

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860029

研究課題名(和文)自己組織化脂質ナノ粒子を基盤とする新規siRNA吸入粉末剤の開発

研究課題名(英文)Development of Novel Dry siRNA Powders for Inhalation Based on Spontaneous Lipid Nanoparticle Constitution in Lung

研究代表者

奥田 知将 (Okuda, Tomoyuki)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：20513857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、噴霧急速凍結乾燥法による多孔性粉末微粒子化技術と自己組織化脂質ナノ粒子調製技術を組み合わせ、吸入後に肺内で沈着・溶解して自発的にsiRNA/脂質ナノ粒子を形成し、遺伝子発現抑制効果を発揮する革新的な吸入siRNA粉末剤の開発を目指した。カチオン性脂質・ポリエチレングリコール誘導体・賦形剤の組成最適化を通じて、優れた肺送達能とともに、水中で高遺伝子発現抑制活性/低細胞毒性のsiRNA/脂質ナノ粒子を形成する粉末微粒子の製造に成功した。この粉末微粒子は、肺内でのナノ粒子形成により、siRNAの滞留性ならびに安定性の向上を達成しつつ、肺内遺伝子発現抑制効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to develop innovative dry siRNA powders for inhalation that show pulmonary gene silencing action through spontaneous constitution of siRNA/lipid nanoparticles in the lungs, which was produced by the novel combination of two particle design techniques: spray freeze drying for highly porous microparticles with high aerosol performance and self-assembly of lipid nanoparticles in water. The component optimization (i.e. cationic lipids, polyethylene glycol derivatives, and excipients) achieved successful production of dry siRNA powders with high aerosol performance that allow self-assembly of siRNA/lipid nanoparticles with high gene silencing activity and low cytotoxicity in water. The dry siRNA powders were demonstrated to have prolonged retention ability and improved biostability of siRNA in the lungs through spontaneous nanoparticle constitution after pulmonary delivery, subsequently leading to strong and specific gene silencing action in the lungs.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：自己組織化ナノ粒子 吸入粉末剤 粒子設計 siRNA 遺伝子治療 核酸デリバリー 噴霧急速凍結乾燥法 中空多孔性微粒子

1. 研究開始当初の背景

リポソームなどの脂質ナノ粒子は生体適合性に優れた DDS キャリアーとして広く認知されており、特定の遺伝子発現を強力かつ選択的に抑制可能な small interfering RNA (siRNA) の臨床応用を実現する有望なベクターとしてこれまで盛んに研究開発が進められてきた。特に、呼吸器系疾患を対象とした臨床応用に向けては、直接かつ非侵襲的に siRNA を送達可能な吸入剤としての製剤開発が注目されている。siRNA の吸入剤応用を指向したこれまでの製剤検討の主流はネブライザーを用いた液剤であるが安定性が乏しく、実用化の面から長期保存が可能で使用簡便性にも優れた吸入粉末剤の開発に期待が高まっている。しかし、脂質ナノ粒子を応用した吸入粉末剤開発においては、①粉末製造工程で生じる熱・凍結・乾燥などの物理的ストレスに対して脂質ナノ粒子の構造・機能が維持されること、②粉末微粒子を吸入剤应用到した粒子形・粒子構造に精密に設計することの2つの大きな課題を克服しなければならない。また、これまでに報告された検討では、脂質ナノ粒子を予め調製してから粉末製造に進む煩雑な工程を要するものがほとんどであるため、より簡便に製造可能な粉末微粒子化技術の応用が強く求められている。

2. 研究の目的

上記の課題を克服する新規製剤化技術として、吸入剤应用到した噴霧急速凍結乾燥 (spray freeze drying: SFD) 法による多孔性粉末微粒子化技術と自己組織化脂質ナノ粒子調製技術の組み合わせを考案した。即ち、脂質成分を tert-ブチルアルコール (TBA: 水と同様に昇華可能な有機溶媒として利用) に、siRNA および賦形剤を水にそれぞれ溶解し、それらの混合液から SFD 法により siRNA/脂質粉末微粒子を得るものであり、吸入後に粉末微粒子が気道上皮細胞表面で沈着・溶解して自発的に siRNA/脂質ナノ粒子を形成し、遺伝子発現抑制効果を発揮する戦略である。この製剤化技術では、①予め脂質ナノ粒子を調製する必要がなく、吸入剤应用到した粉末微粒子を比較的簡便な工程で製造できる、②生体内で自発的に脂質ナノ粒子を形成するため、製造工程における脂質ナノ粒子の構造・機能維持の問題を回避できるという2つの大きなメリットが得られる。

