

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

本論文は 2018 年北海道薬科大学における博士（薬学）の
学位取得のため提出し受理されたものである。

北海道薬科大学大学院薬学研究科
臨床薬学専攻博士課程

兼平 幸宗

目次

緒言	1
第 1 章 肺がん治療における抗腫瘍薬の肺への直接送達の意義	
第 1 節 序論	2
第 2 節 実験方法	3
第 3 節 結果	7
第 4 節 考察	10
第 2 章 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	
第 1 節 序論	11
第 2 節 実験方法	12
第 3 節 結果	18
第 4 節 考察	24
第 3 章 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	
第 1 節 序論	26
第 2 節 実験方法	27
第 3 節 結果	30
第 4 節 考察	35
総括	37
謝辞	38
参考文献	39

本論文で用いた略語

Alexa Fluor 750-siRNA : Alexa Fluor 750 修飾 siRNA

B16F10 Red-Fluc : *Lucifera Itarica* 由来ホタルルシフェラーゼ遺伝子導入
B16F10

DDS : ドラッグデリバリーシステム

DMEM : Dullbecco's modified Eagle's medium

DOTAP : 1,2-dioleoyl-3-trimethyl ammoniumpropane-chloride

DSPE - PEG₂₀₀₀ : 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[amino
(polyethylene glycol) (MW: 2000)]

DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS : 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin-*N*-[ami
no (polyethylene glycol) (MW: 2000)]-hydroxysuccin-
amide

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

HE : ヘマトキシリン・エオシン

HEPES : 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethane sulfonic acid

HiLyte Fluor 555-siRNA : HiLyte Fluor 555 修飾ネガティブコントロール
siRNA

HPLC : 高速液体クロマトグラフィー

LDH : 乳酸脱水素酵素

PBS : 生理的リン酸緩衝液

PEG : ポリエチレングリコール

RPMI 1640 : Roswell park memorial institute medium

siRNA : small interfering RNA

TEM : 透過型電子顕微鏡

Tris : Tris(hydroxymethyl)aminometane

VEGF : vascular endothelial growth factor

緒言

肺がんは我が国のがん死亡数の第一位であり¹⁾、世界的にも上位であることから²⁾、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³⁾、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⁴⁾、神経毒性⁵⁾や重篤な腎障害⁶⁾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⁷⁻⁹⁾。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¹⁰⁾。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。

第 1 章 肺がん治療における抗腫瘍薬の肺への直接送達の意義

第 1 節 序論

抗腫瘍薬を用いた肺がん治療においては、肺の腫瘍部位における抗腫瘍効果の増強に加え、他臓器への分布に起因する全身性副作用を回避することが大きな課題である¹¹⁾。この問題を解決するため、肺の腫瘍部位への高い送達性能を有する、ドキソルビシンのリポソーム製剤、パクリタキセルのアルブミン製剤及びシスプラチンのミセル化製剤などの様々な DDS が開発されている¹²⁾。しかし、これらの DDS はいずれも静脈内投与製剤であり、優れた抗腫瘍効果は期待できるものの、全身性副作用の劇的な改善には至っていない¹³⁾。

肺投与は、肺炎¹⁴⁾や慢性閉塞性肺疾患¹⁵⁾などの様々な呼吸器疾患の病巣に薬物を直接送達することができる新規投与経路として着目されている。また、肺投与は、血液を介した全身への薬物分布を低減できるため^{7,9)}、全身性副作用の回避の観点からも有用性が高い。一方、肺線維症のような肺胞上皮細胞の断裂といった肺胞構造の変化が起こる疾患においては、肺投与した薬物が速やかに血液中へ漏出し、肺内滞留性が著しく低下することも明らかとなっている¹⁰⁾。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、まず、抗腫瘍薬を肺に直接送達することに意義があるか否かを把握する必要がある。

本章では、転移性肺がんモデルマウスを用い、肺がん治療における、抗腫瘍薬の肺への直接送達の意義を検討した。

第 2 節 実験方法

1. 試薬

ドキソルビシンは日本化薬（東京）から購入した。ダウノルビシン塩酸塩は和光純薬工業（大阪）から購入した。その他の試薬は市販特級品もしくは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）用を用いた。

2. B16F10 の培養

B16F10（マウスメラノーマ細胞）は Riken cell bank（筑波）から購入した。培養液は、非働化した 10% ウシ胎児血清（Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA）及び 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシン（ゲンタシン、MSD、大阪）を含む Dullbecco's modified Eagle's medium（DMEM, 和光純薬工業）を使用した。培養は、25 cm^2 ポリスチレン製培養フラスコ（Corning Life Science Co., Corning, NY, USA）を用いて、37°C、5% CO_2 -95% Air 条件下で行った。培養液は 3 日毎に交換し、コンフルエントに達した細胞を 0.25% トリプシン-EDTA（和光純薬工業）を用いて回収し、継代を行った。実験には、継代数 24 - 38 の細胞を用いた。

3. 転移性肺がんモデルマウスにおける投与実験

C57BL/6 系雌性マウス（15 - 19 g、日本 SLC、静岡）に B16F10 (4×10^5 cells) を尾静脈内注入し、転移性肺がんモデルマウスを作成した（Figure 1）¹⁶。転移性肺がんモデルマウスに、ドキソルビシンをペントバルビタール麻酔下で液体気管内投与器具（Lipid MicroSprayer, Model 1A-1C, PennCentury Inc., Philadelphia, PA, USA）を用いて肺投与（400 $\mu\text{g}/1.25 \text{ mL}/\text{kg}$ body wt）、または尾静脈内投与（400 $\mu\text{g}/2.5 \text{ mL}/\text{kg}$ body wt）した。投与 4、6 及び 8 時間後、左頸静脈より採血した血液から血清を得た。投与 8 時間後に開腹し、腹部大動脈を切断することにより脱血死させた。速やかに肺を摘出し、付着した血液を洗浄してから、-80°C で保存した。また、ドキソルビシンの腫瘍組織への分布を評価する目的

で、後述する第 5 項の方法で、肺組織凍結切片を作成した。さらに、ドキソルビシンの腫瘍増殖抑制効果を評価する目的で、B16F10 投与 2、6、10 及び 14 日後にドキソルビシンを繰り返し投与した。なお、本実験は北海道薬科大学学長の承認 (No. 14 - 002) を受け、北海道薬科大学動物実験規程に基づいて実施した。

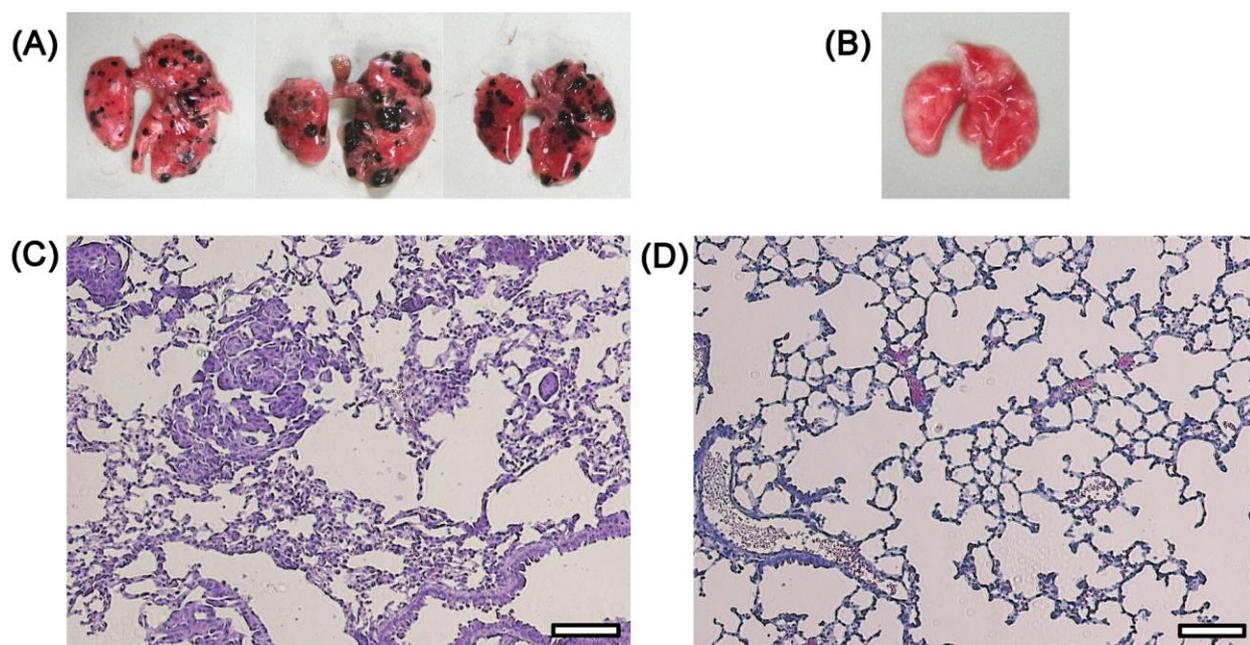


Figure 1 Pathologic features of the lungs in a mouse model of metastatic lung cancer at 14 days after B16F10 injection (A, C), compared with normal mouse lung tissue (B, D)

(A, B) Gross findings; (C, D) HE staining

Scale bar is 100 μ m.

