

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460048

研究課題名(和文) イオン液体を利用した遺伝子リポプレックスの固形製剤化に関する研究

研究課題名(英文) Study on solid formulation of lipoplex using ionic liquid

研究代表者

米持 悦生 (Yonemochi, Etsuo)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40201090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：siRNAを含有した脂質ナノ粒子複合体は、他の製剤よりも高い遺伝子発現抑制効果を誘導した。複合体形成過程を、放射光小角X線散乱測定および等温滴定型カロリメトリー(ITC)により検討した。複合体粒子は、炭素鎖内の二重結合の数に応じて、シングルラメラ、マルチラメラ、および凝集体を形成し、分子の高が低い脂質では膜密度が高かった。さらに、二重結合を含む脂質組成の増加に伴い膜密度は低下し、構造転移のしやすさに関係していた。

固形製剤化手段である凍結乾燥に対する複合体の安定性について検討した結果、糖類、ポリアミノ酸類の添加により、再溶解後のナノ粒子の凝集を低減できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The lipid nanoparticle complex containing siRNA induced a higher gene expression suppressing effect than the other preparations. Complex formation process was examined by synchrotron radiation X-ray scattering measurement and isothermal titration calorimetry (ITC). The composite particles formed single lamellae, multilamellae, and aggregates depending on the number of double bonds in the carbon chain, and membrane density was high in lipids with low molecular bulk. Furthermore, as the lipid composition containing double bonds increased, the membrane density decreased and it was related to the ease of structural transformation. As a result of examining the stability for nanoparticles against lyophilization which is a means for solid preparation, it was found that aggregation of fine particles after re-hydration can be reduced by addition of saccharide and polyamino acids.

研究分野：製剤工学

キーワード：脂質ナノ粒子複合体 siRNA 小角X線散乱 等温滴定型カロリメトリー 凍結乾燥 安定性

1. 研究開始当初の背景

合成 siRNA は、疾患関連遺伝子の発現を一過的であるが直接的かつ特異的に抑制することができる。そのため、次世代の遺伝子治療における薬物として、最小限の副作用で最大限の薬理効果を発揮する新たな核酸医薬としての期待が高まっている。そこで、合成 siRNA の組織・細胞へのターゲティング輸送、高効率な細胞内導入と動態制御を可能にする機能性担体の開発が急務となっている。近年、合成 siRNA の細胞内送達担体として最も有力な候補としては、各種核酸の細胞内導入に成功しているリポソームやナノ粒子がある。これらは、構成脂質の選択により機能性の拡張が比較的容易であるだけでなく、ナノサイズでの粒子の調製が容易であることから生体内・細胞内動態を制御する薬剤投与技術における担体として必須要素を備えているからである。しかし、リポソームによる合成 siRNA 送達システムの課題は多い。これは、リポソーム/siRNA 複合体は形成効率が悪く、siRNA の熱および分解酵素に対する不安定性は改善できない。

一方、今回検討するリポプレックスなど分散溶液は、調整直後は、非常に粒子径のそろった良好な分散状態を示す。しかし、このような分散系は、熱力学的には不安定な状態であり、経時的に粒子が凝集、融合することにより、粒子径が増大し、目的部位での吸収性が顕著に低下する恐れがある。ラボスケールで少量の製剤を調製し、すぐに、細胞に適用する *in vitro* 実験、あるいは、マウスなどの小動物への静注による投与による *in vivo* 実験では、期待される効果が確認できる場合でも、より大量の生産に向けたスケールアップの際には、溶液内部での濃度・温度のゆらぎ、物質拡散の不均一性などが生じ、十分期待された分散系を安定に調製することは難しい。

研究代表者はこれまで、非晶質医薬品の物理化学的安定性について研究を進めてきており、熱分析・X線回折・NMR などの最新の技術によるマイクロな分析が製剤評価における新たな手法として開発できる手ごたえをつかんでいる。また、共結晶化などによる原薬形態の変更を利用した原薬物性の改善に成功しており、DDS 製剤の分散系製剤の固形製剤化のための技術的な下地がある。また、溶液製剤の固形製剤化手段として、凍結乾燥・噴霧乾燥など種々の製剤化手法について、十分な経験を有している。

本研究により、これまで溶液状態でしか保存できなかった、不安定な構造であるリポプレックスの溶液中での分散と分子状態を、非破壊かつ感度よく解析する方法が確立されることにより高い安定性、再分散性をもつ固形製剤の製造が可能となると考えられる。また、本研究で確立される技術は、その後の生産規模での品質管理へ応用可能となり、医薬品の製造分野に大きなインパクトを与えられよう。

