

## 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 4 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590040

研究課題名（和文） 悪性脳腫瘍および結核治療のための新規ナノ粒子製剤の設計

研究課題名（英文） Preparation of nanoparticles for glioma and tuberculosis therapy

研究代表者

尾関 哲也（OZEKI TETSUYA）

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：60277259

研究成果の概要（和文）：悪性脳腫瘍治療のためのナノ粒子設計に関しては、葉酸 7 分岐修飾  $\beta$ シクロデキストリンに抗がん剤を結合し、抗がん剤をがん細胞に特異的に送達できるナノキャリアを調製できた。結核治療のためのナノ粒子設計に関しては、水溶性の高い新規抗結核薬 OCT313 を疎水性界面活性剤で被覆した肺内においても粒子として存在できるナノ粒子化することに成功した。また、このナノ粒子を内包した経肺投与マイクロ粒子を設計し、結核菌が潜伏する肺胞マクロファージへ効率よく薬物を送達可能とした。

研究成果の概要（英文）：As to nanoparticles design for treatment of glioma, seven-folates modified- $\beta$ -cyclodextrin-anticancer drug were synthesized for specific targeting of drug to cancer cells. OCT313, which is new candidate for anti-tuberculosis drug and highly water-soluble, was covered with hydrophobic surfactant to be nanoparticles. The nanoparticles can be existed as particles even in deeper site of lungs. Inhalable microparticles including OCT313 nanoparticles were prepared and it was successful to deliver drug in high efficient to alveolar macrophages which tuberculosis hides.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学・製剤学

キーワード：粒子設計、DDS

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 原発性脳腫瘍では神経膠腫（グリオーマ）が最も発生頻度が高く悪性度もきわめて高い。脳腫瘍の最も有効な治療法は外科的切除であるが、グリオーマは周辺の脳組織へ浸潤し、正常の脳組織との境界が不鮮明であるため、すべてのがん細胞の摘出が困難である。国内外を問わず、いずれの臨床の場において

も、脳腫瘍切除後の管理で最も汎用されているのは抗がん剤による治療である。しかしながら、一般に行われる静脈からの全身投与では重篤な副作用が問題である。よく使用されるニトロソウレア系薬物においても強い骨髄抑制のため、4-8 週間ごとに投与せざるを得なく、十分な治療効果が得られない場合が多い。グリオーマの stageIV では、術後 2 年

の生存率はわずか 5-10%である。これまでに申請者らは、抗がん剤を含有するマイクロ粒子を設計し、室温で溶液状態の温度感受性ポリマーに分散してラット脳腫瘍内に注入し、ラットの体温でポリマーがゲル化してマイクロカプセルを脳腫瘍内に固定することで、抗がん剤を長期間、直接腫瘍細胞へ送ること、ある程度生存日数を延長させることができた。

(2) 結核は、世界の総人口の 3 分の 1 に相当する約 20 億人が感染し、毎年約 920 万人が新たに発症、170 万人が死亡している疾患である。結核菌は肺胞マクロファージに貪食されても消化されることなく生存し増殖することができる細胞内寄生菌である。数十年間の間であっても宿主の生体内に潜んでおり、宿主の細胞性免疫が低下する時期に、それをきっかけとして再び増殖し始め発症する。こういった潜在性感染が結核の治療、予防を困難にしている。現在の結核の薬物治療は、リファンピシン (RFP)、イソニアジド、エタンブトール、ピラジナミド、ストレプトマイシンなど複数薬剤を半年から数年に渡って服用しなければならない。抗結核薬の長期間に及ぶ経口投与は、肝障害などの全身的な副作用やコンプライアンスの不徹底が懸念されている。実際に患者の不規則な抗結核薬の服用や長期間投与ゆえの治療からの脱落などにより多剤耐性結核が増加傾向にある。さらに、従来の経口投与では薬物が結核菌の潜む肺胞マクロファージ内部まで到達しにくい、肺胞マクロファージ内の薬物濃度が結核菌を死滅させるには不十分であり、しばしば治療に失敗する。抗結核薬を経肺投与により局所に到達させ、さらに肺胞のマクロファージに効率よく取り込ませることにより、きわめて有効な結核治療が期待できる。これまでに申請者らは、RFP を生分解性ポリマーであるポリ乳酸・グリコール酸 (PLGA) ナノ粒子中に含有させ、このナノ粒子を含有する MAN マイクロ粒子を調製すると、RFP をラット肺内に滞留させることが可能であることを明らかとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、悪性脳腫瘍および結核治療のための新規ナノ粒子薬剤の設計研究を、申請者がこれまでに確立した薬剤設計技術、特に、難溶性薬物および生分解性ポリマーのナノ粒子化技術、経肺投与薬剤の設計技術を応用し、ポリマーミセル化技術を加えて行い、がん抑制ペプチド、DNA 修飾タンパク質、siRNA などの抗がん物質および新規な抗結核薬をがん細胞や肺胞マクロファージなどの標的細胞へ効率よく送達し、細胞内へ導入するためナノ粒子デリバリーシステムの創製を試みる。すなわち、抗がん物質を封入

