

《様式B》

研究テーマ	「細菌応答性ナノメディシン開発技術に関する萌芽研究」		
研究責任者	所属機関名	名古屋市立大学	大学院薬学研究科
	官職又は役職	講師	
	氏名	田上 辰秋	メールアドレス tagami@phar.nagoya-cu.ac.jp
共同研究者	所属機関名	名古屋市立大学	大学院薬学研究科
	官職又は役職	教授	
	氏名	尾関 哲也	

(平成 29 年度募集) 第 30 回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要

本研究計画では、これまでにない革新的な薬物ナノキャリアとして、細菌に応答して薬物を放出するようリポソームの開発を行った。ポリエチレングリコールを化学構造内にもつ界面活性作用のある化合物（PEG 系界面活性剤）をリン脂質ナノカプセルであるリポソームの膜組成に組み込んだリポソームを調製した。その結果、グラム陰性菌の菌体外壁成分で内毒素として広く知られるリポポリサッカライド（LPS）に高い感度で応答して、薬物を放出することを発見した。LPS は濃度依存的に表面張力が低下したものの、その減少幅はわずかであった。そのため、今回開発したリポソームは、LPS の構造と高い親和性で相互作用する結果、薬物を放出することが示唆された。このリポソームに抗菌薬を封入して吸入剤として製剤化することにより、吸入により直接肺組織に到達したリポソームが、細菌が多く存在している感染部位特異的に高濃度の薬物を放出することが予想できる。本研究計画で得られた成果をもとに研究を進めていくことにより、革新的なナノメディシンが創出されることが期待できる。

今後実験を進め、実際のグラム陰性菌を用いた場合において、薬物が放出され、抗菌効果が得られた場合、特許出願を検討する。また、他の抗菌薬・抗生物質を併用することにおいてリポソームの薬物放出が認められた場合、特許出願を検討する。従って、現時点で得られた成果において、特許申請は行わない。

2. 実施内容および成果の説明

本研究では、薬物送達用のキャリアとして、リポソーム (Liposome) を用いた。リポソームは、リン脂質から構成される小胞であり、内部に薬物を封入することにより、カプセルのように使用することができる。リポソーム内には、作用が強く治療域が狭い薬物を封入すると効果的であることが多い。通常、薬物の溶液を生体内に投与したとき、薬物は目的の部位以外の場所にも分布するため、副作用の原因となる。これに対し、薬物をリポソームに封入することにより、生体内における薬物の分布・薬物の体内動態を制御することができる。そのような理由により、リポソーム内に封入する薬物として抗がん剤がよく検討され、難治性のがんに対する研究報告が行われてきた。今回は、リポソームの吸入剤の開発を目的に開発を行っており、副作用の強い水溶性抗菌薬の封入を視野に入れて検討を行っている。

多くのリポソームは、リン脂質の表面にポリエチレングリコール (PEG) の化学修飾をすることが多く、本研究で開発したリポソームの表面にも PEG が化学修飾されている。PEG には水分子が付加し、水和層がリポソームの表面に形成される。リポソームを PEG 修飾することにより、生体内における貪食細胞からの非特異的な貪食を回避することができることが知られている。例えば、リポソームを血中に投与した場合、PEG 化をしなかったリポソームは、生体内に存在するマクロファージなどの貪食細胞に認識され、貪食を受ける。リポソームの表面に補体成分が吸着し、いわゆる自然免疫によってマクロファージによりリポソームは排除される。これに対し、リポソーム表面に PEG を修飾した場合、水和層のために補体成分が吸着しにくくなるため、リポソームの血中滞留性が顕著に改善する。今回、リポソームの吸入剤に関する研究を実施したが、リポソームを吸入した場合においても同様に肺組織内に存在する肺胞マクロファージによる貪食をうけるため、マクロファージを標的としない場合は、PEG 化が有効であると思われ、本研究においても PEG 修飾を行っている。

また、リポソームのサイズについては、100 nm まで小さくしたリポソームがよく使用されており、本研究においても 100 -200 nm 程度までサイズを小さくした。先述した PEG 修飾リポソームのサイズを 100 nm 程度まで小さくすることにより、マクロファージによる認

