

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07156

研究課題名(和文)多機能性経肺投与型ナノ微粒子を基盤とした難治性肺がんに対する遺伝子・核酸医薬開発

研究課題名(英文)Development of gene and nucleic acid medicines for lung cancer based on the multifunctional pulmonary nanoparticles

研究代表者

兒玉 幸修 (Kodama, Yukinobu)

長崎大学・病院(医学系)・准教授

研究者番号：50448510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多機能性経肺投与型ナノ微粒子を基盤とした肺がん治療薬の開発を行った。pDNA、dendrigrraft poly-L-lysine、 $\gamma$ -polyglutamic acidを最適な混合比で組み合わせることで、肺胞マクロファージに高効率に取り込まれるナノ微粒子を構築した。微粒子をマウスに経肺投与したところ、肺胞マクロファージや肺胞上皮型細胞で高い遺伝子発現を示した。メラノーマDNAワクチンへ応用した結果、免疫を賦活し、肺転移を抑制した。腫瘍に關与するタンパク質に対するsiRNAへ応用した結果、肺転移を有意に抑制した。このナノ微粒子は幅広い肺がん治療薬に寄与できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、肺に選択的に送達できる経肺投与型のナノ微粒子の調製に成功した。このナノ微粒子は肺胞マクロファージや肺胞上皮型細胞に良好に取り込まれ、遺伝子発現することができるため、肺がんに対するワクチン開発へ応用可能である。また、siRNAへも応用できたため、肺がん治療薬としても期待される。既存の経口剤や注射薬に加え、新たな投与経路として吸入型のがん治療薬の開発へ発展できる可能性があると考えている。さらに、他の肺疾患にも応用できる可能性もあるため、幅広い医療貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed gene and nucleic acid medicines for lung cancer based on multifunctional pulmonary nanoparticles. We constructed nanoparticles which are efficiently taken up by alveolar macrophages by optimizing the mixing ratio of pDNA, dendrigrraft poly-L-lysine, and  $\gamma$ -polyglutamic acid. Nano particles showed high gene expression in areas rich in alveolar macrophages and alveolar epithelial type II cells after pulmonary administration. High gene expression was selectively observed in areas rich in alveolar macrophages in mice after pulmonary administration of nanoparticles. As a result of applying it to a melanoma DNA vaccine, it stimulated immunity and suppressed lung metastasis. In addition, lung metastasis of melanoma was significantly suppressed after pulmonary administration of nanoparticles containing siRNA against proteins involved in tumor growth or metastasis. It was shown that these nanoparticles could contribute to a wide range of lung cancer drugs.

研究分野：医療薬学

キーワード：遺伝子デリバリー 経肺投与 ナノ微粒子 遺伝子・核酸医薬

## 1. 研究開始当初の背景

日本における死因の第1位はがんであり、中でも肺がんはがん死亡原因として最多である。

近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬により一部の肺がんに対しては治療効果の改善がみられているが、分子標的薬では耐性化による再発が問題となっており、免疫チェックポイント阻害薬では全く効果を示さない患者が一定数いることが問題となっている。

また、小細胞肺がんなど、肺がんの中でも悪性度の高いがんにおいては30年以上も標準治療が変わっておらず、満足な治療成績が得られていない。多くのがん種において、がんとの長期共存が可能になってきているが、肺がんは未だに生存率が低く、特に小細胞がんは5年生存率が10%未満と予後不良である。したがって、難治性肺がんに対してはブレイクスルーとなるような新規治療薬の開発が喫緊の課題である。

近年、アンチセンス医薬や siRNA、DNA ワクチンなどの遺伝子・核酸医薬が、難治性がんに対する次世代治療薬として期待されている。遺伝子・核酸医薬は既存医薬品では標的にできない分子を特異的に標的化でき、規格化・品質管理が容易で効果が高く、低分子医薬品と抗体医薬品の利点を併せ持つ。遺伝子・核酸医薬を組み合わせ、ネットワークのシグナルやタンパク質を同時に抑制することもできる。肺がんにおいても、増殖や転移に関連する遺伝子が明らかになってきており、遺伝子・核酸医薬で遺伝子レベルでの病態制御ができ、がんの増殖および転移抑制が可能となる。しかし、遺伝子・核酸医薬は安定性や膜透過性が極めて低く、細胞内への効率的な送達が難しい。とりわけ肺疾患においては肺選択的な安全な DDS 開発が必須となる。

