

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 13 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860119

研究課題名(和文) 肺内イメージング解析・吸入特性に基づく肺局所滞留型siRNA吸入リポソームの開発

研究課題名(英文) Development of pulmonary siRNA liposomes with long-term retention in the lung based on the evaluations of real-time in vivo imaging and inhalation properties

研究代表者

田原 耕平 (Tahara, Kohei)

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：30454325

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)：本研究では、難治性肺局所治療を目指した吸入核酸医薬(siRNA)封入リポソーム製剤設計の基盤となる研究を行った。siRNA吸入製剤はネブライザーによる噴霧を想定し、機能安定性や吸入特性(空気力学的粒子径)を評価した。ネブライザー噴霧後もsiRNAの活性を失うことなく安定であることを確認した。また、経肺投与後の表面修飾リポソーム粒子のラット肺内及び全身挙動解析を非侵襲的リアルタイムin vivoイメージングシステム評価を中心に明らかにした。リポソームの物理化学的特性が肺内挙動に及ぼす影響を評価し、機能性ポリマーで表面修飾した場合にリポソームの肺内滞留性が向上することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the feasibility of inhaled nucleic acid medicine (siRNA) formulation, notably siRNA loaded liposomes for pulmonary therapy using nebulization. The stabilities and inhaled characterization (aerodynamic particle sizes) of nebulized siRNA formulations were evaluated to evaluate the therapeutic potential of pulmonary siRNA using nebulizers. Furthermore, the behavior of surface-modified liposomes in the rat lung and whole body was monitored using a real-time in vivo imaging system. These results demonstrated that surface modification of liposomes using functional polymers achieved long-term residence time after pulmonary administration.

研究分野：薬物送達学

キーワード：吸入製剤 siRNA リポソーム 肺局所

1. 研究開始当初の背景

肺は、肺癌、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) など、今後増加が予想される難治性疾患を抱える臓器であり、small interfering RNA (siRNA) は、標的 mRNA に対し配列特異的に RNA 干渉を示すことから難治性肺疾患への適用が期待されている。しかし、静脈投与や経口投与では標的部位である肺に siRNA を送達することが難しい。よって、直接肺に薬物を効率的に導入できる吸入投与が最も適している。

国内外の研究で、肺疾患の標的分子に作用する siRNA を動物肺内に強制的に吹き込むことにより、疾患を特異的に予防できたことを報告している。しかしながら、その効果のほとんどは一過性である。siRNA は分解されやすく、効果を持続させることが難しい。よって、siRNA を肺へ送達し、持続的な効果を狙った肺局所 siRNA 吸入製剤の開発は、殆ど進んでいない。また、siRNA やそのキャリアの肺内挙動は不明な点が多い。

siRNA 吸入剤を実用化するには、吸入デバイスの選択、製剤の安定性、肺深部への送達効率を考慮した製剤を設計し、リポソームの詳細な肺内挙動を知る必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、粒子表面修飾により肺局所で滞留する siRNA リポソームを設計し、安定性や吸入特性に優れた製剤処方を見出す。次に、リポソーム粒子の肺内挙動解析を非侵襲的リアルタイム *in vivo* イメージングシステムを利用して明らかにする。リポソームの物理化学的特性が、肺内挙動に及ぼす影響を評価し、siRNA がターゲットとする疾患の特性・用途に応じた siRNA 吸入製剤の設計指針を導く。

3. 研究の方法

(1) 脂質組成や表面特性が異なる siRNA 封入リポソームの調製

吸入特性や肺内動態に大きく影響すると思われるリポソーム物性は、サイズ、脂質組成、表面修飾剤である。100 nm とし、残り 2 点に絞り、まず脂質組成と表面修飾の組合せが異なるリポソームを調製した。表面修飾剤としては粘膜付着性ポリマーのキトサンや水溶性ポリマーである PVA や PEG を使用した。

(2) 噴霧デバイスに対する安定性評価

各種ネブライザー噴霧後の siRNA 安定性をアガロースゲル電気泳動により評価した。ルシフェラーゼ安定発現 A549 細胞を用いて、ネブライザー噴霧前後の siRNA を細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を評価した。

