

学位論文の内容の要旨

学位論文題目 肺投与型ドラッグデリバリーシステムの
肺がん治療における有用性に関する研究

指導教員 丁野純男



学位申請者 兼平幸宗



肺がんは我が国のがん死亡数の第一位であり、世界的にも上位であることから、最優先して克服すべき疾患である。肺がん治療のために、病態の進行や発症に關与する分子標的薬などの薬理学的研究が盛んに行われているが、未だ奏功する治療薬の開発には至っていない。その理由として、優れた薬理作用を有する抗腫瘍薬であっても、骨髄抑制や重篤な腎障害などの他臓器における副作用発現のために、治療途中で投与中止や減量を余儀なくされることが挙げられる。それゆえ、抗腫瘍薬の腫瘍組織への選択的送達による、高い治療効果と安全性を両立した、新たな肺がん治療法の開発が切望されている。

これまでに、当研究室では呼吸器感染症や肺線維症の治療を目的として、肺投与型ドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発研究を進めてきた。その過程において、肺投与は、血液を介さずに肺内へ直接薬物を送達可能な方法であり、全身性副作用を回避できることから、静脈内投与や経口投与に替わる新規投与経路として有用であることを強く示唆してきた。一方、病態の種類や進行状況によっては、標的細胞への薬物送達効率や肺内滞留性が不足し、十分な治療効果が得られない場合があることも同時に明らかとしてきた。すなわち、肺がん治療に最適化した肺投与型 DDS を構築するためには、抗腫瘍薬を直接送達することに意義があるか否かを把握したうえで、送達する抗腫瘍薬の治療効果を最大限に発揮させることができる製剤の設計・調製が必要である。

本研究では、肺がん治療を指向した肺投与型 DDS の構築を目的とし、転移性肺がんモデルマウスを用いて種々の検討を行った。以下、1. 肺がん治療における抗腫瘍薬の肺への直接送達の意義、2. 腫瘍細胞への標的指向能を付与したナノ粒子製剤の設計・調製、3. ナノ粒子製剤を用いた肺投与型 DDS の肺がん治療における有用性について各々論述する。

1. 肺がん治療における抗腫瘍薬の肺への直接送達の意義

肺がん治療において、抗腫瘍薬を肺へ直接送達することに意義があるか否かを検討した。マウスメラノーマ（B16F10）をマウスの尾静脈内に注入し、転移性肺がんモデルマウスを作成した。蛍光観察が可能な抗腫瘍薬であるドキソルビシンをモデル薬物とし、その溶液を MicroSprayer で肺投与したのち、採血及び肺の摘出を行った。通常の投与経路である静脈内に投与した場合と比較して、肺投与した場合のドキソルビシンの肺中濃度は有意に高く、逆に血清中濃度は有意に低値であった（Fig. 1）。また、腫瘍部位を明確にした組織薄切切片像においても、肺投与した場合には、ドキソルビシン由来の蛍光が静脈内投与時と比較して腫瘍部位に強く観察された（Fig. 2）。

これらの結果から、抗腫瘍薬の肺投与は、腫瘍部位への薬物送達性に優れた投与方法であることが示された。抗腫瘍薬を肺へ直接送達することは、薬効増強のみならず、血液を介した他臓器への分布に由来する全身性副作用の回避の観点からも意義深いと考える。

