

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16743

研究課題名（和文）ナノ粒子の形態変化を利用した新規薬物放出制御法の開発と核医学診断・治療への応用

研究課題名（英文）Development of novel method for radiotheranostics using controlled drug release system

研究代表者

宗兼 将之（Munekane, Masayuki）

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：80804806

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）：本研究では、「内水層に水溶性薬物を封入できるリポソーム」から「内水層を持たないナノディスク」へ粒子形態変化させることで薬物を放出させるという新たな機構の放出制御法を開発した。開発した新規薬物放出制御法は、形態変化惹起物質の濃度やリポソームの脂質組成により薬物放出性を制御できることを明らかにしたが、血清中での放出性は著しく低かった。生体直交型反応を利用した特異性の付与等も検討したが、血清中での放出性は改善できず、粒子形態変化惹起物質を用いた薬物放出制御法の実用化には、血清成分に阻害されない分子設計が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物放出制御法は、安価な低分子医薬品の体内動態を制御して薬効の増強、副作用の低減を可能とする優れた技術であり、新規薬物制御法の開発はわが国の医療福祉および医療経済に大きく貢献するものであり、本研究で得られた基礎的なデータは、新規薬物制御法の開発に貢献するものと期待される。また、本薬物放出制御法の核医学診断・治療への応用は、がんの精度の高い診断および安全性の高い治療を可能にする新規技術であり、わが国の医療福祉に貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel drug release system, where drugs were released by morphological changes from “liposomes with an aqueous layer where hydrophilic drugs were encapsulated” to “nanodiscs without an aqueous layer”. The drug release rate can be controlled by the concentration of morphological changes accelerating compounds and lipid composition of liposomes. However, the drug release rate was extremely low in serum. Although specific reaction with liposomes and morphological changes accelerating compounds was tried by using click chemistry, improved drug release was not observed. New molecular design where the drug release is not inhibited by serum components is needed for practical use.

研究分野：分子イメージング

キーワード：核医学診断・治療 リポソーム 薬物放出制御 ナノディスク

### 1. 研究開始当初の背景

リポソーム製剤は良好ながん集積性を示すため、低分子医薬品の体内動態を改善する優れた Drug Delivery System (DDS) 製剤であるが、リポソームからの薬物の放出が不十分で、十分な薬効が得られないことが欠点として挙げられる。それに対しこれまで、がん組織周辺の pH や酵素、光や熱等の外部刺激により放出させる例が報告されている (Lee Y. *et al.*, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2017, **9**, 1450 他)。しかしながら、治療効果の周辺環境への依存性や生体深部への透過性、生体への物理的なダメージ等の問題がある。これらの問題点をクリアできる新たな手法として本申請研究では、「内水層を持つリポソーム」から「内水層を持たないナノディスク」への粒子形態変化による薬物の放出制御法を開発する。

核医学診断は、非侵襲的に放射性医薬品の体内動態を可視化できる有用な手法で、放射性医薬品に利用する放射性核種を診断用から治療用に置換することで、核医学治療へも展開できる。リポソーム製剤は、がんへ高い集積性を示すため、放射性医薬品の母体としても有用であると考えられるが、リポソーム製剤の高い血中滞留性は、核医学診断における低い画像コントラストや治療における無用な副作用に繋がる。本研究で開発する薬物放出制御法は、全身(特に血中)で放出促進が可能であり、尿排泄性の放射性標識体を内封すれば、血中での放出後に速やかに尿中へ排泄されるため、核医学診断・治療へ応用することで、精度の高い診断、治療効果が高く副作用の少ない治療が可能になるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、「内水層に水溶性薬物を封入できるリポソーム」から「内水層を持たないナノディスク」へ粒子形態変化させることで薬物を放出させるという全く新しい機構の放出制御法を開発するとともに、本放出制御法を核医学診断・治療に応用することで、がんの精度の高い診断および治療効果が高く副作用の少ない治療を達成することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) リポソーム及びニオソームの作製

