

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500410

研究課題名（和文） ダブルDDS製剤処方による新規C型肝炎治療法の確立

研究課題名（英文） Establishment of novel therapy for hepatitis C by double DDS drugs

研究代表者

石原 務（ISHIHARA TSUTOMU）

日本大学・工学部・准教授

研究者番号：70349554

研究成果の概要（和文）：

C型肝炎治療のための新規のリバビリンDDS製剤の開発を目指した。アラビノガラクトランを表面に被覆し、かつポリ乳酸コアにリバビリンを封入したナノ粒子を調製した。このナノ粒子をマウスに投与したところ、リバビリンの肝臓集積性の増大及び肝臓での長期に渡る徐放出効果（残留効果）が確認できた。よって、このナノ粒子は、肝臓へのターゲティング能と薬物徐放機能を兼ね備えた新規の肝炎治療製剤としての利用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Novel drug carrier for ribavirin was developed for treatment of chronic hepatitis C. Polymeric nanoparticles encapsulating ribavirin were prepared from arabinogalactan-poly(L-lysine) conjugates and poly(lactic acid). Ribavirin was specifically accumulated in the liver of mice and the amount of ribavirin was gradually decreased. Thus, it is expected that the nanoparticles are useful for treatment of chronic hepatitis C.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：ナノバイオロジー・ナノメディスン

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス感染者は、世界総人口の3%程度およそ1億7千万人にのぼり、日本においても約200万人に及ぶと推定されている。感染者の7～8割が慢性C型肝炎感染症に至り、慢性肝炎・肝硬変の主要な原因の一つになっており、肝硬変患者の3%程度が肝細胞癌へと進展する。C型肝炎ウイルス感染症の間

題点は高率で慢性化する点と最終的な病態像として癌を発症する点にあり、有効な治療法の確立が強く望まれている。

2. 研究の目的

これまでに、その治療薬としてインターフェロン(IFN)が用いられてきた。しかし、そのウイルス陰性化率（著効率）は24週投与

で 2%程度と非常に低かった。抗ウイルス薬として開発されたリバビリンは単独では、ほとんど有意な著効性を示さないが、IFN と併用投与することでその著効率は 20-30%に大きく向上する。一方、DDS の技術を利用することで、IFN にポリエチレングリコール(PEG)を化学修飾した PEG-IFN が開発されている。IFN に比べ血中滞留性が増大し、著効率も 48 週投与で 16%と IFN に比べ大きく向上することがわかっている。現在では、PEG-IFN とリバビリンの併用療法（商品名：ペグイントロン®+レボトル®、ペガシス®+コペガス®）が治療の中心となっており、その著効率は 48 週投与で 50%まで改善された。しかしながら、その治療には副作用を伴う。IFN による発熱などに加え、特にリバビリンによる溶血性貧血が大きな問題であり、治療を開始した患者のほぼ 100%で症状がみられ、その内 2 分の 1 程度が薬の減量や治療中止に至る。また、治療期間が長期(48 週)に及ぶことによる患者の生活の質(QOL)低下も懸念される。臨床研究段階では、プロテアーゼ阻害剤やポリメラーゼ阻害剤を更に併用することで治療効果が向上する旨の複数の報告がある。しかし、著効率は向上するもののリバビリンを用いている限り副作用(溶血性貧血)を回避することは困難である。

そこで、本申請では、リバビリンのナノ粒子化を試みることにした。溶血性貧血はリバビリンが赤血球に蓄積されることにより誘導されることが知られている。そこで、赤血球への相互作用を回避するために、リバビリンをナノ粒子の中に封入する。また、ウイルスが感染した肝実質細胞へ特異的かつ大量にリバビリンを集積させるために、肝実質細胞特異的ナリガンド分子(糖鎖)を粒子表面に修飾する。さらに、リバビリンをナノ粒子から徐放出することにより長期(1~2 週間)の薬理効果を誘導させる。現在リバビリンは 600mg を毎日 2 回経口服用されており、注射剤への処方の変更は患者の QOL を低めると予想される。しかしながら、併用剤である PEG-IFN は毎週 1 回の皮下注射製剤であるので、そのタイミングに併せリバビリン封入ナノ粒子製剤を静脈内投与すれば患者の QOL を損なうことはないと考えられる。