研究代表者らは、生体適合性の高い成分を静電的に自己組織化させ、臓器特異的に薬物取り込みや遺伝子発現できる画期的なナノ微粒子製剤の開発に成功した。このナノ微粒子製剤は表面が負電荷で細胞毒性や血液凝集を示さず、構成成分の性質により定量的に標的臓器(肝臓、脾臓、肺)や細胞(がん細胞、樹状細胞、マクロファージなど)へ医薬品を送達することができる。さらに、この技術を応用・発展させ、肺胞マクロファージや肺がん細胞へ指向性を有するナノ微粒子製剤のプロトタイプを構築することに成功した。また、予備的検討ではあるが、免疫賦活作用および抗腫瘍効果を確認している。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、経肺投与により安全に遺伝子・核酸医薬を肺胞マクロファージや肺がん細胞へ選択的に作用させることができるナノ微粒子製剤のプロトタイプの構築に成功した。本研究では、このナノ微粒子を基盤とし、難治性肺がんに対する経肺投与型の遺伝子・核酸医薬の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) モデル遺伝子として、ルシフェラーゼをコードした pDNA (pCMV-Luc)、GFP をコードした pDNA (pEGFP-C1、pZsGreen1-N1) を用いた。pDNA とカチオン性高分子 (Dendrigrift poly-L-lysine: DGL)、アニオン性高分子 ( $\gamma$ -polyglutamic acid:  $\gamma$ -PGA) を様々な混合比で自己組織化させることでナノ微粒子製剤の構築を試みた。調製したナノ微粒子製剤の粒子径や表面電荷などの物理化学的性質を測定し、また、安定性を電気泳動などで調べた。

(2) マウスマクロファージ様細胞を用いて、ナノ微粒子製剤の細胞取り込みおよび遺伝子発現を調べた。

(3) マウスへナノ微粒子製剤を経肺投与した。投与後 24、48、72 時間に各臓器を摘出し、組織中のルシフェラーゼ活性を測定した。また、組織透明化法により、肺内分布を観察した。

(4) マウスメラノーマ DNA ワクチン (pUb-M) を内包したナノ微粒子製剤を経肺投与した。その後、メラノーマ細胞株 B16-F10 細胞を静脈内投与し、2週間後のメラノーマ肺転移を評価した。また、脾細胞からのサイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6) 分泌を測定した。

(5) siRNA としてホタルルシフェラーゼの発現を抑制する siRNA (siLuc)、蛍光標識した siRNA、腫瘍の増殖に関与するタンパク質に対する siRNA、腫瘍の転移に関与するタンパク質に対する siRNA を用いた。siRNA、DGL、 $\gamma$ -PGA を自己組織化させ、siRNA 内包ナノ微粒子製剤の構築を試みた。作製したナノ微粒子製剤の粒子径や表面電荷などの物理化学的性質を測定し、また、安定性を電気泳動などで調べた。

(6) マウスへナノ微粒子製剤を経肺投与し、肺内分布を評価した。

(7) 蛍光標識した siRNA、腫瘍の転移に関与するタンパク質に対する siRNA、腫瘍の増殖に関与するタンパク質に対する siRNA を用いて、ナノ微粒子を調製した。これらのナノ微粒子をメラノーマ肺転移モデルマウスに経肺投与し、肺転移の増殖を評価した。また、2種類の siRNA を内包したナノ微粒子も調製し、同様に経肺投与後の肺転移について評価した。

## 4. 研究成果

経肺投与可能なナノ微粒子製剤のプロトタイプの改良と基礎的評価を行った。pDNA、DGL、 $\gamma$ -PGA を最適な混合比で自己組織化させることにより、肺胞マクロファージに高効率に取り込

まれる経肺投与可能なナノ微粒子製剤の開発に成功した。製剤の粒子径と表面電荷を測定した結果、粒子径 100nm 未満で表面がアニオン性の微粒子を形成していることが明らかとなった。pCMV-Luc を用いてナノ微粒子製剤を作製し、マウスに経肺投与した結果、肺で選択的に高いルシフェラーゼ活性を示した。さらに、pEGFP-C1、pZsGreen1-N1 を内包したナノ微粒子を経肺投与後の詳細な組織分布について組織透明化法を用いて検討した結果、肺の中でも肺マクロファージや肺胞上皮II型細胞が豊富な部位に分布していることが確認された。