本研究では、粒子のサイズ、均一性、遺伝子発現抑制効果、安全性の面で優れた siRNA/脂質ナノ粒子が得られる粉末微粒子の最適組成条件を決定し、その粉末微粒子について吸入特性評価とマウスへの肺内投与による体内動態/作用評価を行い、吸入 siRNA 粉末剤としての有用性を検証した。

3. 研究の方法

(1) siRNA/脂質粉末微粒子の製造および粒子構造の評価

siRNA として、ホタルルシフェラーゼに特異的な siGL3 および非特異的な siRL を用い、siRNA の体内動態/構造安定性の評価には siGL3 の近赤外蛍光ラベル体 (Cy5.5-siGL3) を用いた。カチオン性脂質として、pH 非応答型の DOTAP および DOTMA、また pH 応答型の DODMA を用いた。ポリエチレングリコール (PEG) 誘導体として、PEG 部分の分子量 (約 2000 または 5000) ならびに脂溶性部分の化学構造 (コレステロール (Chol) またはミリスチン酸をもつリン脂質 (C14)) が異なる計 3 種 (以後、『PEG[分子量]-[脂溶性部分の化学構造]』で用いた PEG 誘導体の種類を示す) を使用した。賦形剤として、マンニトール (Man)、フェニルアラニン (Phe)、ロイシン (Leu) を用いた。

カチオン性脂質、コレステロール、PEG 誘導体を TBA に、また siRNA および賦形剤を水にそれぞれ溶解後、それらの混合液を液体窒素中に噴霧・凍結した。得られた凍結粒子中の水分を凍結乾燥機内で昇華・乾燥することにより、目的の siRNA/脂質粉末微粒子を製造した (表 1)。粉末微粒子の粒子構造は走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察により評価した。

表 1. 製造した各粉末微粒子の組成。NP: siRNA/脂質ナノ粒子, DP: 粉末微粒子, N/P: siRNA のリン酸基に対するカチオン性脂質のアミン基のモル比。

Formulation name	Cationic lipid	PEG derivative	Excipient	N/P	NP amount (% of powder)
NP DP1	DOTAP	-	Phe	4	8.8
NP DP2	DOTAP	PEG2000-Chol	Man	4	11
NP DP3	DOTAP	PEG2000-Chol	Phe	4	11
NP DP4	DOTAP	PEG2000-Chol	Leu	4	11
NP DP5	DOTAP	PEG5000-Chol	Leu	4	12
NP DP6	DOTAP	PEG2000-C14	Leu	4	12
NP DP7	DOTMA	PEG2000-Chol	Phe	2	20
NP DP8	DOTMA	PEG2000-Chol	Phe	2	10
NP DP9	DOTMA	PEG2000-Chol	Phe	2	5.0
NP DP10	DOTMA/DODMA	PEG2000-Chol	Leu	3	8.3
NP DP11	DOTMA/DODMA	PEG5000-Chol	Leu	3	9.0
NP DP12	DOTMA/DODMA	PEG5000-Chol	Leu	3	3.0
NP DP13	DOTMA/DODMA	PEG5000-Chol	Leu	3	1.5
Leu DP	-	-	Leu	-	0

(2) siRNA/脂質ナノ粒子の粒子物性の評価

製造した siGL3/脂質粉末微粒子を水に溶解することで siGL3/脂質ナノ粒子を形成し、その平均粒子径、多分散性指数 (PdI)、ゼータ電位をそれぞれ測定した。

(3) siRNA/脂質ナノ粒子による in vitro 遺伝子発現抑制効果/細胞毒性の評価

(2)と同様の方法で形成した siGL3/脂質ナノ粒子を 96-well マイクロプレートに播種したホタルルシフェラーゼ発現ヒト肺がん細胞 (A549-Luc 細胞) に添加し、ホタルルシフェラーゼ発現に基づく発光および AlamarBlue 試薬との反応による発光を検出・強度解析することで、遺伝子発現抑制効果および細胞毒性をそれぞれ評価した。