した安定なナノ粒子の薬剤設計、細胞膜を透過し細胞質内へ侵入する性質を持つペプチドやがん細胞の認識する種々のリガンドを用いた標的がん細胞へ特異的に導入可能なナノ粒子の設計、新規な抗結核薬を肺の深部まで高効率に送達できる粉末経肺投与薬剤のための粒子設計、結核菌が潜み、その温床となる肺胞マクロファージ内部へ特異的に抗結核薬を送達し、肺胞マクロファージ内の結核菌を高効率で殺菌できるナノ粒子の設計を目指す。p53p などのがん抑制ペプチドはがん細胞特異的にアポトーシスを起こすことができ、RecA (大腸菌由来) などの DNA 修飾タンパク質は、相同組換え遺伝子修復機能により、殺がん細胞作用を示すことが期待される。がん細胞の増殖シグナルを遮断する siRNA はがん細胞の増殖を止め、アポトーシスを起こさせる。新たに開発された抗結核薬は、従来の RFP を超える作用が期待される。これらをナノサイズのミセルや固体粒子に設計することにより、がん細胞や肺胞マクロファージへのナノ標的化ドラッグ・デリバリー・システム (Drug Delivery System, DDS) の創製を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 悪性脳腫瘍治療のためのナノ粒子設計に関しては、抗がん剤封入薬剤設計から抗がん剤結合分子キャリアの設計とした。葉酸 7 分岐修飾 B シクロデキストリン

(per-FOL- $\beta$ -CD) および抗がん剤のドキソルビシン (DOX) を用いた。

① per-FOL- $\beta$ -CD-ss-DOX の合成と精製：per-FOL- $\beta$ -CD を出発物質とし、 $\beta$ -CD の 2 級水酸基をトシル化した後、エポキシ基を生成させ、そこへ別合成したシタミンモノコハク酸アミドの付加反応を行った。その末端に DOX を縮合剤 DMT-MM を用いて結合させた。反応終了後、ゲルろ過クロマトグラフィーにて未反応 DOX を分離し、目的生成物と考えられるフラクションを分取 HPLC を用いて精製した。

② per-FOL- $\beta$ -CD-ss-DOX の細胞内取り込み量の比較検討：葉酸受容体 (FR) を高発現化させた EMT6/P 細胞 (マウス乳がん細胞) と EMT6/AR1 細胞 (DOX 耐性マウス乳がん細胞)、および FR をほとんど発現していない A549 細胞 (ヒト肺がん細胞) に対して、per-FOL- $\beta$ -CD-ss-DOX および DOX を 4 時間暴露し、フローサイトメーターを用いて細胞内に取り込まれた DOX 量を求めた。

③ 殺細胞効果の検討：EMT6/AR1 細胞に対して、per-FOL- $\beta$ -CD-ss-DOX および DOX を 24 時間暴露し、WST 試験によって殺細胞効果の検討を行った。

(2) 結核治療のためのナノ粒子設計に関しては、新規結核治療薬候補化合物である OCT313 の粒子設計を行った。OCT313 は新規に合成された化合物であり、貴重であるためナノ粒子化のための疎水性界面活性剤の選択およびラット経気管投与後の肺胞マクロファージへの取り込みについては OCT313 の代わりに蛍光カルセインを用いて粒子設計し、肺胞マクロファージに効果的に取り込まれるかどうか *in vivo* による評価を行った。なお、OCT313 を用いて粒子設計も行った。

① 蛍光カルセイン/界面活性剤、OCT313/界面活性剤ナノ粒子の調製：

蛍光カルセインあるいは OCT313 水溶液を疎水性界面活性剤を溶解させたシクロヘキサン中に体積比 1/2 で投入し、高速撹拌 (26000 rpm、2 min) して water-in-oil (W/O) エマルジョンを形成させた。凍結乾燥することにより W/O エマルジョンから水およびシクロヘキサンを除去することで、固体の蛍光カルセインあるいは OCT313 が疎水性界面活性剤で覆われた蛍光カルセイン/界面活性剤あるいは OCT313/界面活性剤ナノ粒子 (以下 Solid) を調製した。