このように、本研究では、現在の治療法の諸問題を克服するために、既に DDS 製剤としてその有用性が認められている PEG-IFN に加え、リバビリンをも DDS 製剤化することで、新たな肝炎治療法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

リバビリンを封入したポリ乳酸ナノ粒子は、申請者らがこれまで確立してきた金属イオンを用いた O/W 型溶媒拡散法により調製し

た。調製したナノ粒子の粒子径やゼータ電位、薬物封入率を、それぞれ動的光散乱、HPLC により測定した。また、レクチンを用いた凝集試験をおこなうことで、ナノ粒子表面に糖鎖が露出していることを確認した。さらに、培養細胞を用いた細胞内移行試験や、動物を用いた体内動態試験、薬理効果試験をおこなった。

4. 研究成果

粒子調製の過程において、有機溶媒/金属イオンの種類/量など調製条件を様々に変えることで、リバビリンの粒子内への封入効率及び粒子径に及ぼす影響を評価した。その結果、リン酸基を導入したリバビリン-リン酸及び鉄イオンを pH 調整しながら同時に適量添加することで、リバビリンを多く含みかつ分散安定性が高いナノ粒子がえられることが明らかになった。また、肝実質細胞へ特異的かつ大量にリバビリンを集積させるため、肝実質細胞特異的ナリガンド分子であるアラビノガラクトサンの粒子表面への修飾を試みた。ポリアミノ酸であるポリリジンとアラビノガラクトサンを用い還元アミノ化反応によりポリリジン-アラビノガラクトサンコンジュゲートをえた。このコンジュゲートを混合しナノ粒子を同様に調製した。ナノ粒子のレクチンによる凝集観察の結果、アラビノガラクトタンがナノ粒子の表面に局在していることが明らかになった。したがって、このナノ粒子は、表面のアラビノガラクトタンによりウイルスの感染細胞である肝実質細胞にリバビリンを運搬できることが示唆された。

また、アラビノガラクトタンと同様、多糖であるプルランは分子量に依存して肝臓へ集積することが知られている。よって、アラビノガラクトタンとプルランのどちらがターゲットのためのリガンド分子として適しているかを比較した。様々なメーカーから市販されているプルランとアラビノガラクトタンを蛍光剤であるフルオレセインでラベルし、肝実質細胞の細胞株である HepG2 細胞への取り込みを評価した。その結果、東京化成製のプルランが細胞に最も多く取り込まれることがわかった。そこで、このプルランとポリリジンとのコンジュゲートを同様に合成した。これらのコンジュゲートを用い調製したナノ粒子のゼータ電位を測定したところ、多糖を使用していないナノ粒子は -49.8mV であったのに対し、プルランナノ粒子は -10.1mV、アラビノガラクトタンナノ粒子は -17.9mV であった。よって、ナノ粒子表面がプルランやアラビノガラクトタンで被覆されていることがわかった。

次に、ナノ粒子と HepG2 細胞との相互作用を検討するため、蛍光物質でラベルしたナノ粒子を作製した。ローダミン B イソチオシア

ネートをポリ乳酸末端に導入したアミノ基に結合させ、ポリ乳酸-ローダミンを得た。このポリマーを用い調製したナノ粒子と HepG2 細胞とをインキュベートし蛍光観察したところ、予想に反しアラビノガラクトサン被覆ナノ粒子よりプルラン被覆ナノ粒子の方が取り込みが少なかった。よって、プルランはアラビノガラクトサンよりもポリマーとしては細胞に取り込まれやすいが、ナノ粒子ではプルランよりもアラビノガラクトサンで被覆した方が取り込まれやすくなることが明らかになった。細胞内にとりこまれたリバビリン量を HPLC により定量したところ、ナノ粒子では 10 倍程度取り込み量を増大できることがわかった。また、WST アッセイによる細胞毒性試験からは、粒子濃度を極めて高くするとわずかな毒性が認められたもののナノ粒子の顕著な毒性は認められなかった。以上より、以後の試験ではアラビノガラクトサンで被覆したナノ粒子を製剤候補とした。