(4) siRNA/脂質粉末微粒子の吸入特性の評価

製造した siGL3/脂質粉末微粒子の吸入特

性をアンダーセン型カスケードインパクターを用いて評価した。得られた粒子沈着パターンを基に、吸入器からの放出性の指標値 (output efficiency: OE)、肺送達性の指標値 (fine particle fraction: FPF)、肺深部送達性の指標値 (ultrafine particle fraction: UFPF) をそれぞれ算出した。

(5) siRNA/脂質粉末微粒子肺内投与後の siRNA の体内動態/構造安定性の評価

製造した Cy5.5-siGL3/脂質粉末微粒子を健常マウスに肺内投与後、経時的にマウス全体の Cy5.5 の蛍光イメージング画像を撮像した (in vivo 蛍光イメージング)。投与 24 時間後の in vivo 蛍光イメージングに続いて臓器を摘出し、Cy5.5 の蛍光イメージング画像を撮像した (ex vivo 蛍光イメージング)。得られた in vivo および ex vivo 蛍光イメージング画像に region of interest (ROI) を配置し、各 ROI 内の蛍光強度解析を行うことで siRNA の体内動態を評価した。酸性グアニジン・フェノール・クロロホルム法により臓器から抽出した RNA サンプルについて変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を行った後、Cy5.5 の蛍光検出により Cy5.5-siGL3 に相当するバンドの有無を確認することで (PAGE 蛍光イメージング)、siRNA の体内構造安定性を評価した。

(6) siRNA/脂質粉末微粒子肺内投与後の in vivo 遺伝子発現抑制効果/肺障害性の評価

製造した siGL3/脂質粉末微粒子を健常マウスに肺内投与し、24 時間後に気管支肺胞洗浄液 (BALF) を回収した。BALF 中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性および炎症性サイトカイン (インターロイキン (IL)-6、インターフェロン (IFN)- γ 、腫瘍壊死因子 (TNF)- α) 濃度を肺障害性マーカーとして定量した。

遺伝子発現抑制効果の評価では、ホタルルシフェラーゼ発現マウス大腸がん細胞 (colon26-Luc 細胞) の尾静脈内投与により作成した肺転移がんモデルマウスを用いた。モデルマウスに siGL3/脂質粉末微粒子を肺内投与後、肺内でのホタルルシフェラーゼ発現に基づく発光を検出・強度解析し、Leu のみからなる粉末微粒子 (コントロール) および siRL/脂質粉末微粒子の結果と比較することで遺伝子発現抑制効果を評価した。

4. 研究成果

(1) siRNA/脂質粉末微粒子の粒子構造

組成に依らず調製した全ての siRNA/脂質粉末微粒子は、粒子径が 5 ~ 10 μm で SFD 法特有の中空多孔性に富む球状構造を有することを SEM 観察から確認できた (図 1)。

(2) siRNA/脂質ナノ粒子の粒子物性

ナノ粒子組成として PEG 誘導体を添加した場合に、平均粒子径が 130 ~ 270 nm、PdI が 0.18 ~ 0.40 のある程度の均一性を有する

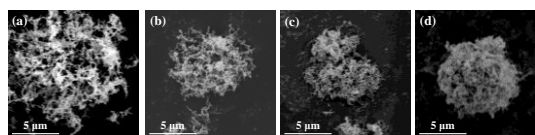


図 1. (a) Man, (b) Phe, (c, d) Leu を賦形剤とする各 siRNA/脂質粉末微粒子の SEM 画像: (a) NP DP2 (siGL3), (b) NP DP3 (siGL3), (c) NP DP4 (siGL3), (d) NP DP10 (siGL3).

siRNA/脂質ナノ粒子を粉末微粒子溶解後に形成することが明らかとなった (表 2)。このようなサイズと均一性を有するナノ粒子を得るためには、PEG 誘導体の分子量が約 2000 および約 5000 のもので、それぞれナノ粒子組成の 10% および 5% 以上 (モル比) を占める必要性が示された。一方、PEG 誘導体の脂溶性部分の構造の違いがナノ粒子の物性に及ぼす明確な影響は認められなかった。また、賦形剤の種類についても、ナノ粒子の物性に及ぼす明確な影響は認められず、優れた肺送達性が期待できる Phe および Leu を賦形剤に用いた場合でも、サイズと均一性の両面で良好なナノ粒子を形成することができた。ナノ粒子組成中のカチオン性脂質の種類について、DOTAP および DOTMA を単独で用いた場合にはゼータ電位が 15 ~ 55 mV とナノ粒子表面が正に帯電しているのに対し、DOTMA と DODMA を組み合わせた場合にはゼータ電位が -6 ~ -9 mV とナノ粒子表面が電気的により中性であることを確認できたが、形成するナノ粒子の平均粒子径および PdI の値には大きな違いが認められなかった。

表 2. 各 siRNA/脂質粉末微粒子から形成した siRNA/脂質ナノ粒子の粒子物性 (n = 3, mean \pm S. D.).