2. 研究の目的

リポソーム/siRNA 複合体は形成効率が悪く、siRNA の熱および分解酵素に対する不安定性は改善できない。また、リポソーム複合体から合成 siRNA が細胞内で遊離されにくい問題もある。そこで siRNA ベクターの最適な組成検討を行い、*in vivo* において合成 siRNA を癌細胞に特異的かつ高効率に輸送できる新たな脂質微粒子遺伝子ベクターを調製する。さらに、合成 siRNA との混合荷電比を調整することにより、最も安定な複合体形成条件を明らかとする。

さらに、安定な複合体分散系が確立されたのち、有効性を指標として複合体の処方最適化する。さらに、固形製剤化のための手段、今回は特に凍結乾燥による製剤化を検討する。具体的には、凍結乾燥工程でのプロセスパラメーターの変化による複合体の凍結時における分散状態が変化する挙動を解析することに注目したい。本研究では製剤中の解析に適した微粒子の大きさ、添加剤の結晶性の程度、その他のパラメーターをなるべく定量的に示し、再分散後の分子状態との関連性を明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 合成 siRNA 導入遺伝子ベクターの調製と評価

合成 siRNA の細胞内送達法を確立するために、まず合成 siRNA と安定な複合体を形成し、かつ細胞内で容易に siRNA を遊離することができる 2 級アミンや 3 級アミンを持つ正電荷脂質誘導体を合成する。siRNA ベクターは、組成比を変えることにより、癌選択性が高く且つ合成 siRNA の導入効率の高い組成を検討する。また、合成 siRNA との混合荷電比を調整することにより、最も安定な複合体形成条件を調べる。リポソームは、水素添加大豆レシチン類、コレステロール、ポリエチレングリコール (分子量 2000) 結合ジステアロイルフォスファチジルコリンの重量比 3:1:1 から成り、薄膜法で調製した。内水相として、0.65 M トリエタノールアミン (TEA) 溶液を含む平均分子量 4,800、9,800、20,500 の PGA 溶液 (1-4 mg/mL) を用いた。超音波照射により粒子径を約 100 nm に調整した後、セファデックス G-100 カラムによりゲルろ過し、未封入 PGA を分離・除去した。リポソーム画分にモデル薬物としてドキシソルピシンを添加し (HSPC : 薬物 = 5 : 1、重量比)、60°C で 10 分間インキュベートすることにより薬物をリポソームに内封した。

薬物封入率は、得られたリポソームをセファデックス G-50 カラムにより未封入薬物を分離して算出した。封入安定性は、透析膜 (分画分子量 3500) に入れたリポソームをリン酸緩衝生理食塩液 (PBS、pH7.4) に対して透析し、PBS 中の薬物濃度を経時的に測定することで評価した。

(2) ナノ粒子の調製方法の最適化

調製後のナノ粒子複合体の安定性を評価するため、複合体の構造を放射光小角 X 線散乱測定 (SAXS) より、生成過程を等温滴定型カロリメトリー (ITC) により検討した。さらに、凍結-融解過程における安定性・復元性の高いナノ粒子複合体の設計を行うため、複数の正電荷脂質およびリン脂質の組み合わせ・組成について、siRNA との複合体を作成し、その形成過程を SAXS, TTC により評価した。また、ITC より、複合体形成時の熱力学パラメーターを算出した。

(3) 凍結保護安定化剤の探索と処方設計

調製されたナノ粒子複合体分散溶液について、凍結融解時の溶質の分子状態変化を評価する。具体的には、熱分析による凍結濃縮相のガラス転移温度、凍結時の氷晶生成過程の X 線回折測定によるモニターを行った。さらに、凍結融解の安定化効果を持つ製剤添加剤のスクリーニングを行った。凍結融解により、粒子凝集など安定性の低下が認められた処方については、複合体組成の再検討を行った。

また、固形製剤化のための基礎検討として、凍結乾燥以外の固形製剤化手法について検討した。具体的には、活性成分と安定な結晶構造を構成できる複合体分子の構築を試みた。モデル薬物を用い、親水性に富んだ極性の高い部分について、水素結合などの分子間相互作用を指標とし、一方、芳香環、長鎖アルキル基など疎水性部分については、 π - π 、CH- π 相互作用を中心に検討した。種々の組み合わせについて、得られた構造の格子エネルギーから、種々の構造についての安定性の比較を行い、最安定形を探索した。さらに、得られた薬物結晶の造粒方法について検討した。

4. 研究成果

(1) 合成 siRNA 導入遺伝子ベクターの調製と評価

① 調製したリポソームの薬物封入率

調製したリポソームの粒子径は PGA 4 mg/mL 溶液を用いたものを除きいずれも約 100nm となり、 ζ -電位はいずれも中性から負電荷を示した。PGA の平均分子量が薬物の封入効率に影響するかを、2 mg/mL の PGA 溶液を用いて検討した結果、平均分子量 4,800、9,800、20,500 のいずれにおいても 95% 以上の高い薬物封入率を得ることができた。また、封入率に対するポリグルタミン酸 (PGA) 濃度の影響を検討するために平均分子量 9,800 の PGA 1、2、4 mg/mL 溶液を用いて薬物を封入したところ、いずれの濃度でも 95% 以上の高い薬物封入率を得ることができた。よって、本検討で用いた PGA 分子量と濃度範囲では高率で薬物を封入できることが明らかとなった。