(3) siRNA 製剤の *in vitro* 吸入特性評価

まず、一般的な吸入特性評価法であるアンダーセンカスケードインパクト (ACI) やツインインピンジャーによりエアロゾルの空気力学的粒子径を評価した。次にエアロダイナミックパーティクルサイザー評価法 (APS 法) により、吸入特性スクリーニングを行い、肺深部への吸入に適した空気力学的粒子径 (エアロゾルの液滴径が約 1 ~ 5 μm) を評価した。

(4) 非侵襲リアルタイム *in vivo* イメージングによる肺内挙動評価

近赤外の蛍光波長を有するインドシアニングリーン (ICG) で標識した表面修飾リポソーム製剤を小動物用気管内液体噴霧器 (PennCentury 社製) によりラット肺へ非侵襲的に投与した。投与後、リアルタイム *in vivo* イメージングシステム IVIS により肺内の粒子挙動を観察した。

4. 研究成果

(1) ネブライザー噴霧後の siRNA 製剤安定性及び吸入特性

siRNA 製剤を噴霧デバイス (ネブライザー) で吸入する場合、エアロゾル化の過程で siRNA が分解されることが懸念される。ネブライザー噴霧後の siRNA 安定性を評価した結果、ネブライザー噴霧後も siRNA の活性を失うことなく安定であることを確認した。

また、三種類のネブライザー (メッシュ式、超音波式、ジェット式) を使い、Naked siRNA 及び siRNA リポソームに対し最も適したデバイスを決定した。siRNA 溶液の場合はメッシュ式が、リポソーム懸濁液の場合はジェット式ネブライザーの噴霧効率が比較的高かった。また、吸入 siRNA 製剤が薬理効果を発現するためにはネブライザーから噴霧された後に、肺深部へ到達する必要がある。siRNA 製剤の *in vitro* 吸入特性評価では、コスト・労力がかからない簡便なエアロダイナミックパーティクルサイザー評価法 (APS 法) が適していることを見出した。吸入特性評価の結果から、比較的高濃度の siRNA 溶液をネブライザーで噴霧可能であることを見出した (Fig.1)。

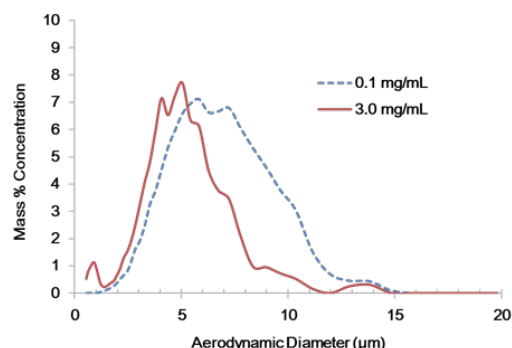


Fig.1 Aerosolized particle size distributions

of siRNA solutions after nebulization using a vibrating-mesh nebulizer. Droplets were measured using APS.

(2) 吸入リポソームの肺内挙動評価

吸入リポソームの肺内動態を非侵襲的 in vivo リアルタイムイメージング (IVIS) により解析し、優れた吸入特性と肺内滞留性を有するリポソーム物性を明らかにした (Fig. 2)。その結果、リポソーム粒子表面をキトサン及び部分疎水化ポリビニルアルコール (PVA-R) で修飾することにより、ラット経肺投与後のリポソーム滞留性を向上させることができた。カチオン性ポリマーであるキトサン修飾の場合には、肺上皮細胞との相互作用が向上し、一方 PVA-R 修飾の場合には、肺胞マクロファージによるリポソームの認識を回避できるため肺内滞留性が向上することが明らかとなった。

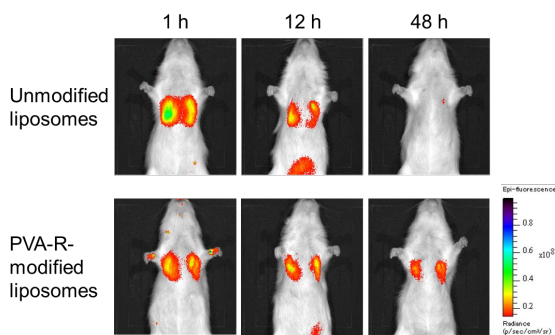


Fig.2 Live imaging of ICG-labeled surface modified liposome after pulmonary administration in vivo