Formulation name	Mean particle size (nm)	PdI	Zeta potential (mV)
NP DP1 (siGL3)	2700 \pm 78	1.00 \pm 0.00	39 \pm 2
NP DP2 (siGL3)	265 \pm 6	0.29 \pm 0.01	52 \pm 0
NP DP3 (siGL3)	141 \pm 4	0.24 \pm 0.02	46 \pm 1
NP DP4 (siGL3)	144 \pm 14	0.23 \pm 0.05	44 \pm 2
NP DP5 (siGL3)	155 \pm 18	0.40 \pm 0.05	43 \pm 1
NP DP5 (Cy5.5-siGL3)	148 \pm 15	0.32 \pm 0.02	37 \pm 2
NP DP6 (siGL3)	167 \pm 32	0.28 \pm 0.04	52 \pm 2
NP DP7 (siGL3)	147 \pm 2	0.19 \pm 0.01	27 \pm 0
NP DP8 (siGL3)	144 \pm 1	0.18 \pm 0.01	22 \pm 2
NP DP9 (siGL3)	152 \pm 1	0.20 \pm 0.00	17 \pm 1
NP DP10 (siGL3)	136 \pm 4	0.22 \pm 0.02	-9 \pm 9
NP DP11 (siGL3)	140 \pm 3	0.24 \pm 0.05	-7 \pm 0
NP DP12 (siGL3)	204 \pm 3	0.38 \pm 0.02	-6 \pm 0
NP DP13 (siGL3)	187 \pm 4	0.37 \pm 0.02	-8 \pm 0

(3) siRNA/脂質ナノ粒子による in vitro 遺伝子発現抑制効果/細胞毒性

カチオン性脂質として DOTAP を含む siRNA/脂質ナノ粒子について、培養細胞に添加後の遺伝子発現抑制効果/細胞毒性を評価し、PEG 誘導体および賦形剤の種類ならびに曝露条件が及ぼす影響について検証した。『FBS 不含培地で 4 h』の曝露条件では、各 PEG 誘導体を含む siRNA/脂質ナノ粒子で siRNA として 50 nM 以上の曝露濃度で遺伝子発現抑制効果が見られた。一方、『FBS 含有培地で 48 h』の曝露条件では、PEG2000-Chol を含む siRNA/

脂質ナノ粒子が上記の曝露条件と同様の遺伝子発現抑制効果を示すのに対し、PEG5000-Chol および PEG2000-C14 を含む siRNA/脂質ナノ粒子では上記の曝露条件よりも明らかに遺伝子発現抑制効果が低かった。また、細胞毒性については、PEG2000-Chol を含む siRNA/脂質ナノ粒子の『FBS 含有培地で 48 h』の曝露条件で siRNA として 100 ~ 400 nM の範囲で曝露濃度依存的な細胞生存率の低下が認められたが、それ以外については著しい細胞生存率の低下が見られなかった。このような PEG 誘導の種類および曝露条件による遺伝子発現抑制効果/細胞毒性の影響については、培地中における PEG 誘導体のナノ粒子からの引き抜かれやすさ、あるいはナノ粒子そのものの安定性の違いが関与していると推察される。一方、賦形剤の種類については、ナノ粒子の物性の結果 (表 3) と同じく明確な影響は認められず、同様の遺伝子発現抑制効果および細胞毒性を示した。

続いて、カチオン性脂質を DOTAP (NP DP3 (siGL3)) から DOTMA (NP DP8 (siGL3)) に変更すると、遺伝子発現抑制効果がやや増大する傾向が認められた (図 2)。さらに、DOTMA と DODMA を組み合わせることで (NP DP11 (siGL3))、安全性を損ねることなく、遺伝子発現抑制効果を飛躍的に増大できることが明らかとなった (図 2)。DOTMA を単独で用いた場合と比べて、DODMA を組み合わせた場合には、ナノ粒子表面が電気的に中性となるためにエンドサイトーシスを介した細胞内移行性が低下するものの、pH 応答性の獲得によりエンドソーム内から細胞質への移行性が大きく改善されたことが遺伝子発現抑制効果の増大に繋がったと推察される。