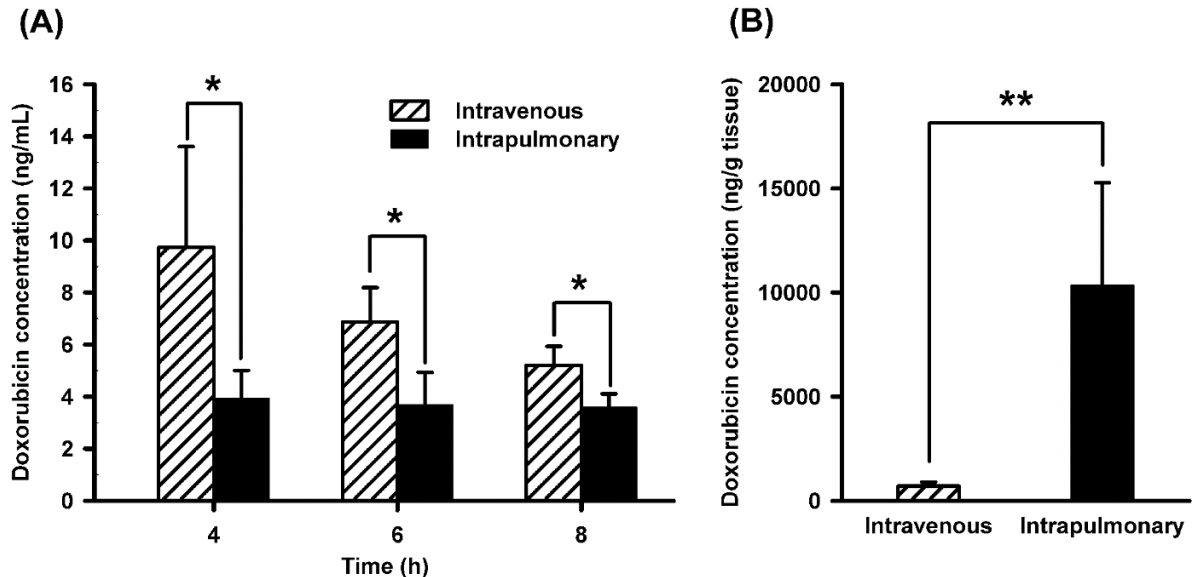


Fig. 1 Doxorubicin concentrations in serum (A) and in the lungs (B) following intrapulmonary and intravenous administration to mice with metastatic lung tumor

Doxorubicin (400 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was administered intrapulmonarily or intravenously to mice with metastatic B16F10 lung tumor. The doxorubicin concentrations in serum at 4, 6, and 8 h and those in the lungs at 8 h are shown. Each point represents the mean \pm SD (n = 4). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

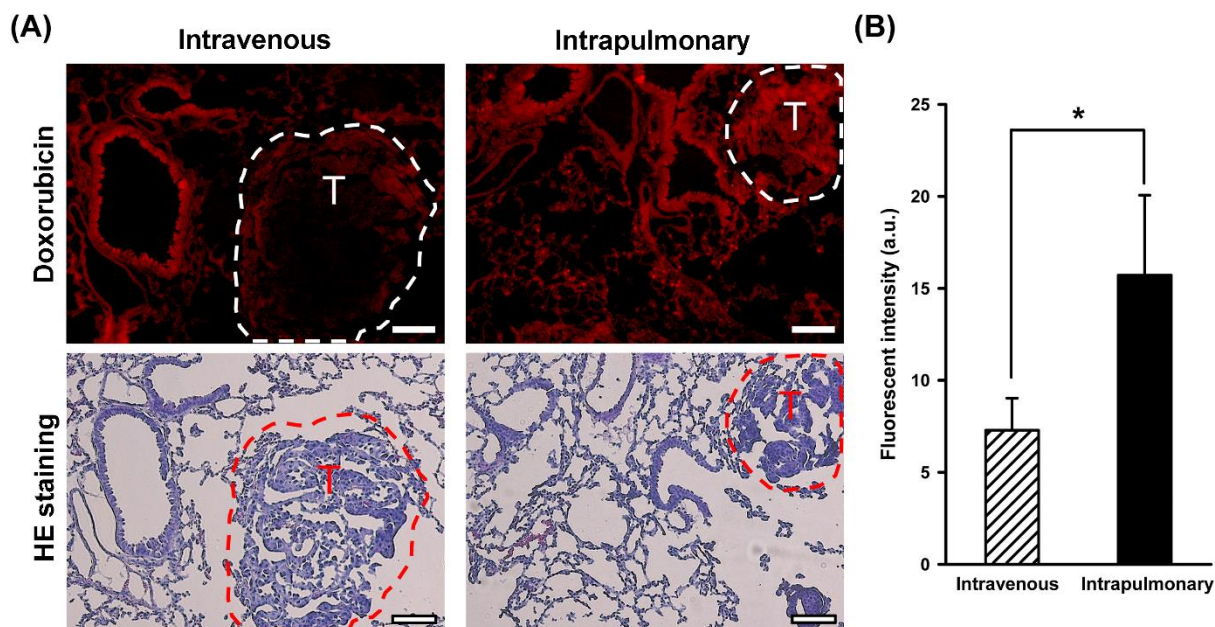


Fig. 2 Doxorubicin distribution in the lung following intrapulmonary and intravenous administration to mice with metastatic lung tumor