4. ドキソルビシン濃度の測定

血清及び肺ホモジネート中のドキソルビシン濃度の測定は、Urva らの方法¹⁷⁾を参考に、HPLC により測定した。すなわち、摘出した肺 200 mg に対して 800 μ L の精製水を加え、ビオラモホモジナイザー VH-10 (アズワン、大阪) を用いて臓器ホモジネートを作成した。各試料 100 μ L に内標準物質であるダウノ

ルビシン水溶液 (1 µg/mL) 50 µL、アセトン 150 µL を加え、遠心分離 (15,000×g、5 分間、4°C) による除蛋白処理後、上清を HPLC に注入した。HPLC 条件は以下の通りである。なお、ドキシルビシンの検量線は 2.5 – 640 ng/mL の範囲で良好な直線性 ($R^2 = 0.999$) を示した。

HPLC 条件

移動相：0.1% トリエチルアミンリン酸緩衝液 (pH 3.0) /アセトニトリル = 75/25 (v/v)

サンプル注入量：50 µL

流速：0.4 mL/min

カラム：Mightysil RP-18 GP II, 250×4.6 mm, pore size 5 µm

(関東化学、東京)

ガードカラム：Mightysil RP-18 GP, 5.0×4.6 mm (関東化学)

カラム温度：35°C

ポンプ：HPLC 送液ユニット (LC-10ATVP; 島津製作所、京都)

検出器：分光蛍光検出器 (RF-10AXL; 島津製作所)

検出波長：励起波長 490 nm、蛍光波長 560 nm

5 肺組織凍結切片の作成

肺組織は、生体内凍結技法¹⁸⁾で固定処理した。すなわち、ペントバルビタール麻酔下で、小動物実験用人工呼吸器 (SN-480-7、シナノ製作所、東京) を装着し、1.5 respirations/sec で人工呼吸下においた。肋骨を切開したのち、肺を露出し、液体窒素で-160°C に冷却したイソペンタンを用いて、速やかに凍結した。凍結した肺組織片を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで置換固定 (overnight、4°C) を行った。さらに、肺組織片を 30%スクロースに浸漬 (overnight、4°C) した。O.C.T. Compound (サクラファインテック、東京) に包埋し、5 µm 厚の凍結組織切片を作成した。作成した切片は、常法に従ってヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を行うか、またはドキシルビシンの蛍光観察のために Fluoromount (Diagnostic BioSystems Inc., Pleasanton, CA, USA) で封入した。そ

の後、蛍光顕微鏡（Axio Vert. A1, Zeiss, Oberkochen, Germany）を用いて蛍光観察した。

6. 統計学的解析

得られた値は平均値±標準偏差で示した。統計解析は、SPSS Version 21（IBM Inc., Armonk, NY, USA）を用いて Student's t-test にて行い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

第3節 結果

肺がん治療における抗腫瘍薬の肺への直接送達の意義を検討した。転移性肺がんモデルマウスにおける、ドキソルビシン肺投与後の血清及び肺中濃度をFigure 2に示す。通常の投与経路である静脈内投与と比較して、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。

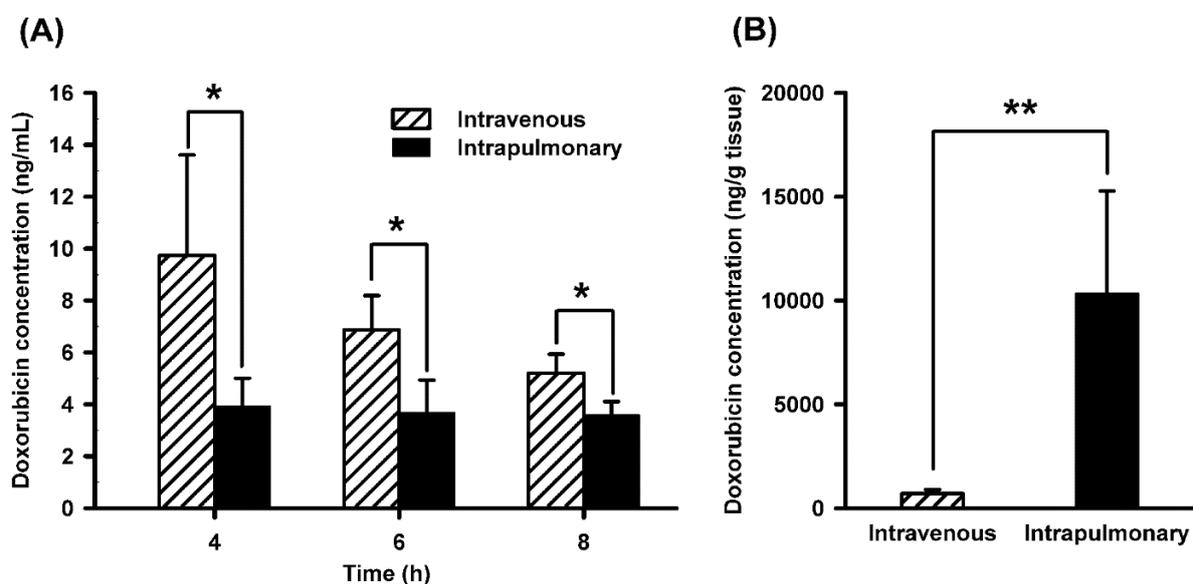


Figure 2 Doxorubicin concentrations in serum (A) and in the lungs (B) following intrapulmonary and intravenous administration to mice with metastatic lung tumor

Doxorubicin (400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body wt) 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 S.D. ($n = 4$). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

転移性肺がんモデルマウスにおける、ドキソルビシン肺投与後の腫瘍部位における薬物送達を検討するため、肺組織凍結切片を作成し、顕微鏡観察を行った。ドキソルビシン肺投与 8 時間後における、肺組織薄切切片像を Figure 3 に示す。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、輝度解析により得た蛍光強度の値も有意に高値であった。