そこで、この製剤をメラノーマワクチンへ応用した。pUb-M を用いてナノ微粒子製剤を作製し、マウスに2週間間隔で3回経肺投与した。その後、最終投与から2週間後にマウスメラノーマ細胞株 B16-F10 を尾静脈内投与した。その結果、5%糖液を投与したコントロールおよび naked の pUb-M を投与したマウスでは肺転移が増殖したのに対し、pUb-M を内包したナノ微粒子製剤を投与したマウスでは肺転移が有意に抑制された(図1)。

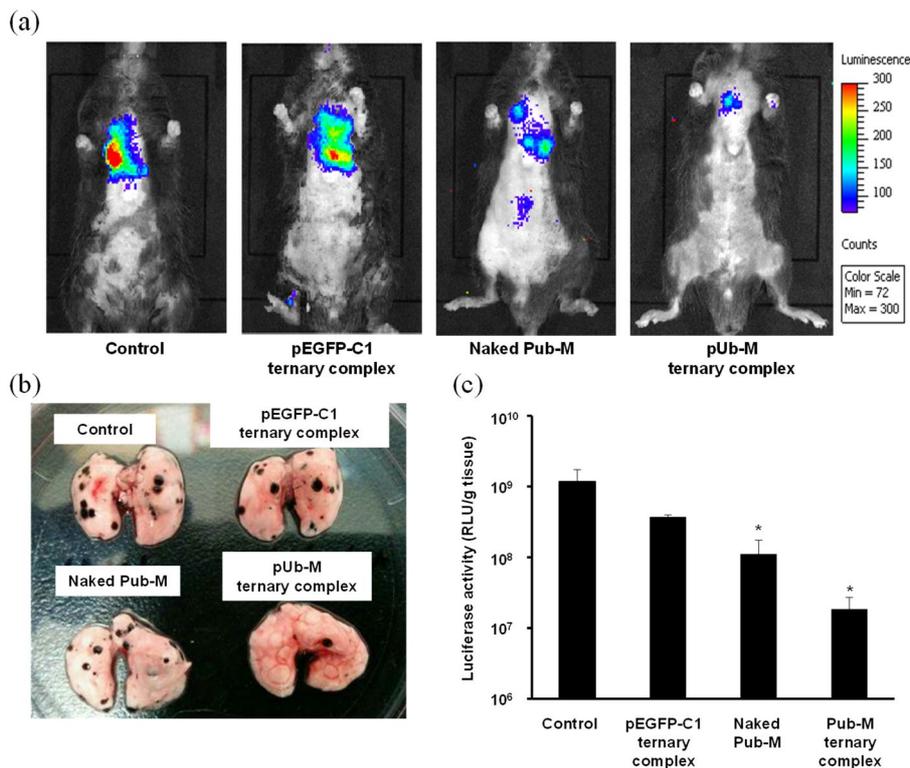


図1 メラノーマ DNA ワクチン内包ナノ微粒子の肺転移抑制効果  
(a) IVIS イメージング (b) 肺転移写真 (c) ルシフェラーゼ活性

また、免疫賦活効果を評価するために炎症性サイトカインを測定した結果、pUb-M を内包したナノ微粒子製剤を投与したマウスで TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 が有意に上昇していた(図2)。