モデル高分子医薬 (分子量 4,000 及び 10,000 の FITC 標識デキストラン) をリポソームへ封入し、構成脂質、粒子物性 (粒子径や表面特性) が肺内滞留性に及ぼす影響について評価した。その結果、リポソーム脂質膜に吸収促進剤として汎用されているスペルミンを組み込むことで、吸入後の薬物及びリポソームのラット肺組織移行性を向上させることに成功した。さらに、リポソーム粒子表面をポリエチレングリコール (PEG) で修飾し、PEG 分子量や修飾量などを最適化することで、リポソームコア粒子の物性に関わらずモデル薬物を肺内において長期間滞留させることができた。

また、低分子薬物 (プロカテロール) を使用した検討ではあるが、相転移温度が比較的低いリン脂質 (EPC) を組み込んだ薬物徐放性リポソームをラットへ経肺投与することにより、肺局所における薬理効果を持続化できることも見出している。これらの知見を活用し、現在は肺疾患モデル動物に対する核酸医薬封入リポソームの有効性に関する検討を行っている。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 4 件)

Tahara K, Hashimoto W, Takeuchi H. Inhalation Properties and Stability of Nebulized Naked siRNA Solution for Pulmonary Therapy. *Chem Pharm Bull.* 64:63-67, 2016

Tahara K, Tomida H, Ito Y, Tachikawa S, Onodera R, Tanaka H, Tozuka Y, Takeuchi H. Pulmonary liposomal formulations encapsulated procaterol hydrochloride by a remote loading method achieve sustained release and extended pharmacological effects. *Int J Pharm.* in press *Int J Pharm.* 30:139-46, 2016.

Ohnishi N, Tanaka S, Tahara K, Takeuchi H. Characterization of insulin-loaded liposome using column-switching HPLC. *Int J Pharm.* 479:302-305, 2015

Murata M, Yonamine T, Tanaka S, Tahara K, Tozuka Y, Takeuchi H. Surface modification of liposomes using polymer-wheat germ agglutinin conjugates to improve the absorption of peptide drugs by pulmonary administration. *J Pharm Sci.* 102:1281-1289, 2013.

(学会発表) (計 5 件)

Kohei Tahara, Mitsutaka Murata, Risako Onodera, Hirofumi Takeuchi. Pulmonary Delivery of Peptide Drug Using Surface-modified Liposomes to Improve Systemic Absorption. 4th Asian Symposium on Pharmaceutical Science and Technology (ASPST). April 29, 2016. Shenyang, China

宇仁田真秀、伊藤洋祐、村田光隆、小野寺理沙子、田原耕平、竹内洋文. リポソーム吸入製剤化を目的とした吸入特性評価に関する研究. 第 7 回粉末吸入剤研究会シンポジウム. 2015/11/30. 富山

伊藤洋祐、小野寺理沙子、田原耕平、竹内洋文. 薬物封入リポソームのネブライザーによる噴霧・吸入特性の評価. 第 31 回製剤と粒子設計シンポジウム. 2014/10/24. 福岡

伊藤洋祐、小野寺理沙子、田原耕平、竹内洋文. ネブライザーを用いた薬物封入リポソーム吸入製剤に関する研究. 第 30 回日本 DDS 学会学術集会. 2014/7/30. 東京

伊藤洋祐、小野寺理沙子、田原耕平、竹内洋文. ネブライザーを用いたリポソーム吸入製剤に関する研究. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会

東海支部合同学会大会 2013. 2013/11/10
三重

〔図書〕(計3件)

小野寺理沙子, 田原耕平, 竹内洋文. リ
ポソームの粒子設計による経口, 経肺お
よび点眼投与 DDS 製剤設計 (特集
DDS を支える微粒子製剤化技術の進
歩). Drug delivery system. 30:121-128,
2015

田原耕平, 竹内洋文. 非侵襲的な投与方法
を可能とする微粒子 DDS 製剤の開発.
月刊ファインケミカル 2015 年 1 月号
薬剤学研究が織りなすドラッグデリバ
リー技術とフォーミュレーションデザ
イン, シーエムシー出版 (東京) 2015.

Tahara K, Takeuchi H.
Liposome-Based Mucoadhesive
Formulations. Mucoadhesive
Materials and Drug Delivery Systems:
Wiley Blackwell; 2014. p. 297-308.

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.gifu-pu.ac.jp/info/organization/l
ist/seizai/](http://www.gifu-pu.ac.jp/info/organization/list/seizai/)

6. 研究組織

研究代表者

田原 耕平 (TAHARA, Kohei)

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 30454325