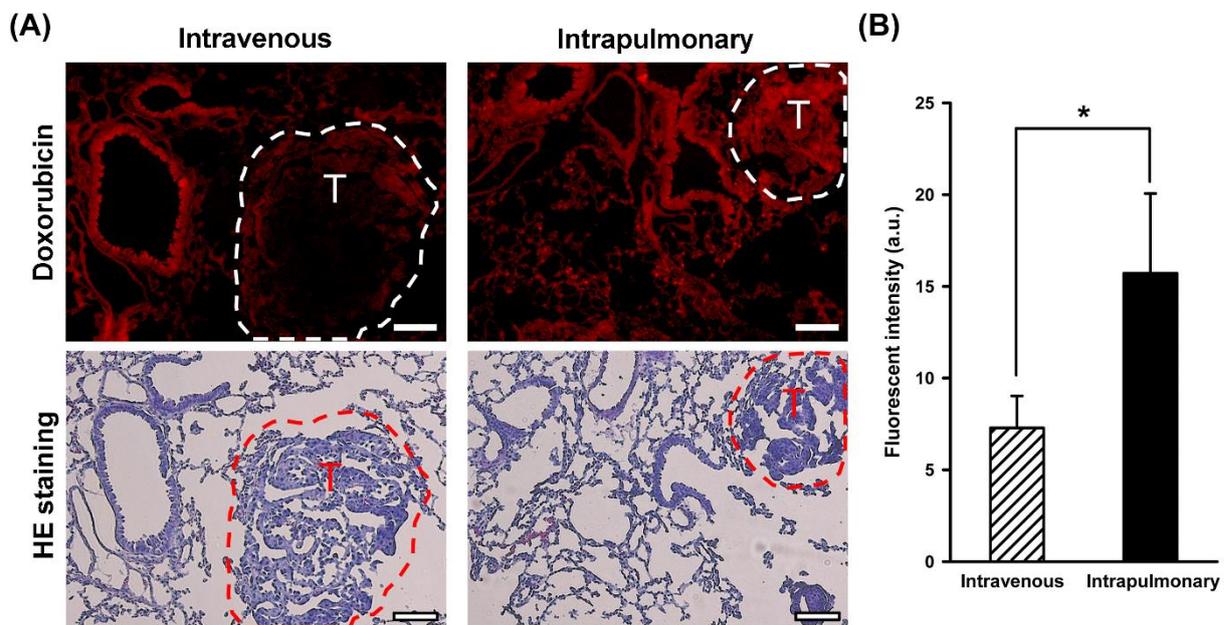


Figure 3 Doxorubicin distribution in the lung following intrapulmonary and intravenous administration to mice with metastatic lung tumor

Doxorubicin (400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body wt) was administered intrapulmonarily 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 S.D. (n = 3). * $p < 0.05$.

転移性肺がんモデルマウスにおける、ドキソルビシン肺投与による腫瘍増殖抑制効果を評価するため、ドキソルビシンを繰り返し肺投与し、肺組織凍結切片を用いて病理学的評価を行った (Figure 4)。その結果、静脈内投与時と比較して、肺投与した場合には、腫瘍部位の縮小が観察された。

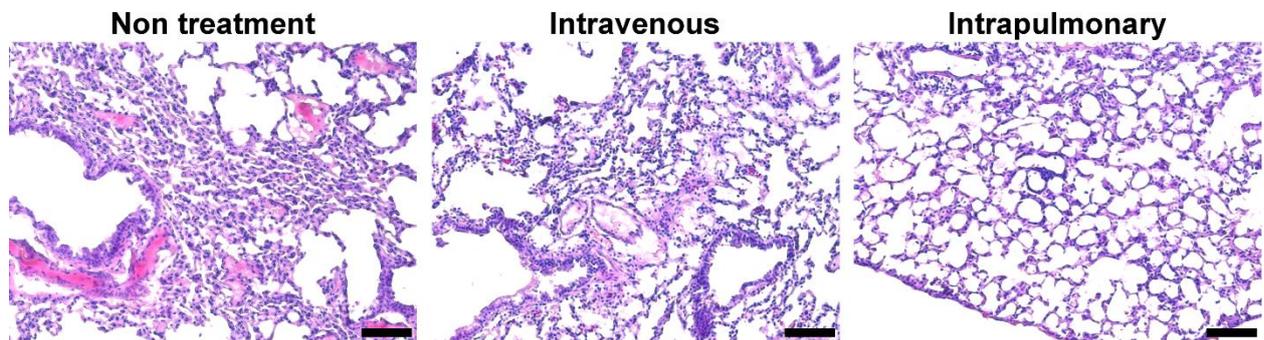


Figure 4 Anti-tumor effect of doxorubicin following intrapulmonary and intravenous administration to mice with metastatic lung tumor

Doxorubicin (400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body wt) was administered intrapulmonarily and intravenously after 2, 6, 10, and 14 days of B16F10 injection to mice. After 16 days B16F10 injection, HE staining of the lung sections was performed. Scale bar is 100 μm .

第 4 節 考察

本章では、抗腫瘍薬のドキソルビシンをモデル薬物とし、肺癌治療における抗腫瘍薬の肺への直接送達の意義を検討した。

ドキソルビシンを肺投与した場合、通常の投与経路である静脈内投与と比較して、肺への高い薬物送達効率を示し、逆に血中への薬物移行は僅かであった (Figure 2 and 3)。したがって、ドキソルビシンの肺投与は、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。また、ドキソルビシンを繰り返し肺投与した際に腫瘍部位の縮小 (Figure 4) が観察されたのは、肺投与による腫瘍部位への高い薬物送達効率に起因するものと推察される。これらの知見から、ドキソルビシンを肺に直接送達することは、腫瘍部位における薬効増強のみならず、血液を介した他臓器への分布に起因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。

パクリタキセルや 5-アザシチジンなどの他の抗腫瘍薬においても、転移性肺癌モデルマウスに肺投与することで高い肺中濃度と低い血中濃度が得られることが報告されている^{19, 20)}。また、抗腫瘍薬ではないが、造影剤であるガドリニウムを検査目的で肺投与することで、肺腫瘍部位の核磁気共鳴イメージングに有用であることが知られている²¹⁾。それゆえ、ドキソルビシンのみならず多くの抗腫瘍薬や肺癌検査薬においても、その肺投与は肺腫瘍部位への薬物送達性に優れた投与方法であると考えられ、従前の全身的投与に替わる新規投与方法として期待がもてる。

第 2 章 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

第 1 節 序論

前章において、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²²⁾、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²³⁾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 13,000 程度の水溶性高分子であり、単純拡散による細胞内移行可能なサイズより遥かに大きいため細胞膜透過性が低い²⁴⁾。また、分解酵素に対する生体内安定性にも乏しいことから、単独投与では標的細胞への高い送達効率が得られず、十分な遺伝子発現抑制効果が期待できない²⁵⁾。そのため、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。

現在、siRNA の送達が可能な DDS が検討されている。その一つとして、ウイルスベクターを用いる方法があるが、ウイルス粒子の抗原性やベクター純度に依存する免疫応答、宿主に対する毒性などウイルスの特徴に起因する欠点が多く、生体投与における安全性は確立されていない²⁶⁾。また、循環血液量の 10-20% に及ぶ高容量の siRNA 溶液を短時間で注入するハイドロダイナミックス法も開発されているが、大量の容量負担をかけるためヒトへの応用は難しいと考えられている²⁷⁾。

本章では、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・調製した。

第 2 節 実験方法

1. 試薬

プロタミン硫酸塩及びヒアルロン酸ナトリウム塩は、Sigma Aldrich Co. (St Louis, MO, USA) から購入した。1,2-dioleoyl-3-trimethyl ammoniumpropane chloride (DOTAP)、1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[amino (polyethylene glycol) (MW: 2000)] (DSPE-PEG₂₀₀₀) 及び1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[amino (polyethylene glycol) (MW: 2000)] hydroxysuccin amide (DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS) は、日油 (東京) から購入した。コレステロールは和光純薬工業から購入した。*N*-(2-aminoethyl)-4-methoxybenzamide 塩酸塩は、Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA) から購入した。HiLyte Fluor 555 修飾ネガティブコントロール siRNA (HiLyte Fluor 555-siRNA) はニッポンジーン (東京) より購入した。抗ルシフェラーゼ siRNA (Sense: 5'-GGU CUG AGC UCC UUG AUA ATT-3', Anti-Sense: 5'-UUA UCA AGG AGC UCA GAC CTT-3') は Thermo Fisher Scientific Inc. から購入した。その他の試薬は、特級品を使用した。

2. DSPE-PEG₂₀₀₀-anisamide の合成

DSPE-PEG₂₀₀₀-anisamide は以下に示す方法で合成した (Figure 5)²⁸)。すなわち、20 mM HEPES (pH 8.0) 緩衝液に溶解した DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS (10 mM) 及び *N*-(2-aminoethyl)-4-methoxybenzamide (10 mM) を 3:1 (mol 比) で混合し、4°C で一晩攪拌した。シリカゲル分取用薄層板 (60 F254, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を用いて、クロロホルム:メタノール=13:5 (v/v) で展開した。生成した DSPE-PEG₂₀₀₀-anisamide のスポットを回収し、クロロホルムを用いて、4°C で一晩攪拌し抽出した。抽出後、減圧乾固し、DSPE-PEG₂₀₀₀-anisamide を得た。