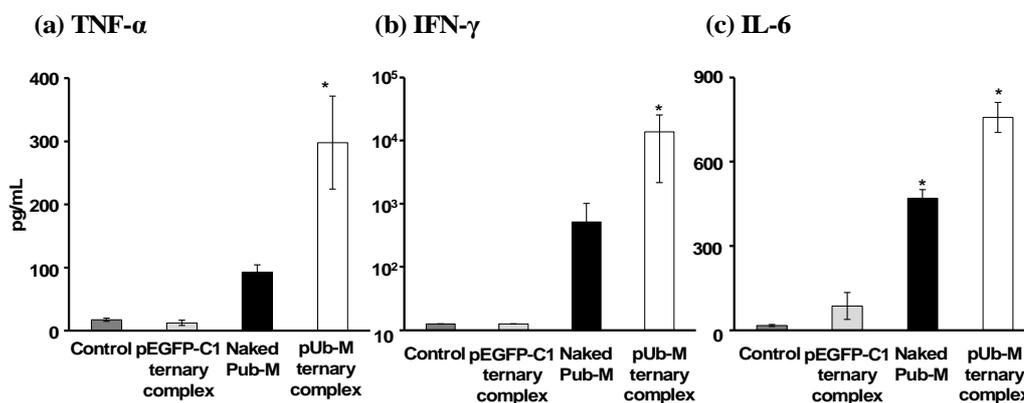


図2 脾細胞からのサイトカイン分泌 (a) TNF- $\alpha$  (b) IFN- $\gamma$  (c) IL-6

経肺投与可能なナノ微粒子製剤の siRNA への応用と基礎的評価を行った。様々な配合比で siRNA、DGL、 $\gamma$ -PGA を自己組織化させた結果、siRNA を内包した微粒子を調製することに成功した。微粒子の粒子径と表面電荷を測定したところ、粒子径 100nm 未満で表面がアニオン性の微粒子を形成していることが明らかとなった。また、蛍光標識した siRNA を内包したナノ微粒

子製剤を経肺投与した結果、肺に選択的に分布していることが確認された。

腫瘍の増殖に關与するタンパク質に対する siRNA を用いてナノ微粒子製剤を作製した。また、マウスメラノーマ細胞株 B16-F10 を尾静脈内投与し、メラノーマ肺転移モデルマウスを作製した。メラノーマ肺転移モデルマウスにナノ微粒子製剤を経肺投与し、メラノーマ肺転移の増殖を評価した。その結果、5%糖液を投与したコントロール、naked の siRNA を投与したマウス、効果のない siRNA を内包したナノ微粒子製剤を投与したマウスでは肺転移が増殖したのに対し、腫瘍の増殖に關与するタンパク質に対する siRNA を内包したナノ微粒子製剤を投与したマウスでは肺転移が有意に抑制された（図 3）。