Doxorubicin (400 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was administered intrapulmonaryly or intravenously to mice with metastatic B16F10 lung tumor. At 8 h after administration, serial sections were prepared by cryobiopsy. (A); Red fluorescence indicates the distribution of doxorubicin in lung tissue. The dotted line represents the tumor region (T). Scale bar is 100 μm . (B); The fluorescent intensity derived from doxorubicin was analyzed using ImageJ software. Each point represents the mean \pm SD ($n = 3$). $*p < 0.05$.

2. 腫瘍細胞への標的指向能を付与したナノ粒子製剤の設計・調製

前項において、抗腫瘍薬を直接肺投与することで、腫瘍部位への優れた送達と全身性副作用の回避が可能であることが示唆された。しかしながら、抗腫瘍薬の多くは、腫瘍細胞のみならず他の多くの細胞に対して強い殺細胞作用を示すことから、肺投与すると肺の正常細胞に対する毒性発現の危険性が否定できない。そのため、より良い肺がん治療を行うためには、腫瘍細胞に対して選択的に作用する薬物を、腫瘍部位へ効率良く送達する必要がある。

21-23 塩基対から成る二本鎖 RNA である siRNA は、細胞質内に導入することで特定遺伝子の発現を抑制することから、従来の抗腫瘍薬とは異なり、腫瘍細胞に対して選択的な作用を示すことが期待される。その一方で、siRNA は分子量が 1 万超の水溶性高分子であるため、細胞膜透過性が極めて低く、分解酵素に対する生体内安定性にも乏しいことから、siRNA を標的細胞の細胞質内に導入するための優れた送達技術の開発が求められている。

このような背景のもと、siRNA の腫瘍細胞への標的指向能を付与した肺投与型 DDS を構築すべく、siRNA を封入したナノ粒子製剤を設計・調製することとした。ナノ粒子製剤の設計・調製のコンセプトとしては、siRNA を製剤内にパッケージングするために「siRNA を製剤コア内へ充填する」、siRNA の生体内安定性を向上させるために「製剤コアを被覆保護する」、siRNA の細胞膜透過性を向上させるために「製剤表面に正電荷を付与するとともに、腫瘍細胞に対する特異的リガンドを修飾する」ことの 3 点を掲げた。これらのコンセプトのもと、3 段階のプロセスにてナノ粒子製剤の調製を試みた (Fig. 3)。