であるアニスアミドを表面に修飾したナノ粒子製剤を調製した。被覆構造体（300 μL ）に DSPE-PEG₂₀₀₀-anisamide（10 mg/mL）を 46.8 μL 加え、50°C で 10 分間静置し、ナノ粒子製剤を自己形成させた。また、比較のため、被覆構造体を DSPE-PEG₂₀₀₀ で表面修飾したコントロール製剤を調製した。

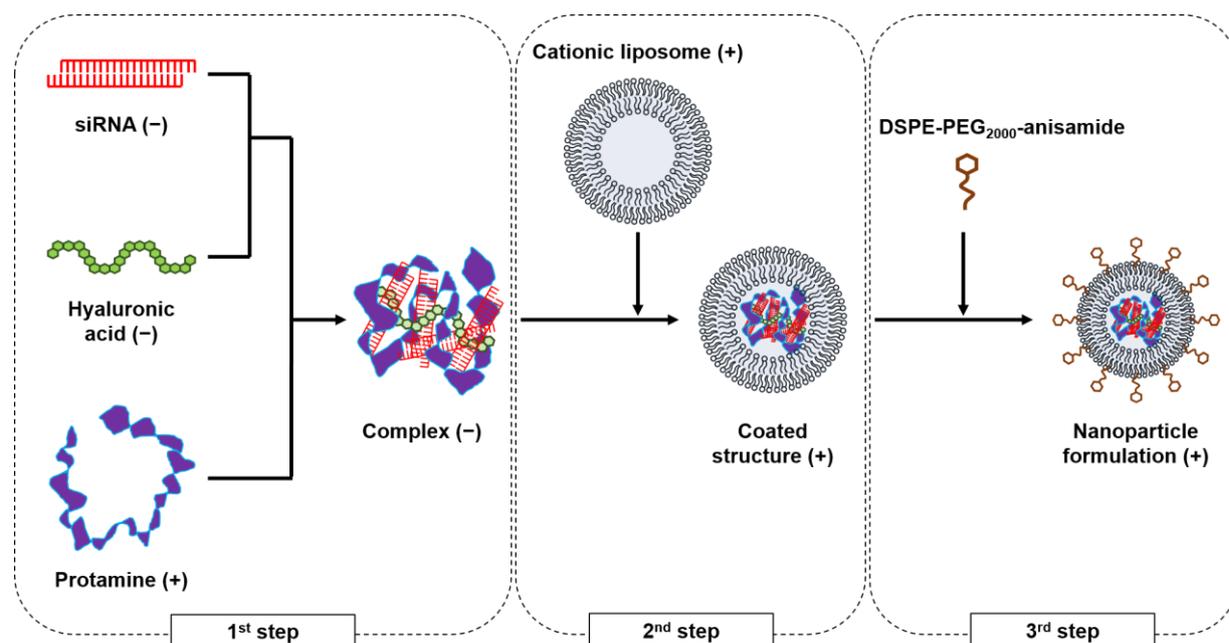


Figure 6 Preparation of nanoparticle formulation

4. 粒子径及びゼータ電位の測定

前項で調製した複合体、被覆構造体及びナノ粒子製剤の粒子径及びゼータ電位は、粒子径・ゼータ電位測定装置（Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK）を用いて、それぞれ動的光散乱法及びレーザードップラーによる電気泳動法にて測定した。

5. siRNA 封入率の算出

第3項で調製したナノ粒子製剤中の siRNA 封入率は、ゲルろ過法により求めた³²⁾。siRNA を封入したナノ粒子製剤をセファローズ CL4B size exclusion column (GE healthcare Ltd., Buckinghamshire, UK) でゲルろ過することで、未封入の siRNA を除去し、製剤中の siRNA 封入率を算出した。

6. 透過型電子顕微鏡 (TEM) 像の撮影

第3項で調製したナノ粒子製剤 5 μ L を 300 メッシュ炭素被膜銅グリッド (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA) に滴下し、室温で 5 分間静置した。その後、グリッドを 1% 酢酸ウラニル 40 μ L で染色し、十分に乾燥させた。TEM 画像は、Phillips CM12 (FEI, Hillsboro, OR, USA) を用いて、100 kV 電圧下で撮影した³³⁾。画像分析には Gatan DigitalMicrograph software (Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA) を使用した。

7. ホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入した B16F10 の培養

Luciola Italica 由来のホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入した B16F10 (B16F10 Red-Fluc) は Perkin Elmer Inc. (Waltham, MA, USA) から購入した。培養液は、非働化した 10% ウシ胎児血清及び 40 μ g/mL ゲンタマイシン (ゲンタシン) を含む Roswell park memorial institute medium (RPMI 1640, 和光純薬工業) を使用した。培養は、25 cm^2 ポリスチレン製培養フラスコを用いて、37°C、5% CO_2 -95% Air 条件下で行った。培養液は 3 日毎に交換し、コンフルエントに達した細胞を 0.25% トリプシン-EDTA を用いて回収し、継代を行った。実験には、継代数 10 - 20 の細胞を用いた。

8. In vitro 細胞内 siRNA 送達実験

継代後 3 - 4 日目の B16F10 Red-Fluc を実験に用いた。B16F10 Red-Fluc を 1×10^5 cells/ 0.75 cm^2 の密度で、ポリスチレン製 48 穴プレート (BD Falcon, Bedford,

MA, USA) に播種した。37°C、5%CO₂-95%Air 条件下で 20 時間培養し、細胞をプレートに付着させた。培養液で細胞を洗浄し、HiLyte Fluor 555-siRNA を封入した被覆構造体またはナノ粒子製剤を含む培養液 (siRNA, 200 nM) に置換して、37°C で 4 時間培養した。培養後、細胞を氷冷した PBS (pH 7.4) で 2 回洗浄し、0.1 M NaOH を 500 μL 加え、37°C で 30 分間静置することで細胞を溶解させた。

細胞溶解液中の HiLyte Fluor 555-siRNA 濃度は、プレートリーダー (Powerscan HT, Pharma Biomedical Co., Ltd., 大阪) を用いて励起波長 530 nm、蛍光波長 590 nm における蛍光強度を測定することで求めた。得られた結果から B16F10 Red-Fluc による HiLyte Fluor 555-siRNA の細胞内取り込み量を求めた。

9. *In vitro* ルシフェラーゼ遺伝子発現抑制実験

B16F10 Red-Fluc 細胞を 1×10^5 cells/0.75 cm² の密度で、ポリスチレン製 48 穴プレートに播種した。37°C、5%CO₂-95%Air 条件下で 20 時間培養し、細胞をプレートに付着させた。培養液で細胞を洗浄し、抗ルシフェラーゼ siRNA を封入したナノ粒子製剤 (siRNA, 200 nM) を適用し、37°C で 24 時間培養した。培養後、細胞を氷冷した PBS (pH 7.4) で 2 回洗浄し、1% Triton X-100、2 mM EDTA、0.1 M Tris-HCl を 50 μL 加え、37°C で 30 分間静置することで細胞を溶解させた。細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性の測定は、市販のキットを用いて行った。すなわち、細胞溶解液 10 μL に Luciferase Assay Reagent (Luciferase Assay System, Promega Co., Madison, WI, USA) 100 μL を加え混和し、発光強度をプレートリーダーで測定した。

蛋白濃度は Pierce BCA Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて測定した。すなわち、BCA Protein Assay Reagent A 液に B 液を 50:1 (v/v) で混合し、BCA Working Reagent を調製した。精製水で 2 倍希釈した細胞溶解液 20 μL に BCA Working Reagent 400 μL を加えて混和し、37°C で 30 分間反応させたのち、プレートリーダーを用いて 562 nm における吸光度を測定した³⁴⁾。得られた吸光度と、ウシ血清アルブミン標準液 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて作成した検量線より蛋白濃度を求めた。細胞溶解液中の発光強

度及び蛋白濃度から細胞単位蛋白量あたりのルシフェラーゼ活性を求めた。

10. 統計学的解析

得られた値は平均値±標準偏差で示した。統計解析は、SPSS Version 21 を用いて Student's t-test または Tukey HSD test にて行い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

