカイン産生量が増加する期間はそれよりも短時間で起こり、従来のサンプリング時間までに産生されたサイトカイン量が低下する群が一部存在した。このため、サイトカイン産生抑制能が無い製剤投与群との間で有意な差が認められない状態となっていた。4 時間のサンプリング時間で測定することにより、デコイ核酸を封入したナノ粒子投与群において、サイトカイン産生の抑制効果を確認することができた。

今後、更に研究を進め、目標とする潰瘍性大腸炎の治療を可能にする製剤設計を実現したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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