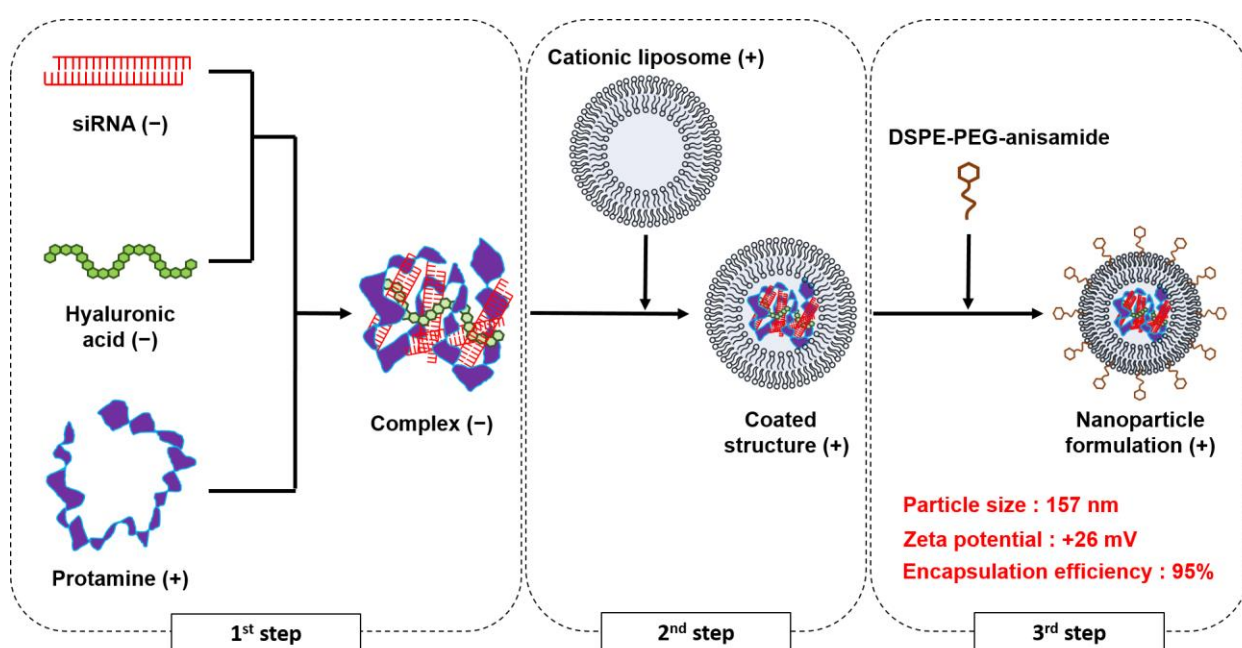


Fig. 3 Preparation of nanoparticle formulation

調製プロセスの第 1 段階では、siRNA を製剤コア内へ充填するために、負電荷を有する siRNA と負電荷のヒアルロン酸及び正電荷のプロタミンを混合し、静電的相互作用により負電荷の複合体を形成させた。第 2 段階では、製剤コアである複合体を被覆保護して siRNA の生体内安定性を向上させるため、負電荷の複合体とカチオン性リポソームを混合し、複合体を被覆した構造体を形成させた。第 3 段階では、腫瘍細胞に過剰発現するシグマレセプターの特異的リガンドであるアニサミドを表面に修飾して siRNA の細胞膜透過性を付与するため、被覆構造体と DSPE-PEG-anisamide を混合し、相転移による脂質二重膜の物理的変化を利用して最終のナノ粒子製剤を調製することに成功した。

調製したナノ粒子製剤の B16F10 への siRNA 送達効率を *in vitro* にて評価した。ナノ粒子製剤の siRNA 送達率は、アニスアミドで表面修飾していないコントロール製剤に比べ有意に高く、このことはナノ粒子製剤の腫瘍細胞への標的指向能の高さを示すものである (Fig. 4)。

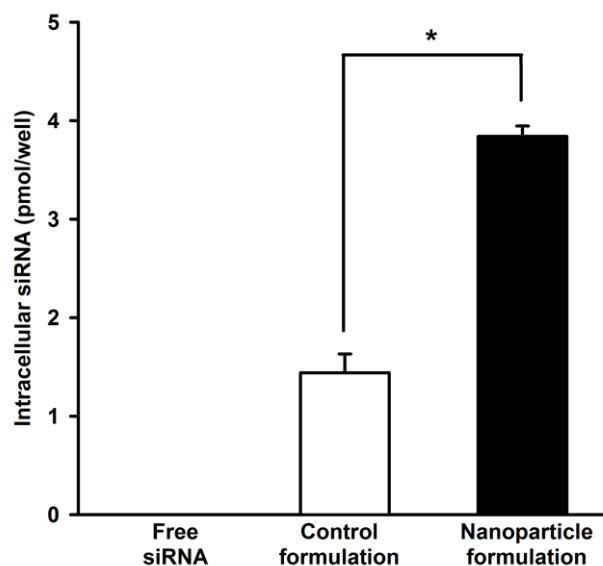


Fig. 4 *In vitro* intracellular siRNA delivery of nanoparticle formulations in B16F10 cells

Nanoparticle formulations containing fluorescent-labeled siRNA (200 nM) were applied to B16F10 cells (1×10^5 cells) and then incubated at 37°C for 4 h. After incubation, the intracellular fluorescent-labeled siRNA was determined. Each point represents the mean \pm SD (n = 4). * $p < 0.01$.