② Solid 調製における界面活性剤の選択検討：

蛍光カルセイン、種々の疎水性界面活性剤 (ER-190、ER290、L195、O170) を用いて Solid を調製した。Solid をシクロヘキサン/水=1/1 の溶液に分散し、ボルテックス (1 min) を用いて撹拌した。遠心分離 (5000 rpm、5 min) 後、分離後に水層に漏れ出した蛍光カルセインをマイクロプレートリーダーにより測定することにより、蛍光カルセインを内包可能な界面活性剤を選択した。

③ Solid/MAN マイクロ粒子の調製：

図 1 に示す二液混合型ノズルの主管を流れる 3%MAN 水溶液に、Solid を分散させたイソプロパノールをキャピラリーから旋回するように注入し、噴霧乾燥することで Solid/MAN マイクロ粒子を調製した。噴霧条件は次の通り。噴霧流速：水相 3.0 mg/ml、有機相 2.0 mg/ml、噴霧圧力：0.1 MPa、乾燥温度：145°C

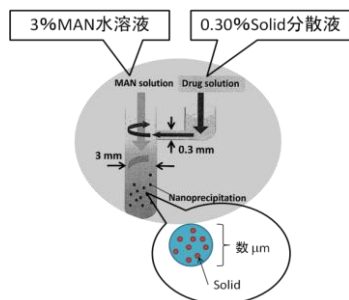


図 1 二液混合型ノズル

④ Solid/MAN マイクロ粒子の物性評価：走査型顕微鏡を用いて Solid/MAN マイクロ粒子を観察した。Solid/MAN 粒子を水に加えマンニトールを溶解後、封入されている Solid 粒子の粒子径をゼータサイザーにより測定 (iii) Solid/MAN 粒子に封入されている蛍光カルセインあるいは OCT313 をマイクロプレートリーダーあるいは紫外可視分光光度計によりそれぞれ定量した。

⑤ Solid/MAN マイクロ粒子のラット肺胞マクロファージへの取り込み評価 (*in vivo*)：蛍光カルセイン含有 Solid/MAN マイクロ粒子、蛍光カルセイン含有 MAN マイクロ粒子を、重さ約 400 g の Wister 系雄ラットに対して経気管投与した。蛍光カルセイン含有 MAN マイクロ粒子は、肺に投入後、直ちに MAN が溶解し、蛍光カルセイン水溶液となる。曝露 1 時間後に PBS を用いて肺胞マクロファージを回収し、蛍光顕微鏡で観察およびフローサイトメーターで蛍光量の定量を行い評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 結核治療のためのナノ粒子設計に関しては、葉酸修飾-β-シクロデキストリン/ドキシソルビシン結合体の調製と評価を行った。

per-FOL-β-CD-ss-DOX の合成と精製を行ったところ、per-FOL-β-CD を出発物質として、12.6%の収率で合成することができた。また、還元剤 DTT を用いて、per-FOL-β-CD-ss-DOX のジスルフィド結合が切断されることも確認した。次に per-FOL-β-CD-ss-DOX の FR 認識能を評価するために、FR の発現量の異なる細胞種に対する細胞内取り込み量の検討を行ったところ、per-FOL-β-CD-ss-DOX は、FR を高発現する EMT6/P 細胞において DOX より 1.8 倍多く取り込まれたのに対し、FR をほとんど発現していない A549 細胞においては同等以下しか取り込まれなかった。この結果より、per-FOL-β-CD-ss-DOX は、FR に認識されることで FR を高発現する腫瘍細胞に効率的に取り込まれることが示唆された。また、DOX の EMT6/AR1 細胞に対する取り込み量は、EMT6/P 細胞に対する取り込み量と比較して 41%に減少しているのに対し、per-FOL-β-CD-ss-DOX は 82%に留まった。EMT6/AR1 細胞は P 糖タンパク質を高発現することにより DOX 耐性を獲得している細胞である。そのため、per-FOL-β-CD-ss-DOX は、FR を介したエンドサイトーシス経路で取り込まれることで P 糖タンパク質による細胞外への排出を回避したために、取り込み量の減少が DOX に比べて抑えられたと考えられる。最後に EMT6/AR1 細胞に対して、per-FOL-β-CD-ss-DOX の殺細胞効果の検討を行ったところ、per-FOL-β-CD-ss-DOX は