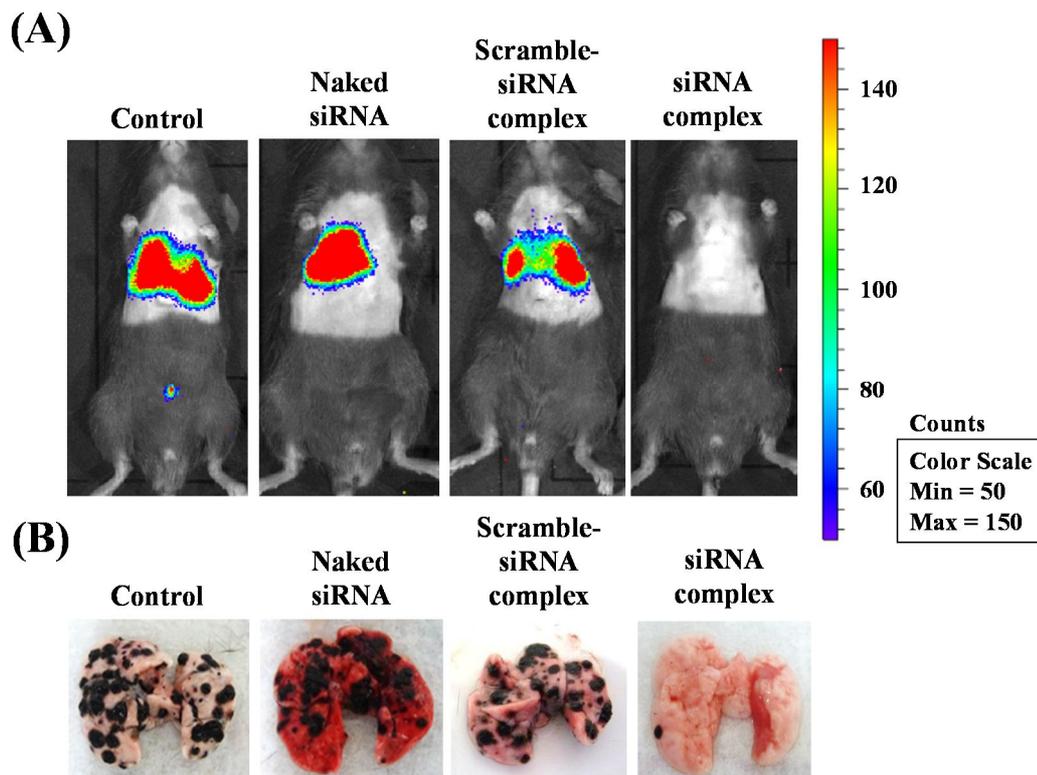


図 3 腫瘍の増殖に關与するタンパク質に対する siRNA 内包ナノ微粒子のメラノーマ肺転移抑制効果

(a) IVIS イメージング (b) 肺転移写真

腫瘍の転移に關与するタンパク質に対する siRNA を内包したナノ微粒子製剤をメラノーマ肺転移モデルマウスにナノ微粒子製剤を経肺投与し、メラノーマ肺転移の増殖を評価した。その結果、5%糖液を投与したコントロール、naked の siRNA を投与したマウス、効果のない siRNA を内包したナノ微粒子製剤を投与したマウスでは肺転移が増殖したのに対し、腫瘍の転移に關与するタンパク質に対する siRNA を内包したナノ微粒子製剤を投与したマウスでは肺転移が有意に抑制された。また、腫瘍の増殖に關与するタンパク質に対する siRNA を内包したナノ微粒子製剤と比較した結果、同程度の肺転移抑制効果を示した。

さらに、2 種類の siRNA を内包した微粒子の調製も試み、条件を最適化することでプロトタイプを調製することに成功した。大腸がん細胞を用いて予備的検討を行った結果、2 種類内包した微粒子は 1 種類しか内包していない微粒子と比較して増殖抑制効果が高い傾向にあった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kurosaki T, Kanda H, Hashizume J, Sato K, Harasawa H, Nakamura T, Sasaki H, Kodama Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Delivery of pDNA to the Lung by Lipopolyplexes Using N-Lauroylsarcosine and Effect on the Pulmonary Fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1983
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics13111983	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 Kodama Y, Tokunaga A, Hashizume J, Nakagawa H, Harasawa H, Kurosaki T, Nakamura T, Nishida K, Nakashima M, Hashida M, Kawakami S, Sasaki H.	4. 巻 28
2. 論文標題 Evaluation of transgene expression characteristics and DNA vaccination against melanoma metastasis of an intravenously injected ternary complex with biodegradable dendrigraft poly-L-lysine in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Delivery	6. 最初と最後の頁 542-549
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10717544.2021.1895904	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 Kurosaki T, Katafuchi Y, Hashizume J, Harasawa H, Nakagawa H, Nakashima M, Nakamura T, Yamashita C, Sasaki H, Kodama Y.	4. 巻 28
2. 論文標題 Induction of mucosal immunity by pulmonary administration of a cell-targeting nanoparticle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Delivery	6. 最初と最後の頁 1585-1593
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10717544.2021.1955040	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 Kodama Y, Nakashima M, Nagahara T, Oyama N, Hashizume J, Nakagawa H, Harasawa H, Muro T, Kurosaki T, Yamashita C, Hashida M, Kitahara T, Sasaki H, Kawakami S, Nakamura T	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of a DNA Vaccine for Melanoma Metastasis by Inhalation Based on an Analysis of Transgene Expression Characteristics of Naked pDNA and a Ternary Complex in Mouse Lung Tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics12060540	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 Hamada E, Kurosaki T, Hashizume J, Harasawa H, Nakagawa H, Nakamura T, Kodama Y, Sasaki H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Anionic Complex with Efficient Expression and Good Safety Profile for mRNA Delivery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13010126	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 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 濱田 英里、黒崎 友亮、兒玉 幸修、室 高広、中村 忠博、佐々木 均
2. 発表標題 RNAワクチン開発を目的としたmRNA内包三元複合体の開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 兒玉 幸修、佐々木 均
2. 発表標題 臨床薬学的視点により設計した 多機能型DDS製剤を基盤とする 核酸・遺伝子医薬の創出
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会年会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 兒玉 幸修、黒崎 友亮、佐々木 均
2. 発表標題 抗原提示細胞へ標的可能な DDS製剤を基盤とした 核酸ワクチンの開発と臨床応用
3. 学会等名 第90回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第63回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第68回日本化学療法学会西日本支部総会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 兒玉 幸修、黒崎 友亮、佐々木 均
2. 発表標題 多機能型生体適合性ナノ微粒子を基盤とした遺伝子・核酸医薬の開発と経肺投与への展開
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	川上 茂  (KAWAKAMI Shigeru)  (20322307)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授    (17301)	

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