3. ナノ粒子製剤を用いた肺投与型 DDS の肺がん治療における有用性

前項において、siRNAの腫瘍細胞への標的指向能に優れたナノ粒子製剤を設計・調製することができた。本項では、腫瘍増殖及び転移を促進する VEGF、c-Myc及びMDM2をコードする遺伝子を標的とする3種類のsiRNA（抗腫瘍siRNA）を1:1:1のモル比で混合封入したナノ粒子製剤を調製し、その抗腫瘍効果を評価した。

抗腫瘍効果の評価に先立ち、このナノ粒子製剤をB16F10に適用し、それぞれの腫瘍関連タンパク質の発現に及ぼす影響を免疫蛍光抗体法により検討したところ、これらのタンパク質の発現量は低下した (Fig. 5)。このことは、ナノ粒子製剤の遺伝子抑制効果を示すものである。

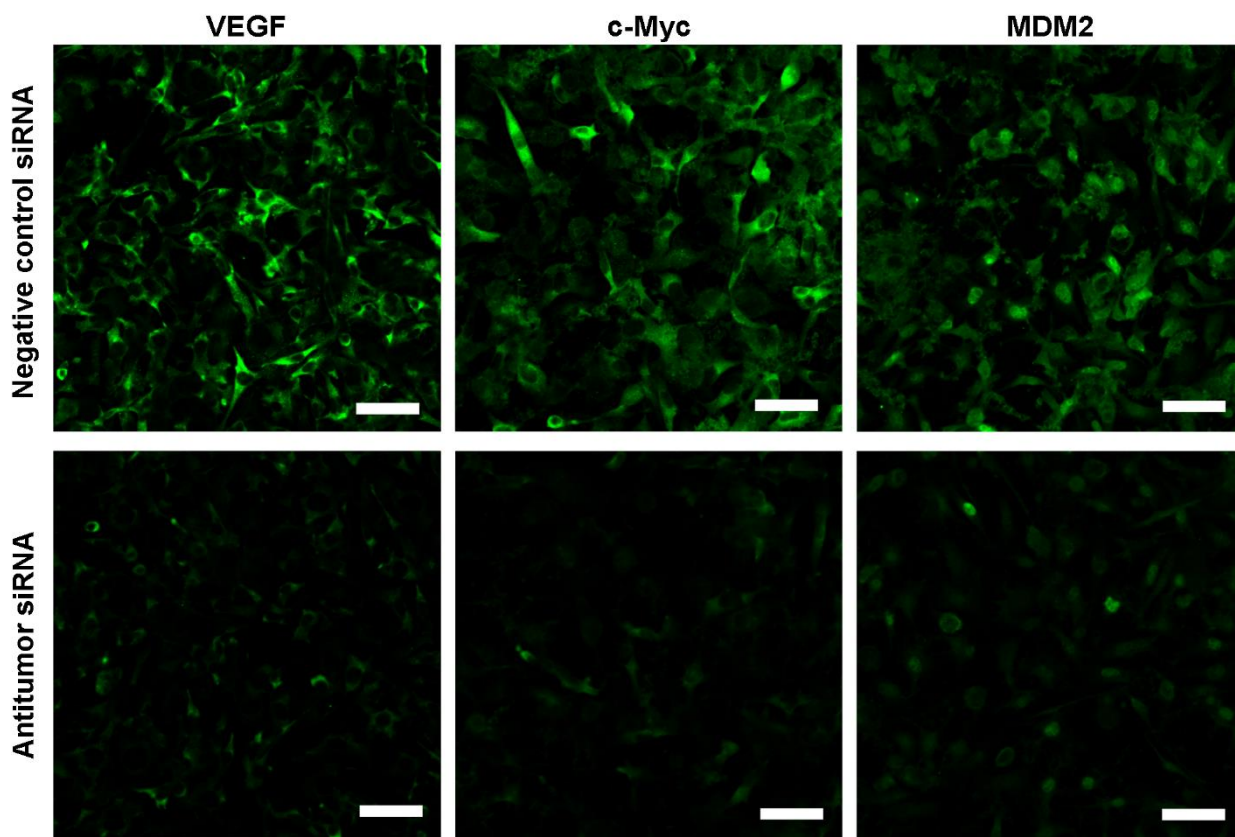


Fig. 5 *In vitro* oncogene silencing effect of nanoparticle formulations containing antitumor siRNA in B16F10 cells

Nanoparticle formulations containing antitumor siRNA (200 nM, VEGF/c-Myc/MDM2 = 1:1:1 molar ratio) were applied to B16F10 cells and then incubated at 37°C for 24 h. After incubation, VEGF, c-Myc, and MDM2 proteins were immunostained. Green fluorescence indicates the localization of VEGF, c-Myc, and MDM2. Scale bar is 50 μ m.