② リポソーム製剤の薬物放出特性におよぼす PGA 濃度・分子量の影響

リポソームからの薬物放出性を透析法により比較することにより、封入安定性を評価した。PGA を含まない 0.65 M TEA 溶液で調製したリポソームが最も高い放出率を示し、48 時間において 22% の放出が認められた。平均分子量 9,800 の PGA を 1、2 mg/mL 含有したリポソームは PGA 不含のリポソームと同様の放出率であったが、4 mg/mL 溶液を用いることにより放出は抑制された。また、平均分子量 4,800 の PGA を用いたリポソームでは 1、2、4 mg/mL のいずれの濃度でも PGA 不含のリポソームと同様の放出率を示した。よって、低濃度および低分子量の PGA は内水相での薬物の安定化にあまり寄与しないことが明らかになった。一方、2 mg/mL 溶液を用いて PGA の平均分子量の影響を比較すると、平均分子量 20,500 の PGA を含有したリポソームからの薬物の放出は、PGA 不含のリポソームより抑制されることが明らかになった (図 1)。よって、高濃度および高分子量の PGA を用いることでリポソームからの薬物放出を抑制できることが明らかとなった。

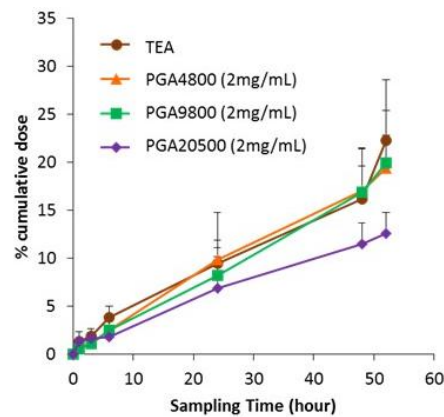


図 1 平均分子量の異なる PGA を用いて調製したリポソームからの薬物放出率

(2) ナノ粒子複合体形成過程の評価

SAXS により、siRNA とリポソームの複合体では、3nm 程度のラメラ構造が生成していることが確認された (図 2)。

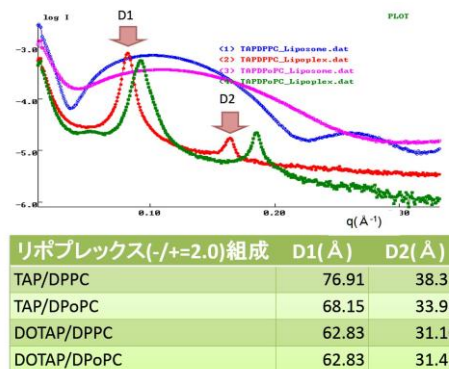


図 2 各組成のリポソームおよび複合体の SAXS データとラメラ構造

さらに、複合体ナノ粒子は、使用する脂質の違いにより異なるラメラ構造を形成し、ラメラ内外の水相中に siRNA が存在していることが明らかとなった。

ITC から得られた、複合体化エンタルピー ΔH と SAXS から得られた膜厚の関係から、複合体ナノ粒子は、炭素鎖内の二重結合の数に応じて、シングルラメラ、マルチラメラ、および凝集体を形成し、構造が異なることが確認された。さらに、構造データ解析により、二重結合を持たず分子の嵩が低い脂質では膜密度が高かった。さらに、二重結合を含む脂質組成の増加に伴い膜密度が低下しており、構造転移のしやすさは膜密度に依存していることが明らかとなった。

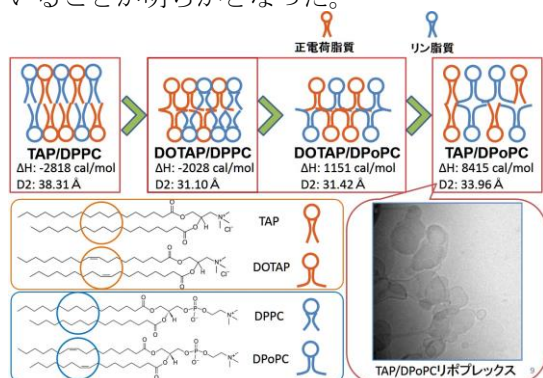


図 3 複合体化エンタルピー ΔH および膜厚 D2 に及ぼす脂質組成の影響

(3) ナノ粒子の凍結安定化剤の検討

固形製剤化手段である凍結乾燥に対する安定性については、種々の組成の微粒子を凍結乾燥後再溶解し、粒子径の変化から検討した。図 4 に示すように、各試料の粒子径は、凍結乾燥前の複合体では、292nm であったが、再溶解後の粒子径は 13 倍に増加した。また HPMC および mannitol 共存下では再水和が容易となった。さらにポリグルタミン酸 Na (PSG) を添加した場合には、再溶解後の粒子径増加率は 1.1 倍に低下した。これらの結果より、糖類、ポリアミノ酸類の添加により、再溶解後の微粒子の凝集性を低減できることが明らかとなった。