第3節 結果

本章では、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・調製した。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。siRNA とヒアルロン酸混合物とプロタミンを種々の質量比で混合した際に自己形成された複合体の粒子径とゼータ電位を Figure 7 に示す。プロタミンに対する siRNA とヒアルロン酸混合物の質量比が 0.8 – 1.3 (w/w) の範囲では、ゼータ電位は中性付近の値となり、複合体の凝集と考えられる 1500 nm 以上の粒子径を示した。一方、質量比が 1.4 (w/w) 以上では、粒子径が約 400 nm で安定し、かつ負電荷を有する複合体が得られた。したがって、質量比 1.6 の複合体を選択し、調製の第2段階に使用することとした。

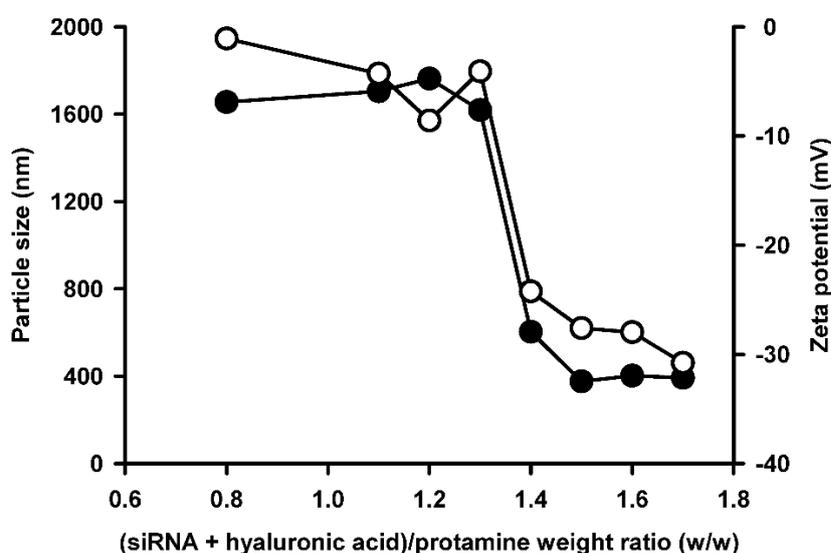


Figure 7 Effect of (siRNA + hyaluronic acid)/protamine weight ratio on particle size (●) and zeta potential (○) of siRNA/hyaluronic acid/protamine complex

Protamine (200 $\mu\text{g/mL}$, 75 μL) and a mixture of siRNA and hyaluronic acid (160 – 340 $\mu\text{g/mL}$, weight ratio = 1:1, 75 μL) were mixed in a 1.5 mL tube and kept at room temperature for 10 min. Then particle size and zeta potential were measured.

調製の第 2 段階として、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、負電荷を有する複合体とカチオン性リポソームを混合し、静電的相互作用によりリポソーム脂質で複合体を被覆した被覆構造体を自己形成させた。負電荷を有する複合体とカチオン性リポソームを種々のモル比で混合した際に自己形成された被覆構造体の粒子径とゼータ電位を Figure 8 に示す。siRNA に対するリポソーム中の DOTAP のモル比が 168 では、ゼータ電位の絶対値が小さく、被覆構造体の凝集が認められた。モル比が 1256 以上では、粒子径が約 150 nm であり、かつ正電荷を有する目的の被覆構造体が得られた。

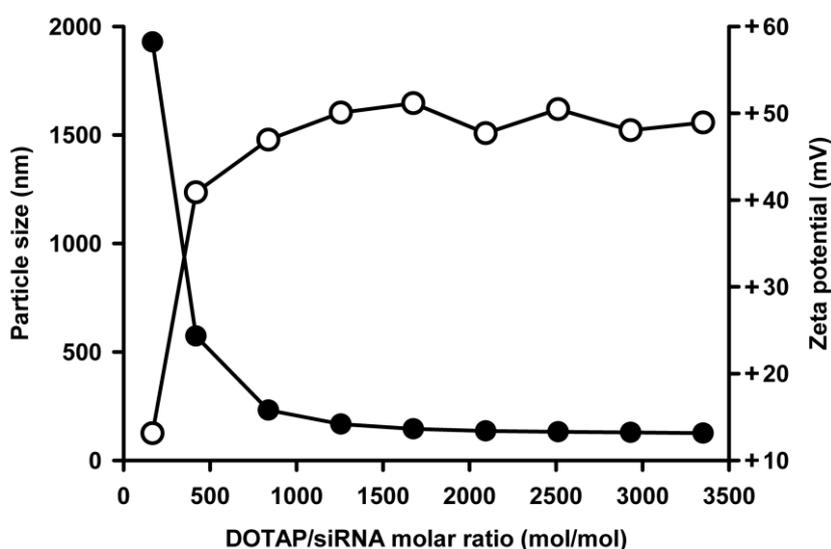


Figure 8 Effect of DOTAP/siRNA molar ratio on particle size (●) and zeta potential (○) of the coated structure

Complex of siRNA/HA and protamine (siRNA + hyaluronic acid)/protamine weight ratio = 1.6, 150 μ L) and DOTAP/cholesterol liposomes (DOTAP concentration = 10 mM, 0 – 200 μ L) were mixed and kept at room temperature for 10 min. Then, particle size and zeta potential of the coated structure were measured.

ここで、目的の物理化学的性質を有する被覆構造体が複数得られたので、さらに被覆構造体の標的腫瘍細胞への siRNA 送達能を *in vitro* で評価し、最適な被覆構造体を選択することとした。被覆構造体を B16F10 に適用し、4 時間後の HiLyte Fluor 555-siRNA の細胞内取り込み量を Figure 9 に示す。siRNA に対する DOTAP のモル比の増加に伴い siRNA 送達効率は増大し、モル比 1675 で最大となり、モル比 2094 以上では送達能が低下した。したがって、モル比 1675 の被覆構造体を最適なものと判断し、調製の最終段階に使用することとした。

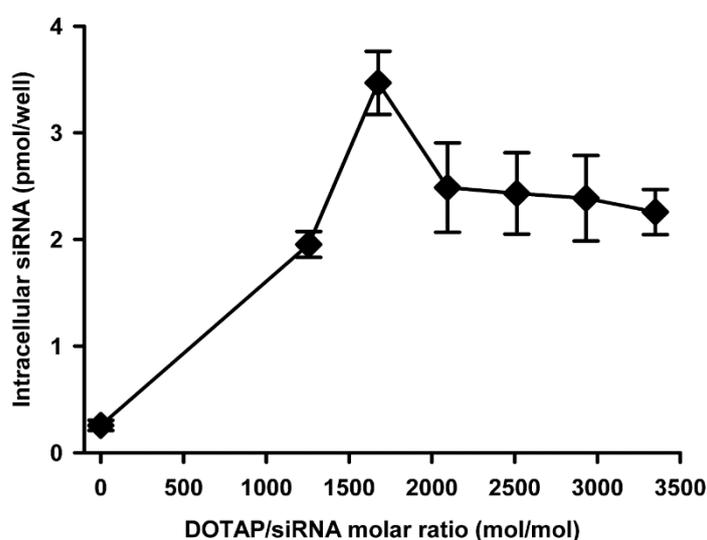


Figure 9 Effect of DOTAP /siRNA molar ratio of the nanoparticle formulation on the *in vitro* intracellular siRNA delivery in B16F10 cells

The coated structure containing HiLyte Fluor 555-siRNA (200 nM) were applied to B16F10 cells (1×10^5 cells/ 0.75 cm^2 /well) and incubated at 37°C for 4 h. Then fluorescent intensity in cells was measured. Each point represents the mean \pm S.D. (n = 6).