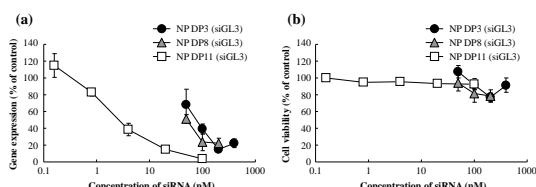


図 2. 各 siRNA/脂質粉末微粒子から形成した siRNA/脂質ナノ粒子の培養細胞に対する (a) 遺伝子発現抑制効果および (b) 細胞毒性 (n = 3-4, mean ± S. D.).

(4) siRNA/脂質粉末微粒子の吸入特性

賦形剤の種類について、Man を含む siRNA/脂質粉末微粒子と比較して、Phe および Leu を含む siRNA/脂質粉末微粒子の方が各吸入特性指標値が顕著に高い結果が得られた (表 3)。特に Leu を含む siRNA/脂質粉末微粒子では、OE で 94 ~ 97%、FPF で 51 ~ 70%、UFPF で 28 ~ 47% の値を示し、吸入剤应用到した優れた放出性ならびに肺送達性が明らかとなった。また、粉末微粒子に占めるナノ粒子含量が増加するに伴って肺送達性が低下する傾向が見られたが、3%以下 (重量比) であればその影響を回避できることを見出した。一方、ナノ粒子成分としてのカチオ

ン性脂質および PEG 誘導体の種類ならびに吸入器の分散性能による siRNA/脂質粉末微粒子の吸入特性への影響は、比較的小さいことが示唆された。

表 3. 各 siRNA/脂質粉末微粒子の吸入特性指標値 (n = 3-5, mean ± S. D.). 吸入器の分散性能: reverse > dual.

Formulation name	Inhalation device	OE (%)	FPF (%)	UFPF (%)
NP DP2 (siGL3)	Jethaler (reverse)	55 ± 13	13 ± 15	6 ± 7
NP DP3 (siGL3)	Jethaler (reverse)	96 ± 1	51 ± 5	22 ± 5
NP DP4 (siGL3)	Jethaler (reverse)	94 ± 1	62 ± 5	34 ± 5
NP DP7 (siGL3)	Jethaler (reverse)	96 ± 3	32 ± 4	16 ± 3
NP DP8 (siGL3)	Jethaler (reverse)	96 ± 2	44 ± 6	23 ± 5
NP DP9 (siGL3)	Jethaler (reverse)	96 ± 1	54 ± 3	26 ± 4
NP DP10 (siGL3)	Jethaler (reverse)	93 ± 5	55 ± 3	34 ± 2
NP DP11 (siGL3)	Jethaler (dual)	97 ± 1	51 ± 1	28 ± 7
NP DP11 (siGL3)	Jethaler (reverse)	95 ± 1	63 ± 2	39 ± 3
NP DP12 (siGL3)	Jethaler (reverse)	96 ± 1	70 ± 6	47 ± 6
NP DP13 (siGL3)	Jethaler (reverse)	95 ± 2	65 ± 4	44 ± 4
Leu DP	Jethaler (reverse)	90 ± 2	66 ± 3	51 ± 9

(5) siRNA/脂質粉末微粒子肺内投与後の siRNA の体内動態/構造安定性

Cy5.5-siGL3 単独溶液 (naked Cy5.5-siGL3 SL) の in vivo 蛍光イメージングでは、投与 1 時間後から肺のみならず全身で Cy5.5 の蛍光が検出された (図 3(a))。また、時間経過に伴って体内で検出される Cy5.5 の蛍光が弱くなる傾向が見られ、各 ROI 内の強度解析からも同様の時間推移を確認できた (図 3(b))。Ex vivo 蛍光イメージングの強度解析では、肺で最も高い蛍光強度が得られたが (図 3(c))、肺から抽出した RNA サンプルの PAGE 蛍光イメージングでは、Cy5.5-siGL3 に相当するバンドを検出できなかった (図 3(d))。これらの結果は、体内で検出された Cy5.5 の蛍光が Cy5.5-siGL3 の分解物あるいは解離した Cy5.5 に由来することを示しており、体内で siRNA の安定性が乏しいことを確認できた。