クロロホルムに溶解したリン脂質 (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC) または 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC))、コレステロール (Chol) 及び 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG) を混合し、クロロホルムを減圧留去した後、10 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 溶液により水和することでリポソームを作製した。水和後にプローブ型の超音波発生装置で超音波処理することでリポソームのサイズを調整した。また、リポソーム作製後にゲルろ過カラムにより精製することで、内水層のみに In-111 (<sup>111</sup>In) のキレート剤である DTPA が封入されたリポソームを作製した。ニオソームもリポソームと同様の方法で作製したが、原料として、Non-ionic surfactants (NIS)、Chol、dicetyl phosphate 及び DSPE-PEG を用いた。作製したリポソーム及びニオソームは、ゼータサイザーにて粒子径や膜表面の電位を表すゼータ電位の測定を行った。

#### (2) リポソーム及びニオソームの <sup>111</sup>In 標識 (<sup>111</sup>In-DTPA の内封)

酢酸バッファーに溶解した <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> 溶液に脂溶性キレート剤である oxine を混合し 40°C で 10 分インキュベートした後、DTPA 内封リポソーム及びニオソームを添加し、再度 40°C で 10 分インキュベートした (リポソーム膜を通過できる <sup>111</sup>In-oxine 錯体が内水層に移行し、安定度定数の高い DTPA に <sup>111</sup>In を受け渡すことで内水層に <sup>111</sup>In-DTPA を封入)。EDTA 溶液を加えて室温で 5 分インキュベートした後、ゲルろ過カラムにて精製を行い、標識率と純度を確認した。

#### (3) 粒子形態変化惹起物質による薬物放出性評価

作製した <sup>111</sup>In-DTPA 内封リポソーム及びニオソームに、PBS 及び血清中で種々の濃度の粒子形態変化惹起物質 (スチレンマレイン酸共重合体 (SMA)) を添加して、37 °C で 5 min インキュベートした。インキュベート後、ゲルろ過カラムにて高分子画分 (<sup>111</sup>In-DTPA 内封リポソーム) と低分子画分 (<sup>111</sup>In-DTPA) を分離した。分離した画分の放射能をガンマカウンタで測定して、放出率を算出した。

#### (4) 生体直交型反応を利用した薬物放出性評価

テトラジンとトランスシクロオクテンは生体直交型反応を起こす化合物の組み合わせとして知られており、本実験では、リポソームと SMA を特異的に反応させるために、まず、リポソームに組込むことができるテトラジン脂質と、トランスシクロオクテンを修飾した SMA を合成した。合成したテトラジン脂質を組込んだリポソームを (1) と同様の方法で作製し、(2) と同様の方法で標識を行った。また、テトラジン脂質含有リポソームとトランスシクロオクテン修飾 SMA を PBS または血清中で反応させ、(3) と同様の方法で  $^{111}\text{In}$ -DTPA の放出性を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) リポソーム及びニオソームの作製

作製したリポソーム及びニオソームの粒子径は、いずれも約 50 nm で、膜表面の電位を表すゼータ電位は 0 (中性) 付近であった。

#### (2) リポソーム及びニオソームの $^{111}\text{In}$ 標識 ( $^{111}\text{In}$ -DTPA の内封)

いずれのリポソーム及びニオソームも 90% 以上の高い標識率で標識が可能で、純度も 90% 以上と高い値を示した。

#### (3) 粒子形態変化惹起物質による薬物放出性評価

まず、作製した  $^{111}\text{In}$ -DTPA 内封リポソームに PBS 中で種々の濃度の SMA と反応させて放出性を評価したところ (図 1)、リン脂質として POPC を用いたリポソームの方が、DSPC を用いたリポソームよりも薬物放出性が高く、リン脂質の種類により薬物放出性が異なることを明らかにした。また、その放出性は、SMA の濃度に依存しており、リン脂質として POPC を用いたリポソームの方がより低濃度で高い放出率を示すことが分かった。リポソームの総脂質濃度 1 mM に対して、0.1 mM の SMA で 90% 以上の  $^{111}\text{In}$ -DTPA が放出された。