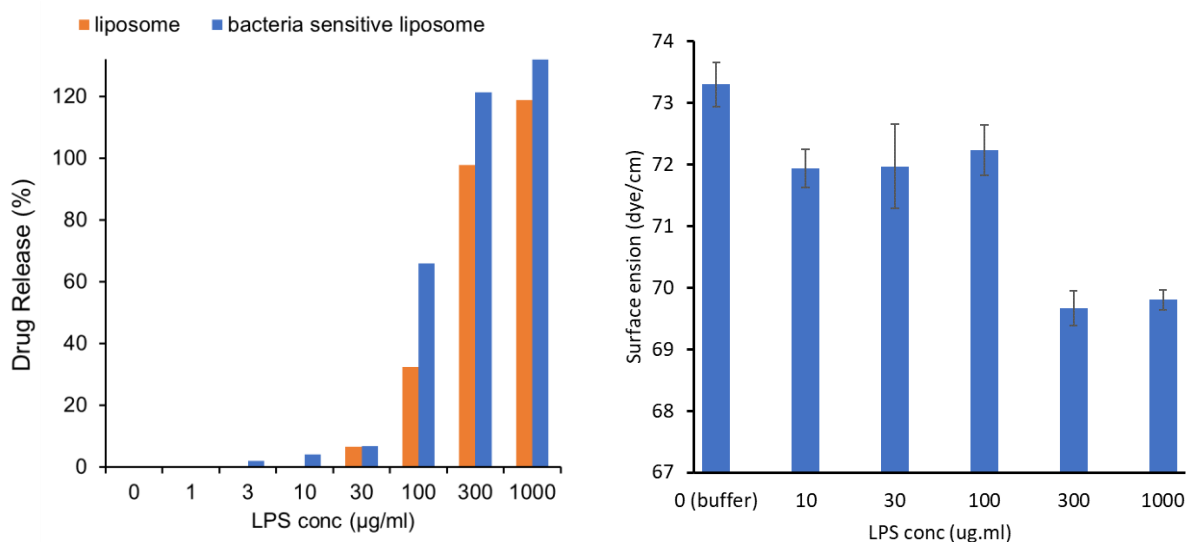
識・食食をさらに最小限にすることが期待できる。また 100 nm までサイズを小さくしたリポソームは、200 nm のフィルターを通過することができるため、リポソームを製造する場合においてろ過滅菌することができる。リン脂質から構成されているリポソームは加熱によって膜が揺らぎ、崩壊してしまうため、非加熱滅菌であるろ過滅菌はリポソームの製造において有用である。

がんに対する最初のナノメディシンとして知られているナノ粒子の製剤としてドキシル (Doxil: <https://www.doxil.com/>) がよく知られている。ドキシルは、先述したように抗がん剤であるドキシソルビシンを PEG 修飾リポソームに封入した約 100 nm ほどのリポソームである。ドキシソルビシンは、重篤な副作用として、心臓に対する毒性が知られているが、リポソーム製剤とすることにより心毒性の副作用は大きく減少している。また 100 nm に制御することによりリポソームが固形がん組織に受動的に蓄積していく現象 (通称: EPR 効果) が知られており、ドキシルは、がん組織特異的に標的される製剤として知られている。

このようにドラッグデリバリーシステムの研究は、薬物を目的の場所に、目的の量、目的のタイミングで送達する方法論の学問であり、研究が行われている。ドキシルの方法論・戦略 (ターゲティング) に対して、目的の部位に送達するための別の戦略としてトリガーリリース (コントロールドリリース) が検討されており、本研究計画においてこの方法論を応用した。トリガーリリースは、なんらかの刺激をトリガーにして、キャリア (本研究ではリポソーム) に封入された薬物を放出させる戦略のことである。刺激としては、熱・光・超音波といった物理的刺激の他、pH などの化学的刺激、酵素分解といった生物的刺激がこれまでに検討されている。私が行った過去の主な検討例では、温熱感受性リポソームを報告している。がん組織を加温しておき (臨床では、マイクロ波やラジオ波を出す医療機器が相当)、温度感受性リポソームを血中に投与すると、がん組織を通過するリポソームが温度に応答して薬物が放出されることにより、がん組織選択的に薬物が蓄積し、高い治療効果を発揮しており、トリガーリリースの戦略が効果的であることを示している。

本研究では、これまでにない刺激応答性リポソームを起案し、肺組織における感染症に対

する細菌応答性のリポソーム吸入剤の開発を試みた。リポポリサッカライド（リポ多糖、LPS）は、グラム陰性菌の細胞壁外壁の成分であり、いわゆる内毒素のことであり、LPSは生体内の炎症反応・免疫を惹起する、感染症の主たる物質として広く知られている。このため、LPSに応答して薬物を放出するリポソームを調製することができれば、細菌が感染している部位特異的に薬物（抗菌薬、抗生物質）を放出することができるため、顕著な薬効を示すことができるのではないかと考えた。また薬物送達量・効率が改善することで、抗生物質や抗菌薬の耐性化にも有効であると考えられる。通常の錠剤による経口投与では、薬物は消化管から吸収されて血流を循環し、その後肺組織に到達される必要がある。しかしながら肺組織に到達する過程で薬物の多くは他組織に分布したり、肝臓で代謝を受け、さらに尿や便として排泄されてしまう。そのため、肺に到達する薬物量・送達効率が低いため、菌に到達したわずかな薬物量が菌の耐性化につながる可能性につながる。この場合、高用量の薬物を投与することになり副作用が発現してしまう。それを改善するためにリポソームを吸入剤として肺組織に直接送達し、さらに菌が増殖している感染部位において高用量かつ高濃度の抗菌薬を暴露することで効果的な治療効果が得られるのではないかと考えている。