Cy5.5-siGL3/脂質粉末微粒子を水に溶解して調製した Cy5.5-siGL3/脂質ナノ粒子分散液 (NP DP5 SL (Cy5.5-siGL3)) の in vivo 蛍光イメージングでは、各測定時間に肺で局所的に強い蛍光が検出された (図 3(a))。各 ROI 内の強度解析からは、肺での蛍光強度が長時間に渡り維持されつつ、肝・腸・後足での蛍光強度が時間経過に伴って増加するという Cy5.5-siGL3 単独溶液の結果とは異なった傾向が認められた (図 3(b))。Ex vivo 蛍光イメージングの強度解析では、Cy5.5-siGL3 単独溶液と同様の結果を示したが (図 3(c))、肺から抽出した RNA サンプルの PAGE イメージングでは、Cy5.5-siGL3 単独溶液の結果とは異なり、Cy5.5-siGL3 に相当するバンドが認められた (図 3(d))。これらの結果より、ナノ粒子化による肺内での siRNA の滞留性ならびに安定性の向上が実証された。

Cy5.5-siGL3/脂質粉末微粒子そのもの (NP DP5 (Cy5.5-siGL3)) を肺内投与した場合

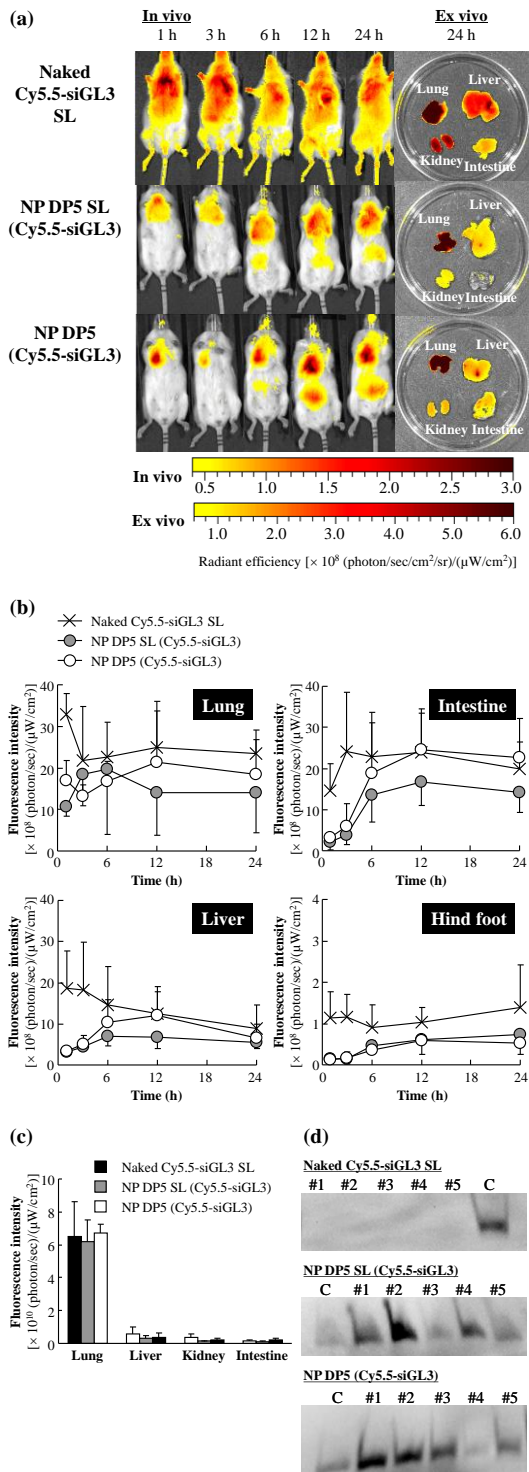


図 3. siRNA/脂質粉末微粒子肺内投与後の siRNA の体内動態/構造安定性: (a) in vivo 蛍光イメージング画像の時間推移および ex vivo 蛍光イメージング画像, (b) in vivo 蛍光強度解析, (c) ex vivo 蛍光強度解析, (d) PAGE 蛍光イメージング画像 (n = 5, mean ± S. D.).