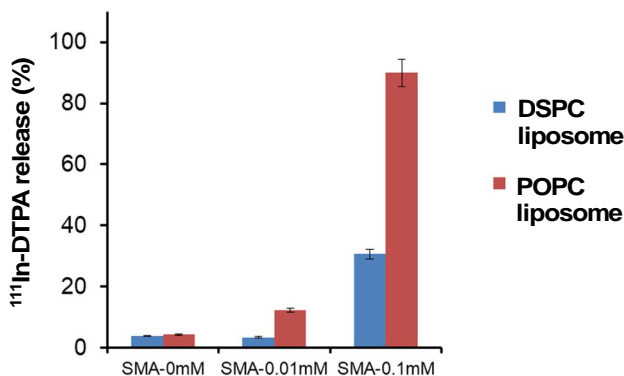


図 1. PBS 中で SMA を添加した際の  $^{111}\text{In}$ -DTPA 放出率

PBS 中で高い放出率が確認できた POPC リポソームを用いて、血清中での放出性を評価したところ、ほとんど放出が見られなかった。SMA の濃度を飽和濃度付近まで上昇させると放出率の上昇が確認できたが、それでも放出率は低く、血清中の成分と SMA が相互作用し、リポソームと反応しにくくなったと考えられた。

リポソームの脂質組成の違いが、薬物放出性に大きく影響を与えていたことから、リポソームを構成するリン脂質よりも安価で多様な種類が存在する NIS (非イオン性界面活性剤) から構成されるニオソームでも検討を行うこととした。NIS として、Span 20, 40, 60, 80 及び Brij 52, 72 を用いたニオソームを用いて評価を行ったが、POPC リポソームよりも高い放出性を示すニオソームを見出すことはできなかった。

#### (4) 生体直交型反応を利用した薬物放出性評価

(3) で血清中での薬物放出性が悪く、その原因が SMA と血清成分の相互作用によるものではないかと考えられたため、特異的に POPC リポソームと SMA を反応させるために、夾雑物存在下でも反応が進行することが知られている生体直交型反応を利用することとした。そこでまず、リポソームに組込むことができるテトラジン脂質と、トランスシクロオクテンを修飾した SMA を合成した。トランスシクロオクテン修飾 SMA に関しては、SMA 1 分子に対してトランスシクロオクテンが約 1 分子結合したものが合成できていることを NMR により確認した。これらを用いて薬物放出性を評価したところ、PBS 中ではほとんどの薬物を放出することが確認できたが、血清中ではほとんど放出が確認できなかった。

以上のように、本研究では、「内水層に水溶性薬物を封入できるリポソーム」から「内水層を持たないナノディスク」へ粒子形態変化させることで薬物を放出させるという新たな機構の放出制御法を開発した。開発した新規薬物放出制御法は、形態変化惹起物質の濃度やリポソームの脂質組成により薬物放出性を制御できることを明らかにしたが、血清中での放出性は著しく低かった。生体直交型反応を利用した特異性の付与等も検討したが、放出性は改善できず、粒子形態変化惹起物質を用いた薬物放出制御法の実用化には、血清成分に阻害されない分子設計が必要であると考えられた。そこで現在、温度応答性リポソームと組合せることで血清成分に阻害されずに薬物放出が可能な新たな分子設計を考案し、実証実験を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宗兼将之, 甘中健登, 佐野紘平, 山崎俊栄, 大河原賢一, 向 高弘
2. 発表標題 がん治療用DDSキャリアとしてのニオソームの評価
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宗兼将之, 小杉亜佐実, 甘中健登, 佐野紘平, 山崎俊栄, 大河原賢一, 向 高弘
2. 発表標題 核医学診断・治療薬の母体としてのニオソームの有用性評価
3. 学会等名 第61回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Munekane M., Kosugi A., Kannaka K., Sano K., Yamasaki T., Ogawara K.I., Mukai T.
2. 発表標題 Development of In-111-labeled niosomes for evaluation of pharmacokinetics of the niosomes.
3. 学会等名 SNMMI 2021 (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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