転移性肺がんモデルマウスに上記のナノ粒子製剤を肺投与し、抗腫瘍効果を評価した。すなわち、B16F10をマウスの尾静脈内に注入後、6、9、12、15及び18日目にナノ粒子製剤を肺投与し、その後の生存率を算出した (Fig. 6)。ナノ粒子製剤を肺投与した群では、コントロール群と比較して生存期間が有意に延長した。一方、ナノ粒子製剤を静脈内投与しても、生存期間の延長は認められなかった。これらの結果から、抗腫瘍siRNA封入ナノ粒子製剤の肺投与は肺がん治療に有用な肺投与型DDSであることが示された。

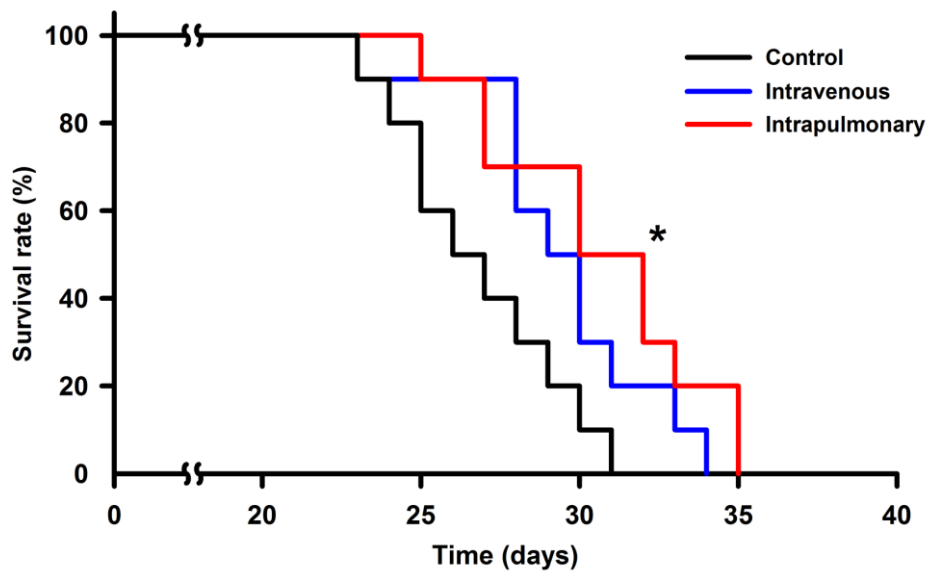


Fig. 6 Survival rate of mice with metastatic lung tumor following intrapulmonary and intravenous administration of nanoparticle formulations containing antitumor siRNA

Nanoparticle formulations containing antitumor siRNA (0.1 mg/kg, VEGF/c-Myc/MDM2 = 1:1:1 molar ratio) were administered intrapulmonarily or intravenously to mice on days 6, 9, 12, 15, and 18 after B16F10 injection. n = 10. * $p < 0.01$ as compared to control.

まとめ

本研究では、肺がん治療を指向した肺投与型 DDS の構築を目的とし、種々の検討を行った。得られた結果を以下に示す。

- ・ 抗腫瘍薬の肺投与は、腫瘍部位への薬物送達性に優れた投与方法であった。
- ・ 腫瘍細胞への標的指向能に優れた siRNA 封入ナノ粒子製剤を調製した。
- ・ 抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤の肺投与により、転移性肺がんモデルマウスの生存期間が有意に延長した。

以上の結果は、抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤を用いた肺投与型 DDS が肺がん治療において有用であることを示すとともに、その実用化に向けた学術的基盤を提供するものである。