でも、in vivo/ex vivo/PAGE 蛍光イメージングにおいて Cy5.5-siGL3/脂質ナノ粒子分散液と同様の結果が得られ、『粉末微粒子が肺内で沈着・溶解後に、ナノ粒子を形成して機能する』という当初の目的を達成できたことを強く支持する結果と考えている。また、カチオン性脂質および PEG 誘導体の種類を変えて検討した全ての Cy5.5-siGL3/脂質ナノ粒

子分散液および Cy5.5-siGL3/脂質粉末微粒子で in vivo/ex vivo/PAGE 蛍光イメージングの結果に大きな違いが認められなかったことから、ナノ粒子化による効果が同様に発揮されたと考えられる。

(6) siRNA/脂質粉末微粒子肺内投与後の in vivo 遺伝子発現抑制効果/肺障害性

カチオン性脂質として DOTAP を含む siRNA/脂質粉末微粒子について、肺内投与後の肺障害性を評価し、PEG 誘導体の種類が及ぼす影響について検証した。LDH 活性について、siRNA/脂質粉末微粒子投与群では、水投与群および Leu のみの粉末微粒子投与群と同程度の値を示したことから (図 4(a))、PEG 誘導体の種類によらず siRNA/脂質粉末微粒子が引き起こす気道上皮細胞膜の損傷は比較的軽微と考えられる。炎症性サイトカイン濃度について、PEG2000-Chol を含む siRNA/脂質粉末微粒子 (NP DP4 (siGL3)) 投与群では、LPS 投与群よりも低濃度ではあるが、水投与群および Leu のみの粉末微粒子投与群よりも高濃度の IL-6、IFN- γ 、TNF- α が検出され (図 4(b-d))、炎症の誘起が窺えた。一方、PEG2000-Chol と比較して PEG5000-Chol および PEG2000-C14 を含む siRNA/脂質粉末微粒子 (NP DP5 (siGL3) および NP DP6 (siGL3)) 投与群では、炎症性サイトカイン濃度が低い傾向にあった。このような PEG 誘導の種類による炎症性の違いは、上記の in vitro 遺伝子発現抑制効果/細胞毒性の結果で見られた作用の違いと密接に関連していると思われる。

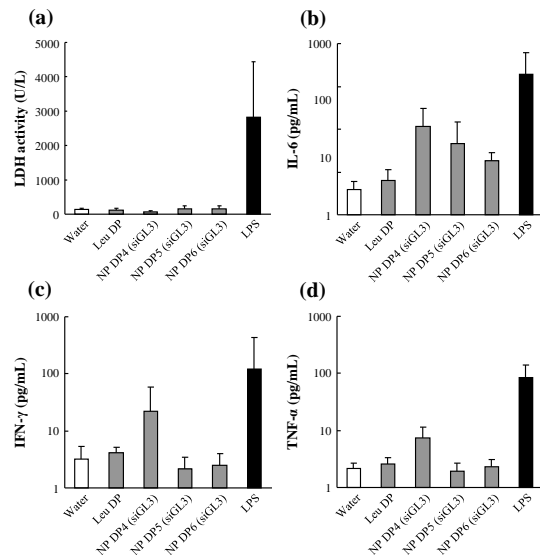


図 4. siRNA/脂質粉末微粒子肺内投与後の肺障害性: (a) LDH 活性, (b-d) 炎症性サイトカイン濃度 (n = 5-10, mean ± S. D.). ネガティブコントロール: 水および Leu DP, ポジティブコントロール: ドデシル硫酸ナトリウム (SDS, LDH 活性用) およびリポ多糖 (LPS, 炎症性サイトカイン濃度用).

カチオン性脂質として DOTMA と DODMA を組み合わせた siRNA/脂質粉末微粒子について、マウス肺内投与後の遺伝子発現抑制効果を

評価した。コントロール群では、日数の経過に伴って、ホタルルシフェラーゼ発現がん細胞の増殖を反映した肺内発光強度の増加を確認できた(図 5(a))。ホタルルシフェラーゼに特異的な siGL3/脂質粉末微粒子投与群では、投与後 3-4 日目にコントロール群と比較して肺内発光強度の増加が抑えられたのに対し、非特異的な siRL/脂質粉末微粒子投与群では、そのような効果は認められなかったことから(図 5(b))、siRNA/脂質粉末微粒子による配列特異的な遺伝子発現抑制効果が示唆された。また、この効果は、マウス 1 匹当たり siRNA として 1 μ g の少量投与で得られたことから、比較的強力な遺伝子発現抑制効果であることが窺えた。