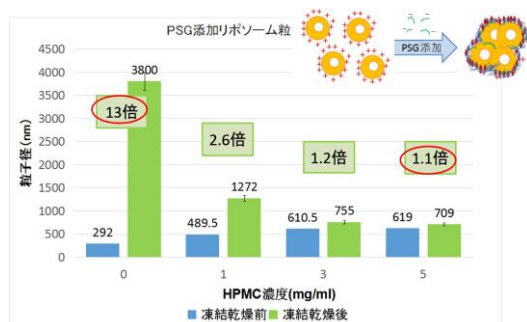


図 4 PSG 添加複合体の再水和性に及ぼす添加剤の影響

さらに、膜密度と復元性に相関があることが示唆された。

しかし、すべての組成の微粒子の安定化は困難であったため、新規な固体状態の調製方法、例えば複合体を直接結晶として取り出す晶析法などの検討が必要と考えられた。また、製剤化に際しては、造粒方法も検討し、添加剤の種類等、固形製剤製造に適した複合体の調製が重要であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① A. Miatmoko, K. Kawano, H. Yoda, E. Yonemochi, Y. Hattori. Tumor delivery of liposomal doxorubicin prepared with poly-L-glutamic acid as a drug-trapping agent, *J. Liposome Res.*, 査読有, Vol.27, No.2, 2017, pp.99-107, <http://dx.doi.org/10.3109/08982104.2016.1166511>
- ② Y. Hamada, M. Ono, M. Ohara, E. Yonemochi, Molecular dynamics of amorphous sulfamethazine with structurally related sulfonamide impurities evaluated using thermal analysis. *J. Pharm. Sci.*, 査読有, Vol.106, No.4, 2017, pp.1062-1068, <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.12.008>
- ③ H. Takasaki, E. Yonemochi, M. Ito, K. Wada, K. Terada. The effect of water activity on granule characteristics and tablet properties produced by moisture activated dry granulation (MADG). *Powder Tech.*, 査読有, Vol.294, 2016, pp.113-118, <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2016.02.013>
- ④ O. D. Putra, T. Furuishi, E. Yonemochi, K. Terada, H. Uekusa. Drug-drug multicomponent crystals as an effective technique to overcome weaknesses in parent drugs. *Crystal Growth & Design*, 査読有, Vol.16 No.7, 2016, pp.3577-3581, <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00639>
- ⑤ Y. Hattori, E. Hara, Y. Shingu, D. Minamiguchi, A. Nakamura, S. Arai, H. Ohno, K. Kawano, N. Fujii, E. Yonemochi, . siRNA delivery into tumor cells by cationic cholesterol derivative-based nanoparticles and liposomes. *Bio. Pharm. Bull.*, 査読有, Vol.38, No.1, 2015, pp.30-38, <http://doi.org/10.1248/bpb.b14-00526>

[学会発表] (計 4 件)

- ① 高村宏平、遠藤朋宏、郡司美穂子、古石誉之、福澤薫、米持悦生、正電荷リボソームと siRNA による複合体の分子構造の解明、日本薬学会第 32 年会、2017 年 5 月、大宮
- ② 新庄永治、高村宏平、村越南実、片山捷平、郡司美穂子、古石誉之、福澤薫、米持悦生、正電荷リボソーム/siRNA 複合体形成メカニズムの検討、日本薬学会第 137 年会、2017 年 03 月、仙台
- ③ 米持悦生、木村高暢、**Andang Miatmoko**、菊池拓人、川野久美、服部喜之、郡司美穂子、古石誉之、遠藤朋宏、小角 X 線散乱測定による正電荷リボソームと siRNA のリボプレックス形成過程の検討、日本薬学会第 136 年会、2016 年 03 月、横浜
- ④ 岡本遼、服部喜之、新井翔平、濱田めぐみ、川野久美、米持悦生、負電荷ポリマーと正電荷リボプレックスの連続投与による肝臓への siRNA 送達における負電荷ポリマーの種類と正電荷リボプレックスの荷電比の最適化、第 30 回日本 DDS 学会学術集会、2014 年 07 月、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米持 悦生 (YONEMOCHI, Etsuo)
星薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：40201090

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

服部 喜之 (HATTORI, Yoshiyuki)
星薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：90350222

川野 久美 (KAWANO, Kumi)
星薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：20366834