擬似生体液中でのナノ粒子からのリバビリンの放出挙動を解析したところ、リバビリンは初期バーストすることなく約 4 週間にわたり少しずつ粒子から漏出し徐放出が達成できていることが明らかになった。よって、ポリ乳酸内にリバビリンを封じ込めることで長期間にわたりその薬理効果を持続できると考えられる。

次に、このナノ粒子を用い動物の体内動態解析をおこなった。マウスを用いリバビリンの肝臓集積性を評価したところ、リバビリン水溶液を投与した場合に比べ、ナノ粒子では顕著に集積性が増大し全投与量の少なくとも 50% 程度を肝臓に集積できることがわかった。さらに、リバビリン水溶液では投与 1 日後には肝臓で検出できなかったのに対し、ナノ粒子では投与 7 日後においても全投与量の 25% 程度が残存していたことから、肝臓内でナノ粒子からリバビリンが徐放出されていることが示唆された。また、蛍光ラベルナノ粒子の投与 2 時間後に肝臓の凍結切片を蛍光観察したところ、ナノ粒子が主として肝実質細胞へ集積していることがわかった。

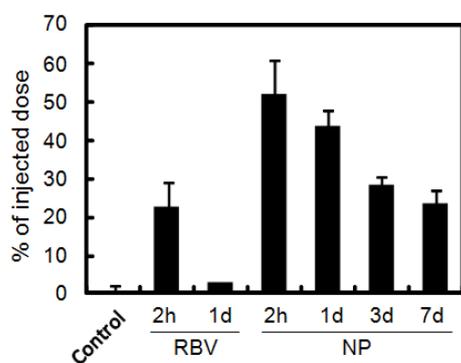


図 1 リバビリンの肝臓への集積 (RBV: リバビリン水溶液、NP: ナノ粒子)

さらに、このナノ粒子の薬理効果を検討した。ヒト肝実質細胞を移植したキメラマウス (PXB マウス、PhoenixBio 社) にヒト C 型肝炎ウイルス 1b を感染させることで、C 型肝炎モデル動物とした。PEG-IFN とリバビリン封入ナノ粒子、あるいは PEG-IFN とリバビリンを投与し、血清中のウイルス RNA 量からウイルス量を定量した。その結果、IFN と 20 分の 1 の量のリバビリンを含有したナノ粒子を投与した場合でも抗ウイルス効果が確認できた。しかしながら、今回の投与量では、IFN 単独投与でも強い抗ウイルス効果が認められ、リバビリン併用による相乗/相加効果が確認できず、明確なナノ粒子の有効性が判断できなかった。また、ナノ粒子を投与したマウスで体重減少は観察されずナノ粒子の毒性は認められなかった。

以上より、このナノ粒子は、肝臓へのターゲティング能と薬物徐放機能を兼ね備えていることがわかった。しかしながら、疾患モデル動物での試験からは、顕著な薬理効果が確認されておらず、投与量・投与間隔などの条件を再設定することにより更に検討を進めていく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Ishihara T, Takasaki N, Yamamoto S, Hayashi E, Takenaga M, Yamakawa N, Ishihara T, Mizushima T. Prostaglandin E1-encapsulated nanoparticles improve walking activity in an experimental rat model of intermittent claudication, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. in press (査読有)
- ② Saito Y, Miyamoto S, Suzuki A, Matsumoto K, Ishihara T, Saito I. Fluorescent nucleosides with 'on-off' switching function, pH-responsive fluorescent uridine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 15: 2753-2756. (2012) (査読有)
- ③ Ayano E, Karaki M, Ishihara T, Kanazawa H, Okano T. Poly (N-isopropylacrylamide)-PLA and PLA blend nanoparticles for temperature-controllable drug release and intracellular uptake. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 99:67-73. (2012) (査読有)
- ④ Ishihara T, Kano A., Obara K., Saito M., Chen X., Park T.G., Akaike T., Maruyama A. Nuclear localization and antisense effect of PNA internalized by ASGP-R-mediated endocytosis with protein/DNA conjugates. *J Control Release*, 155: 34-39 (2011) (査読有)
- ⑤ Sakai T., Ishihara T, Higaki M.,