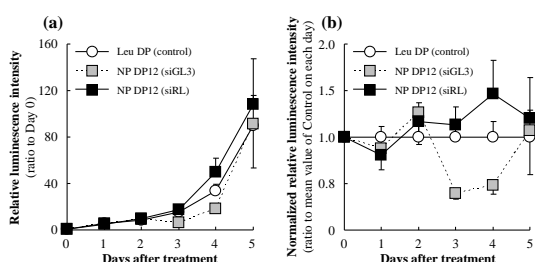


図 5. siRNA/脂質粉末微粒子肺内投与後の遺伝子発現抑制効果: 肺内発光強度の (a) 経日変化および (b) control に対する比率 (n = 6-9, mean \pm S.E.).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 奥田 知将、物性・機能を維持するナノ粒子搭載型吸入用粉末微粒子の創製、薬学雑誌、査読有、137 巻、2017、1339-1348 DOI: 10.1248/yakushi.17-00155
- ② 奥田 知将、岡本 浩一、肺内で自己組織化 siRNA/脂質ナノ粒子を形成する吸入粉末剤の開発、ファームテクジャパン、査読無、32 巻、2016、2685-2691

[学会発表] (計 11 件)

- ① 奥田 知将、噴霧急速凍結乾燥技術を基盤とした肺深部送達型吸入粉末剤の開発とその応用、日本薬剤学会第 33 年会、2018
- ② 當間 海吏、奥田 知将、三浦 忠将、岡本 浩一、自己組織化 siRNA/脂質ナノ粒子を形成する吸入用粉末微粒子を経肺投与した際の siRNA の体内動態/構造安定性及び肺遺伝子発現抑制効果、日本薬剤学会第 33 年会、2018
- ③ 三浦 忠将、奥田 知将、當間 海吏、渡部 沙南、岡本 浩一、複合脂質を基盤とした自己組織化 siRNA/脂質ナノ粒子型吸入粉末剤の開発、第 33 回日本 DDS 学会学術集会、2017
- ④ 三浦 忠将、奥田 知将、杉浦 朋恵、

西口 祥生、岡本 浩一、自己組織化 siRNA/脂質ナノ粒子を静脈内/肺内投与した際の siRNA の体内動態/構造安定性、日本薬学会第 137 年会、2017

- ⑤ Tomoyuki Okuda、Hiroki Iwai、Hirokazu Okamoto、Biodistribution and Biostability of siRNA Following Intravenous and Pulmonary Administration of Self-Assembled siRNA/Lipid Nanoparticles、3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo、2016
- ⑥ 奥田 知将、ナノ粒子の物性と機能を維持した次世代型吸入粉末剤の創製、第 22 回創剤フォーラム若手研究会、2016
- ⑦ 奥田 知将、物性・機能を維持するナノ粒子搭載型吸入用粉末微粒子の創製、第 62 回日本薬学会東海支部総会・大会、2016
- ⑧ 西口 祥生、杉浦 朋恵、奥田 知将、岡本 浩一、凍結乾燥法を用いた siRNA/自己組織化ナノ粒子の処方最適化、日本薬学会第 136 年会、2016
- ⑨ 岩井 宏樹、奥田 知将、杉浦 朋恵、西口 祥生、岡本 浩一、siRNA/脂質粉末微粒子肺内投与後の siRNA の体内動態/安定性に及ぼすポリエチレングリコール脂質の効果、第 31 回日本 DDS 学会学術集会、2015
- ⑩ 岩井 宏樹、奥田 知将、杉浦 朋恵、西口 祥生、岡本 浩一、近赤外蛍光イメージング解析に基づく自己組織化 siRNA/脂質吸入粉末剤の体内動態/安定性評価、日本薬学会第 135 年会、2015
- ⑪ 石川 奈央佳、奥田 知将、岡本 浩一、自己組織化脂質ナノ粒子を基盤とした siRNA 吸入粉末剤の開発、日本薬剤学会第 29 年会、2014

[その他]

ホームページ等
<http://www.yaku.meijo-u.ac.jp/kenkyu/drug-delivery/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 知将 (OKUDA, Tomoyuki)
 名城大学・薬学部・助教
 研究者番号: 20513857

(4) 研究協力者

岡本 浩一 (OKAMOTO, Hirokazu)
 名城大学・薬学部・教授
 研究者番号: 00308941