「各 LPS 濃度においてリポソームから放出された薬物量の結果（37℃、5 分間）左図」

「各 LPS 濃度における緩衝液中の表面張力の測定結果。右図」

今回は、PEG 界面活性剤をリポソーム膜内に組み込むことにより、LPS に応答して薬物

を高感度で放出することを発見した（前ページ左図）。LPS 存在下におけるリポソームからの薬物放出量について結果を示した。今回は、PEG 系界面活性剤を組み込んでいるリポソーム（図中の *bacteria sensitive liposome*）と PEG 系界面活性剤を組み込んでないリポソームの比較を行った。その結果、LPS 濃度が 100 $\mu\text{g/ml}$ から 1000 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度領域において、緩衝液中において、*bacteria sensitive liposome* の方が、薬物（今回は、水溶性のモデル薬物として蛍光マーカーであるカルセインを用いた）を多く放出していることが明らかとなった。

この結果より、LPS が多く存在している部位において、今回開発したリポソームは薬物を多く放出することが明らかとなり、細菌応答性を示す可能性が示唆された。今後は、実際のグラム陰性菌を用いて、今回開発したリポソームが細菌に応答して薬物を放出するかどうか、抗菌効果も含め検討していく予定である。LPS は、細菌壁に内在している成分であり、生体内で免疫担当細胞によって破壊された細菌から漏れ出た LPS がリポソームと応答して薬物が放出されることが期待できる。また、既存の抗生物質・抗菌薬を含む、別の薬物を前投与してあらかじめ菌を殺菌して LPS を放出させることで、リポソーム製剤を投与し、一度に治療を行うような新しい治療法も期待できるかもしれない。

また、他の文献によると、細菌の外壁を構成する LPS は、細菌の種類によって少しずつ構造が異なることが報告されている。LPS は多糖に脂質が結合した構造を持っているが、細菌によって、多糖の構造や脂肪酸の種類や数が異なる。このため、菌の種類によって薬物の放出効率が異なる可能性が考えられ、今後、菌種を変更して検討すると興味深い結果が得られるものと思われる。

LPS は、界面活性能を持っていることが知られている。先述の通り、LPS は水溶性の多糖部分と脂溶性の脂質から構成されており、高濃度になると LPS はミセルを形成することが知られている。このため、今回開発した刺激応答性リポソームは、LPS と相互作用し、ある一定以上の濃度の LPS と相互作用することで、リポソームの膜表面に部分的にミセル様の孔を形成し、薬物を効率的に放出するのではないかと考えている。以前に報告した PEG 系界面活性剤を使用した温度感受性リポソームや酵素応答性リポソームに関しても、材料や刺激の

仕方は異なるが、高感度で薬物が放出されており、リポソーム膜表面に生じるナノサイズの孔が大量の薬物の放出につながっていると推定している^{1),2)}。

そこで、LPS 応答性リポソームのメカニズムの一助となることを期待して、LPS の表面張力をデュヌイ型表面張力計を用いて測定した（前々ページ右図）。その結果、LPS 濃度が増えるにつれて、表面張力が減少することがわかった。しかしながら、既存の界面活性剤と比較すると、ミセル形成が期待される高濃度ではないものの表面張力の低下はわずかであった。このため、表面張力の変化が薬物の放出に与える影響は、比較的わずかであると示唆される。LPS とリポソームの相互作用がリポソームの不安定化に関係し、今回調製したリポソームはさらに高感度で、LPS に応答して薬物放出できることを示している。

リポソームを吸入剤として適用する場合、ネブライザーが最適の吸入用の機器になると思われる。過去の検討において、PEG 系界面活性剤をリポソームに添加した場合においても薬物の漏出は最小限であり、吸入剤として適していることを確認している。このため、今回のリポソームにおいても、吸入剤に適したリポソームであると思われる。

最後になりましたが、本研究計画を遂行するにあたり、助成をしてくださった「東海産業技術振興財団」に深く感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) Tagami T, Kubota M, Ozeki T. Effective Remote Loading of Doxorubicin into DPPC/Poloxamer 188 Hybrid Liposome to Retain Thermosensitive Property and the Assessment of Carrier-Based Acute Cytotoxicity for Pulmonary Administration. *J Pharm Sci.* (2015) **104**(11):3824-32.
- 2) Tagami T, Ando Y, Ozeki T. Fabrication of liposomal doxorubicin exhibiting ultrasensitivity against phospholipase A2 for efficient pulmonary drug delivery to lung cancers. *Int J Pharm.* (2017) **517**(1-2):35-41.