Akiyama G., Tsuneoka H. Therapeutic effect of stealth-type polymeric nanoparticles with encapsulated betamethasone phosphate on experimental autoimmune uveoretinitis. Invest Ophthalmol Vis Sci., 52: 1516-1521 (2011) (査読有)

⑥ Horie R., Sakamoto T., Nakagawa T., Ishihara T., Higaki M., Ito J. Stealth-nanoparticle strategy for enhancing the efficacy of steroids in mice with noise-induced hearing loss. Nanomedicine(Lond), 5:1331-40 (2010) (査読有)

⑦ Takenaga M, Ishihara T., Ohta Y, Tokura Y, Hamaguchi A, Igarashi R, Mizushima T. Nano PGE1 promoted the recovery from spinal cord injury-induced motor dysfunction through its accumulation and sustained release. J Control. Release, 148: 249-254 (2010) (査読有)

⑧ Ishihara T., Maeda T., Sakamoto H., Takasaki N., Shigyo M., Ishida T., Kiwada H., Mizushima Y., Mizushima T. Evasion of the accelerated blood clearance phenomenon by coating of nanoparticles with various hydrophilic polymers. Biomacromolecules, 11: 2700-2706 (2010) (査読有)

⑨ T. Ishihara, M. Takahashi, M. Higaki, Y. Mizushima, and T. Mizushima, Preparation and characterization of a nanoparticulate formulation composed of PEG-PLA and PLA as anti-inflammatory agents. Int. J. Pharm. 385: 170-175 (2010) (査読有)

⑩ Tanaka KI., Ishihara T., Azuma A., Kudoh S., Ebina M., Nukiwa T., Sugiyama Y., Tasaka Y., Namba T., Ishihara T., Sato K., Mizushima Y., Mizushima T. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 298:L348-60 (2010) (査読有)

⑪ Ishihara T., Mizushima T. Techniques for efficient entrapment of pharmaceuticals in biodegradable solid micro/nanoparticles. Exp. Opin on Drug Deliv. 7: 565-575 (2010) (査読有)

[学会発表] (計6件)

① 石原務、平野展孝、斉藤義雄、春木満、宇野茂之、榎島誠、水島徹、リバビリンを封入した肝細胞特異的高分子ナノ粒子の開発、第61回高分子学会討論会、2012年9月20日、名古屋

② 石原務、平野展孝、斉藤義雄、春木満、

宇野茂之、榎島誠、合成高分子を用いたナノ粒子型 DDS 製剤の開発、平成 24 年度化学系学協会東北大会、2012 年 9 月 16 日、秋田

③ 石原務、合成高分子の医薬品への利用、東北ポリマー懇話会、2010 年 12 月、郡山

④ 石原務、DDS 材料、第 27 回医用高分子研究会講座 2010 年 11 月 18 日、東京

⑤ 石原務、生分解性高分子を用いたナノ粒子製剤の開発 平成 22 年度 化学系学協会東北大会、2010 年 9 月、盛岡

⑥ 石原務、前田泰司、高崎奈央子、水島徹、PVP 被覆ナノ粒子による ABC 現象の回避 第 59 回高分子学会年次大会、2010 年 5 月、横浜

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 薬物を封入した肝臓集積性ナノ粒子

発明者: 石原務、水島徹

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2011-192838

出願年月日: 平成 23 年 9 月 5 日

国内外の別: 国外及び国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 務 (ISHIHARA TSUTOMU)

日本大学・工学部・准教授

研究者番号: 70349554