調製の最終段階として、標的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 anisamide³³⁾で被覆構造体の表面を修飾するため、被覆構造体と DSPE-PEG₂₀₀₀-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ナノ粒子製剤を自己形成させた。得られたナノ粒子製剤の平均粒子径は 157 nm、ゼータ電位は+26 mV、siRNA の封入率は 95%であった。TEM 画像を Figure 10 に示す。

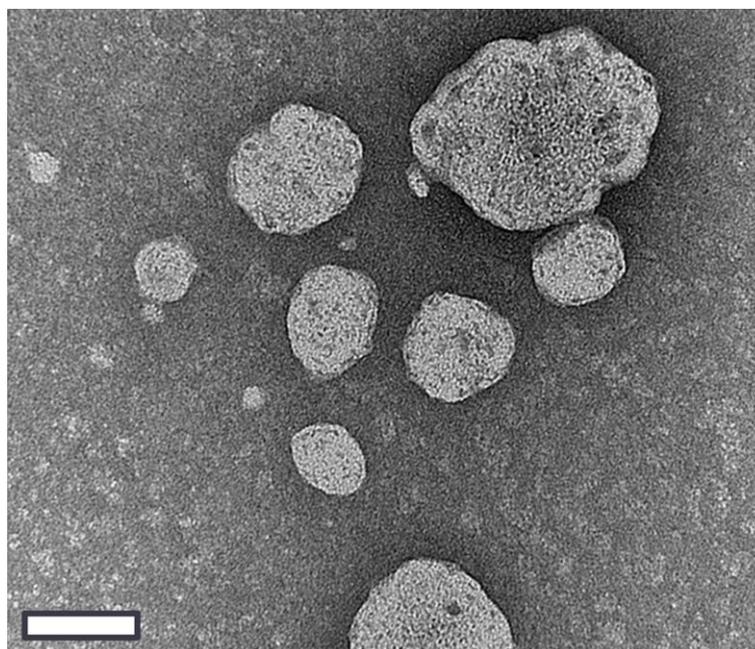


Figure 10 Transmission electron microscope (TEM) images of nanoparticle formulations.

Nanoparticle formulations (5 μ L) were dropped onto a 300-mesh carbon-coated copper grid and allowed for a short incubation (5 min) at room temperature. Grids were then stained with 1% uranyl acetate (40 μ L) and wicked dry. TEM images were acquired using a Phillips CM12 (FEI Hillsboro) at an accelerating voltage of 100 kV. Scale bar is 100 nm.

調製したナノ粒子製剤の B16F10 への siRNA 送達能を *in vitro* にて評価した。HiLyte Fluor 555-siRNA 封入ナノ粒子製剤を B16F10 に適用 4 時間後の細胞内蛍光強度を Figure 11 に示す。siRNA 単独適用では送達は認められず、ナノ粒子製剤の送達効率はコントロール製剤に比べ 2.6 倍高い値を示した。

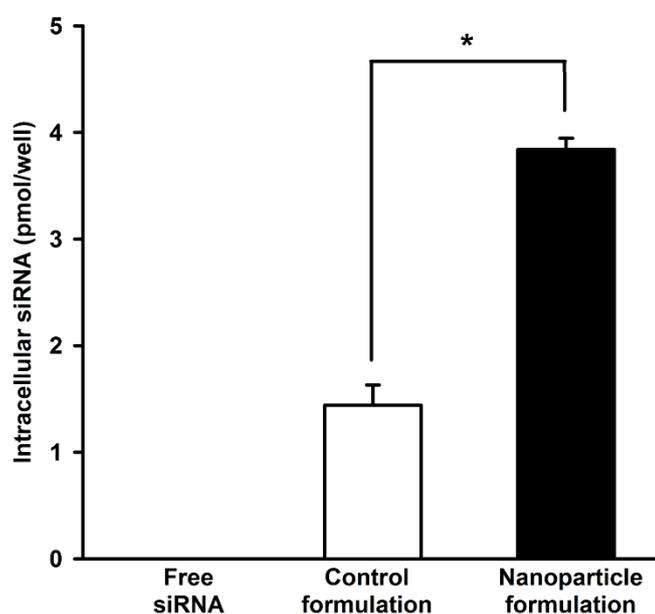


Figure 11 *In vitro* intracellular siRNA delivery of nanoparticle formulations in B16F10 cells

Nanoparticle formulations containing HiLyte Fluor 555-siRNA (200 nM) were applied to B16F10 cells (1×10^5 cells/0.75 cm²/well) and then incubated at 37°C for 4 h. After incubation, the intracellular fluorescent-labeled siRNA was determined. Each value represents the mean \pm S.D. (n = 4). * $p < 0.01$.

ナノ粒子製剤の標的腫瘍細胞における遺伝子発現抑制効果を *in vitro* にて評価した。抗ルシフェラーゼ siRNA またはネガティブコントロールである HiLyte Fluor 555-siRNA を封入したナノ粒子製剤を B16F10 Red-Fluc に適用し、24 時間経過した後の細胞内ルシフェラーゼ活性を Figure 12 に示す。抗ルシフェラーゼ siRNA 封入ナノ粒子製剤はルシフェラーゼ遺伝子の発現を約 50%抑制した。

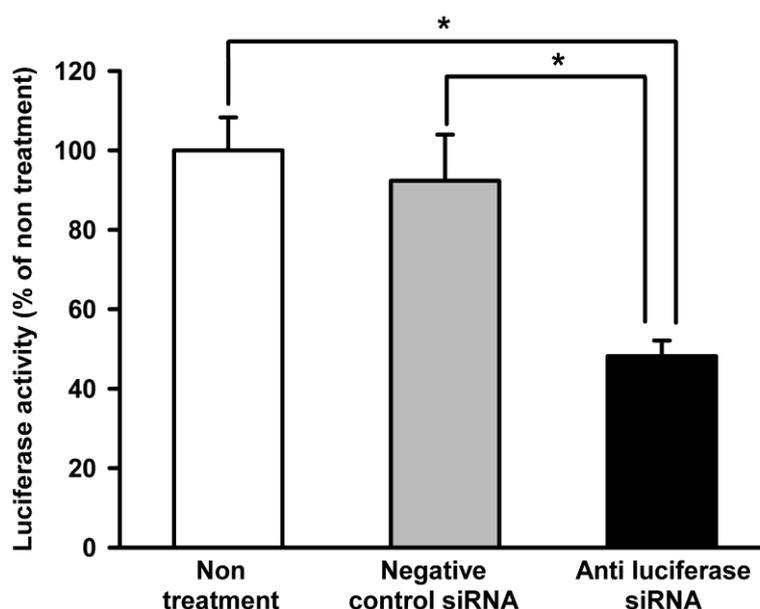


Figure 12 *In vitro* luciferase gene silencing effects of nanoparticle formulations in B16F10 Red-Fluc cells

Nanoparticle formulations containing anti-luciferase siRNA (200 nM) were applied to B16F10 Red-Fluc cells transduced with firefly luciferase gene (1×10^5 cells/ 0.75 cm^2 /well) and then incubated at 37°C for 24 h. After incubation, luciferase activity in cells was measured. Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 4$). $*p < 0.01$.

第 4 節 考察

siRNA は生体内安定性が低く、細胞膜透過性にも乏しいことから、単独投与では標的細胞への高い送達効率が得られず、十分な遺伝子発現抑制効果が期待できない^{24, 25)}。そのため、siRNA を効率良く標的細胞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。本章では、siRNA 送達に対するこれらの障壁を克服するため、siRNA を封入したナノ粒子製剤を設計・調製した。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 (Figure 6)。

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、静電的相互作用を利用して複合体を形成させた (Figure 7)。キャリア高分子として使用したヒアルロン酸は細胞外マトリックスに含まれる成分である³⁵⁾。また、同様に用いたプロタミンは、精子中で DNA を凝集させている成分である³⁶⁾。したがって、両者ともに生体由来物質であることから、生体内での安全性にも優れていると考えられる。

調製プロセスの第 2 段階では、製剤コアである複合体を被覆保護するため、負電荷を有する複合体とカチオン性リポソームを混合し、静電的相互作用によりリポソーム脂質で複合体を被覆するとともに、正電荷を付与した被覆構造体を自己形成させた (Figure 8)。多くの腫瘍細胞の表面は強く負に荷電しているため^{37, 38)}、製剤に正電荷を付与することで、腫瘍細胞へ効率的に送達できると考えられる。被覆構造体の腫瘍細胞への送達能を評価したところ (Figure 9)、送達効率はモル比 1675 で最大となった。これ以上のモル比では、複合体の被覆の際に余剰となったリポソームが被覆構造体の siRNA 送達を競合的に阻害したと考えられる。