DOX よりも低濃度 (10~30  $\mu\text{M}$ ) の IC50 を示した。しかし、細胞内取り込み量の結果を踏まえると、より強力な殺細胞効果が得られることが期待される。そこで今後、DOX の結合方式に改良を加え、DOX の殺細胞活性をできる限り維持できるような分子設計を行いたい。

以上の結果より、per-FOL- $\beta$ -CD-ss-DOX は FR を高発現する悪性腫瘍、さらには抗がん剤耐性がん治療において有用な抗がん剤と成り得ることが示唆された。今後、in vivo における per-FOL- $\beta$ -CD-ss-DOX の効果を見ると共に、更なる改良が望まれる。

(2) 結核治療のためのナノ粒子設計に関しては、抗結核作用を示す糖化合物 OCT313 の経肺投与型 DDS 製剤の開発を行った。

Solid 調製のための疎水性界面活性剤を検討したところ、ER-290 を用いた場合に蛍光カルセイン漏出量が少なく封入効率が高かった。そこで、ER-290 を選択した。Solid/MAN マイクロ粒子中に内包されていた Solid 粒子の平均粒子径は約 150 nm であった。Solid/MAN マイクロ粒子は走査型電子顕微鏡の観察により 1~5  $\mu\text{m}$  の大きさであり、経肺投与粒子として適した大きさであることが認められた。

今回調製した蛍光カルセイン含有 Solid/MAN マイクロ粒子は、蛍光カルセインをナノ粒子化していない蛍光カルセイン/MAN マイクロ粒子と比較して、顕著にマクロファージに取り込まれた。これは、Solid/MAN マイクロ粒子は経肺投与されて肺深部まで到達された後、肺胞内部 (湿度 100%とされている) で MAN が溶解し Solid ナノ粒子となり、マクロファージに認識され、粒子の状態で高濃度で取り込まれたためと考えられる。また Solid 表面が疎水性であるために、マクロファージに取り込まれやすかったと考えられる。次に OCT313 を用いて製剤調製を行ったところ、Solid/MAN マイクロ粒子は蛍光カルセイン Solid/MAN と同様に OCT313 ナノ Solid を含有する MAN マイクロ粒子の調製に成功した (図 2)

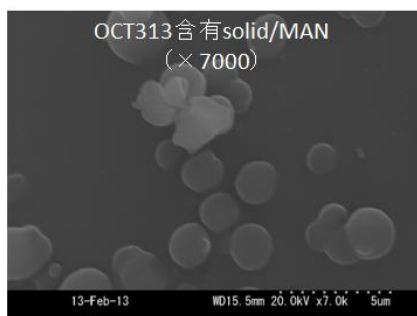


図 2 OCT313 含有 solid/MAN 粒子

今後の展開として、結核菌は肺胞マクロファージの細胞質に存在するため、エンドソームを脱出するようなキャリアの設計を行うことにより、より有用なキャリアを作成することができると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Tetsuya Ozeki, Daiki Kaneko, Kosuke Hashizawa, Yoshihiro Imai, Tatsuaki Tagami, and Hiroaki Okada, Improvement of survival in C6 rat glioma model by a sustained drug release from localized PLGA microspheres in a thermoreversible hydrogel, Int. J. Pharm., 査読有、427, 2012, 299-304
- ② Tetsuya Ozeki, Daiki Kaneko, Kosuke Hashizawa, Yoshihiro Imai, Tatsuaki Tagami, and Hiroaki Okada, Combination therapy of surgical tumor resection with implantation of a hydrogel containing camptothecin-loaded PLGA microspheres in a C6 rat glioma model, Biol. Pharm. Bull., 査読有、35, 2012, 545-550
- ③ 尾関哲也、肺胞マクロファージを標的とした結核治療のための経肺投与ナノ DDS、粉体工学会誌、査読無、48, 2011, 140-144

[学会発表] (計 15 件)