調製プロセスの第 3 段階では、B16F10 に過剰発現するシグマレセプター³⁹⁾の特異的リガンドである anisamide³³⁾を用いて、B16F10 への標的指向性に優れ、高い遺伝子発現抑制効果を発揮するナノ粒子製剤を調製した (Figure 11 及び

12)。シグマレセプターはヒト非小細胞肺癌及びヒト小細胞肺癌の腫瘍細胞においても、正常細胞より強く発現している^{39,40)}。そのため、本研究で調製したナノ粒子製剤は、転移性肺癌のみならず、様々な種類の肺癌細胞への siRNA 送達にも有用であると考えられる。

siRNA を送達するための DDS はいくつか報告されているが、その調製には時間や多くの工程を要するとともに⁴¹⁻⁴³⁾、超音波ホモジナイザーやスターラーなどの機器を必要とする^{42, 44)}。また、その siRNA の封入率は 70%程度と比較的低い^{44, 45)}。本研究で設計したナノ粒子製剤の調製は、製剤原料及び siRNA の物理化学的な性質を利用した自己形成プロセスによって進行し、30 分程度で終了する。そのため、どのような siRNA も封入可能なうえ、特別な手技や機器を必要とせず、簡便に調製することができる。また、siRNA の封入率が 95%と既報に比べて極めて効率的である。すなわち、臨床応用を考えたとき、本研究で調製したナノ粒子製剤は、簡便に用時調製可能であるうえに siRNA の利用率が高く、患者のがんの進行状況に合わせて、自由に siRNA を選択できる利点があり、がんの個別化医療においても極めて有用性が高いと考えられる。

第 3 章 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

第 1 節 序論

前章において、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。このナノ粒子製剤は、siRNA の物理化学的性質に基づいて調製されるため、封入する siRNA を自由に選択することが可能である。肺がんの発症及び進行には、血管新生を促進することによりがんの増殖・転移に寄与する vascular endothelial growth factor (VEGF)、細胞質内で Max タンパク質と結合し核内に移行し、DNA の複製を促進することでがんの増殖やアポトーシスの回避などに寄与する c-Myc 及びがん抑制遺伝子である p53 に結合することで、その機能を抑制するとともに、p53 の分解を誘導し、腫瘍の増殖に寄与する MDM2 などの様々な遺伝子が関与する⁴⁶⁻⁴⁸⁾。

そこで本章では、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 を封入したナノ粒子製剤を肺投与型 DDS として用い、その肺がん治療における有用性を評価した。

第 2 節 . 実験方法

1. 試薬

Alexa Fluor 750 修飾 siRNA (Alexa Fluor 750-siRNA, Sense: 5'-AAU UCU CCG AAC GUG UCA CGU TT-3', Anti-Sense: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA AUU TT-3')⁴⁹⁾は、日本バイオサービス(埼玉)から購入した。抗 VEGF siRNA (Sense: 5'-CGA UGA AGC CCU GGA GUG CTT-3', Anti-Sense: 5'-GCU ACU UCG GGA CCU CAC GTT-3')、抗 c-Myc siRNA (Sense: 5'-GAA CAU CAU CAU CCA GGA CTT-3', Anti-Sense: 5'-CUU GUA GUA GUA GGU CCU GTT-3') 及び抗 MDM2 siRNA (Sense: 5'-GCU UCG GAA CAA GAG ACU CTT-3', Anti-Sense: 5'-CGA AGC CUU GUU CUC UGA GTT-3')³³⁾は北海道システムサイエンス(札幌)から購入した。

2. *In vitro* 腫瘍関連タンパク質発現抑制実験

第 2 章第 2 節第 3 項と同様の方法で、抗 VEGF siRNA、抗 c-Myc siRNA 及び抗 MDM2 siRNA の 3 種類の siRNA を 1:1:1 のモル比で混合封入したナノ粒子製剤(抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤)を調製した。

B16F10 を 1×10^5 cells/cm² の密度で、8 穴チャンバースライドガラス(松波硝子、大阪)に播種し、20 時間培養した。抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤(合計 siRNA 濃度 200 nM)を適用し、24 時間培養した。培養後、細胞を培養液で 3 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドを加え、10 分間室温で静置することで、細胞の固定処理を行った。処理後、PBS で 2 回洗浄し、Blocking One Histo(ナカライテスク、京都)を加え、15 分間室温で静置することで、ブロッキング処理を行った。一次抗体として抗 VEGF 抗体(1:100, マウスモノクローナル IgG 抗体, Santa Cruz Biotechnology Inc.)、抗 c-Myc 抗体(1:50, マウスモノクローナル IgG 抗体, Santa Cruz Biotechnology Inc.) または抗 MDM2 抗体(1:100, マウスモノクローナル IgG 抗体, Santa Cruz Biotechnology Inc.) を適用し、室温で 1 時間静置した。処理後、PBS で 5 分間、3 回洗浄し、二次抗体として、Alexa Flour

488 修飾抗体（マウスモノクローナル IgG 抗体, Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA）を適用し、1 時間静置した。処理後、PBS で 5 分間、3 回洗浄した。封入剤である Fluoromount を適用し、カバーガラスを被せて密封した。その後、焦点レーザー顕微鏡（LSM 700, Zeiss）を用いて蛍光観察した。

3. *Ex vivo* imaging による siRNA 肺内送達能の評価

第 1 章第 2 節第 3 項と同様の方法で、Alexa Fluor 750-siRNA 封入ナノ粒子製剤を、B16F10 投与 19 日目の転移性肺がんモデルマウスに肺投与または尾静脈内投与（siRNA として 0.1 mg/kg）した。投与 4 時間後に開腹し、腹部大動脈を切断することにより脱血死させ、直ちに肺を摘出した。*in vivo* imaging システム（MIIS, Molecular Devices llc., Sunnyvale, CA, USA）を用いて、肺内の Alexa Fluor 750-siRNA を可視化した。

4. 抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤投与後の生存率の評価

第 1 章第 2 節第 3 項と同様の方法で、抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤を、B16F10 投与 6, 9, 12, 15 及び 18 日後の転移性肺がんモデルマウスに肺投与または尾静脈内投与（siRNA として 0.1 mg/kg）した。マウスの生死を毎日観察し、生存率を算出した。

5. 抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤投与後の血漿中乳酸脱水素酵素活性の測定

第 1 章第 2 節第 3 項と同様の方法で、抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤を、マウスに肺投与または尾静脈内投与（siRNA として 0.1 mg/kg）した。投与 24 時間後に採血した血液を、直ちにヘパリン処理したのち、遠心分離（4°C、10,000×g、5 分間）して血漿を得た。血漿中の乳酸脱水素酵素（LDH）活性は、ニワトリ心臓由来乳酸脱水素酵素を標準として LDH-細胞毒性テストワコー（和光純薬工業）を用いて測定した⁵⁰⁾。

6. 統計学的解析

得られた値は平均値±標準偏差で示した。統計解析は、SPSS Version 21 を用いて Tukey HSD test または log-rank test にて行い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

第 3 節 . 結果

抗腫瘍効果の評価に先立ち、抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤を B16F10 に適用し、3 種類 (VEGF、c-Myc 及び MDM2) 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。抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤を B16F10 に適用し、24 時間経過した後の各タンパク質の免疫蛍光染色像を Figure 13 に示す。遺伝子発現抑制作用を示さないネガティブコントロールである HiLyte Fluor 555-siRNA を封入したナノ粒子製剤と比較して、抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤はそれぞれのタンパク質の発現を著しく低下させ、遺伝子発現抑制効果を示した。