- ① 伊藤竜也、田上辰秋、瀧井猛将、小野寄菊夫、尾関哲也、結核治療に向けた経肺投与型薬物ナノ粒子含有マイクロ粒子の開発、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② 水迫英己、田上辰秋、服部憲治郎、尾関哲也、葉酸 7 分岐修飾  $\beta$  シクロデキストリン/ドキソルピシン結合体の調製と有用性の評価、第 29 回シクロデキストリンシンポジウム、2012 年 9 月 6 日、星薬科大学 (東京都)
- ③ 尾関哲也、機能性ナノ粒子の設計とドラッグ・デリバリー、製剤技術研究会第 1 回セミナー、2012 年 2 月 17 日、ホテル丸大 (長野県)
- ④ 尾関哲也、機能性ナノ粒子の設計とその製剤への応用、第 17 回流動化・粒子プロセスシンポジウム、2011 年 11 月 21 日、名古屋大学 (愛知県)
- ⑤ 伊藤竜也、田上辰秋、瀧井猛将、小野寄菊夫、尾関哲也、経肺投与に特化した

S/O/W ナノエマルジョン製剤による抗結核薬の効率的な送達システムの開発、第28回製剤と粒子設計シンポジウム、2011年10月28日、ホテルニューオータニ大阪（大阪府）

- ⑥ 尾関哲也、特殊なスプレーノズルを用いたナノ粒子の設計とドラッグデリバリー戦略、平成23年度粉体工学会中部談話会講演会、2011年9月15日、紅葉屋（愛知県）
- ⑦ Tetsuya Ozeki, Nanoparticles for oral/pulmonary drug delivery using special spray nozzles, Particle Processes in the Pharmaceutical Industry III, 2011年7月28日, Hotel Grand Chancellor Surfers Paradise, (Gold Coast, Australia)
- ⑧ 伊藤竜也、田上辰秋、辰巳泰我、瀧井猛将、小野寄菊夫、尾関哲也、抗結核薬の経肺投与を目的とした s/o/w エマルジョンの設計と物性評価に関する検討、第57回日本薬学会東海支部総会・大会、2011年7月9日、金城学院大学（愛知県）
- ⑨ 水迫英己、田上辰秋、辰巳泰我、服部憲治郎、尾関哲也、葉酸クラスター修飾βシクロデキストリン/ドキシソルピシン結合体の調製と悪性脳腫瘍細胞に対するターゲティング能の評価、第57回日本薬学会東海支部総会・大会、2011年7月9日、金城学院大学（愛知県）
- ⑩ 尾関哲也、特殊なスプレーノズルによるナノ粒子ドラッグ・デリバリー戦略、第4回メディショナルナノテク研究会、2011年2月1日、名古屋大学（愛知県）
- ⑪ Tetsuya Ozeki, Preparation of Nanoparticles for Oral/Pulmonary Delivery Using Spray Drier, The 9<sup>th</sup> France-Japan DDS Symposium, 2010年9月27日, KKR Hotel Kumamoto, (Kumamoto)
- ⑫ 尾関哲也、脳腫瘍治療を目的とした p53p-Ant 含有マイクロスフェア製剤の設計、日本ペプチド学会第13回ペプチドフォーラム、2010年9月16日、京都薬科大学愛学館愛学ホール、（京都府）
- ⑬ 尾関哲也、特殊なスプレーノズルによるナノ粒子の設計とデリバリー戦略、粉体工学会 製剤と粒子設計部会 2010年度第3回見学会・講演会、2010年9月2日、太陽化学（株）講堂、（三重県）
- ⑭ 尾関哲也、肺胞マクロファージを標的とした結核治療のための経肺投与ナノDDS、粉体工学会第46回夏期シンポジウム、2010年8月9日、関西セミナーハウス（京都府）
- ⑮ 尾関哲也、ナノ粒子含有マイクロスフェアを用いたデリバリー戦略、バイオイン

ダストリー協会シンポジウム・未来へのバイオ戦略・非侵襲性薬物投与が開く未来創薬、2010年5月10日、財団法人バイオインダストリー協会第一会議室（東京都）

〔図書〕（計1件）

- ① Takemasa Takii, Tasuhiro Horita, Ryuji Kuroishi, Taku Chiba, Mashami Mori, Tomohiro Hasegawa, Tatsuya Ito, Tatsuaki Tagami, Tetsuya Ozeki, Saotomo Ito, and Kikuso Onozaki, INTECH, Understanding Tuberculosis - New Approaches to Fighting Against Drug Resistance, Chapter 11, Edited by Pere-Jaon Cardona, 2012, pp263-272

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/1054.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾関 哲也 (OZEKI TETSUYA )

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：60277259

### (2) 研究分担者

辰巳 泰我 (TATSUMI TAIGA )

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師  
研究者番号：10444043