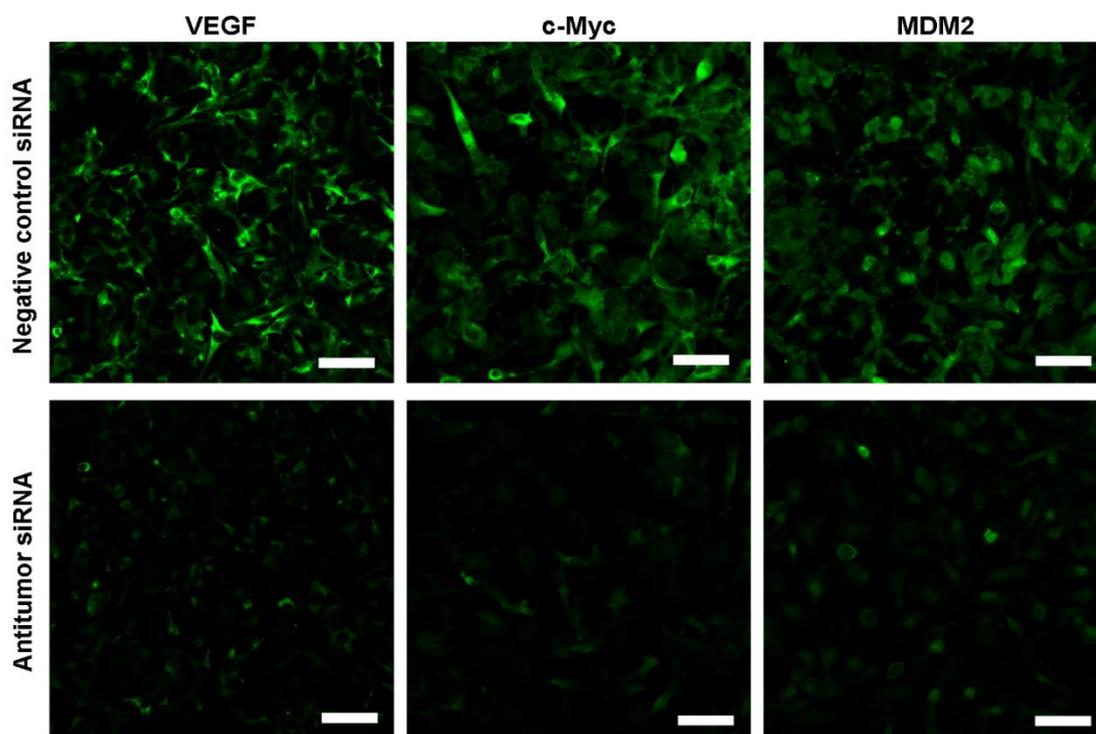


Figure 13 *In vitro* oncogene silencing effect of nanoparticle formulations containing antitumor siRNA in B16F10 cells

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ナノ粒子製剤を肺投与したときの siRNA の肺内送達能を評価するため、*ex vivo* imaging を行った。Alexa Fluor 750-siRNA 封入ナノ粒子製剤を転移性肺がんモデルマウスに肺投与し、4 時間経過した後の肺の *ex vivo* imaging 像を Figure 14 に示す。肺投与した場合の肺内の siRNA 由来の蛍光は、静脈内投与時に比べて、強く検出され、輝度解析により得た蛍光強度の値も有意に高値であった。

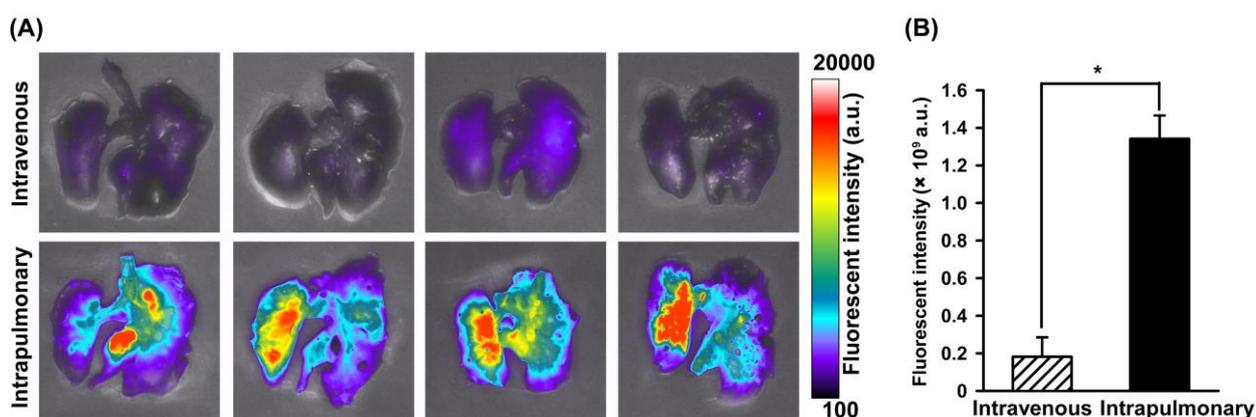


Figure 14 *Ex vivo* imaging of Alexa Fluor 750-siRNA in lungs after intrapulmonary administration to mice with metastatic lung tumor

Nanoparticle formulation containing alexa fluor 750-siRNA (0.1 mg/kg) was administered intrapulmonarily or intravenously to mice with metastatic B16F10 lung tumor. (A) Fluorescence imaging in the lung using MIIS (Molecular Devices). (B) The fluorescence intensity in region of interest calculated in the lung using MIIS measurement and display software (Meta Vue ver. 7.10.1 (Molecular Devices)). Each value represents the mean \pm S.D. (n = 4). * $p < 0.01$.

転移性肺がんモデルマウスにナノ粒子製剤を肺投与したときの抗腫瘍効果を評価した。抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤を繰り返し投与した後の生存率を Figure 15 に示す。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。

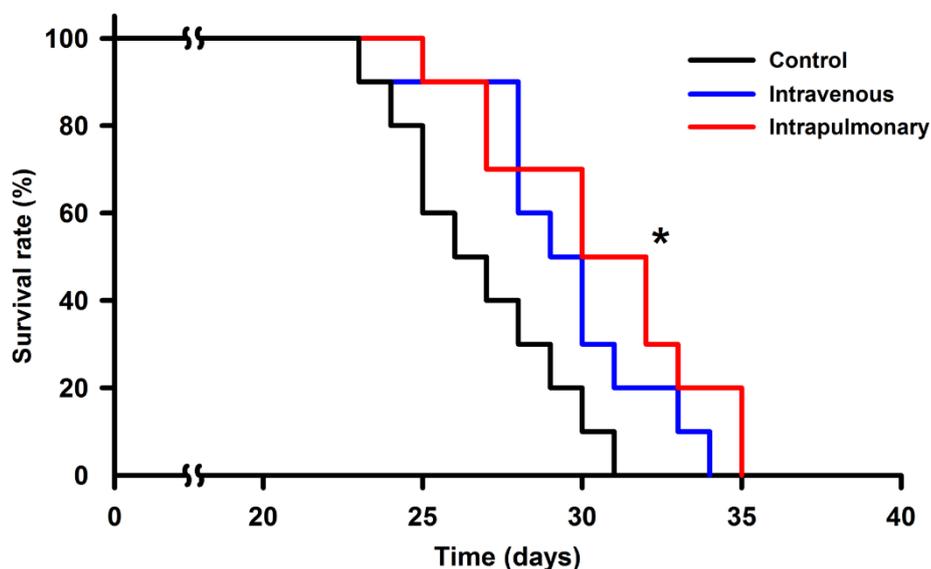


Figure 15 Survival rate of mice with metastatic lung tumor after intrapulmonary administration of nanoparticle formulations containing antitumor siRNA

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.

また、参考データではあるが、Figure 15 の 19 日目に相当する時点の肺の外観を Figure 16 に示す。ナノ粒子製剤の肺投与群では、コントロール群及び静脈内投与群と比べて、外観上の腫瘍形成範囲は小さかった。



Figure 16 Anti-tumor effect of nanoparticle formulation following intrapulmonary and intravenous administration to mice with metastatic lung tumor

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. After 19 days B16F10 injection, gross findings of the lungs were shown.

転移性肺がんモデルマウスに抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤を肺投与することで、高い抗腫瘍効果が得られたが、生体適合性にも優れていることが望ましい。そこで、抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤を肺投与したときの生体適合性の指標として、全身的な細胞障害が生じた際に血漿中に漏出される LDH の活性を測定した。抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤を肺投与し、24 時間経過した後の血漿中 LDH 活性を Figure 17 に示す。抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤を肺投与した群の LDH 活性は、ネガティブコントロールである PBS 投与群と同程度であり、ポジティブコントロールである静脈内投与されたドキソルビシン⁵¹⁾との間には有意差が認められた。

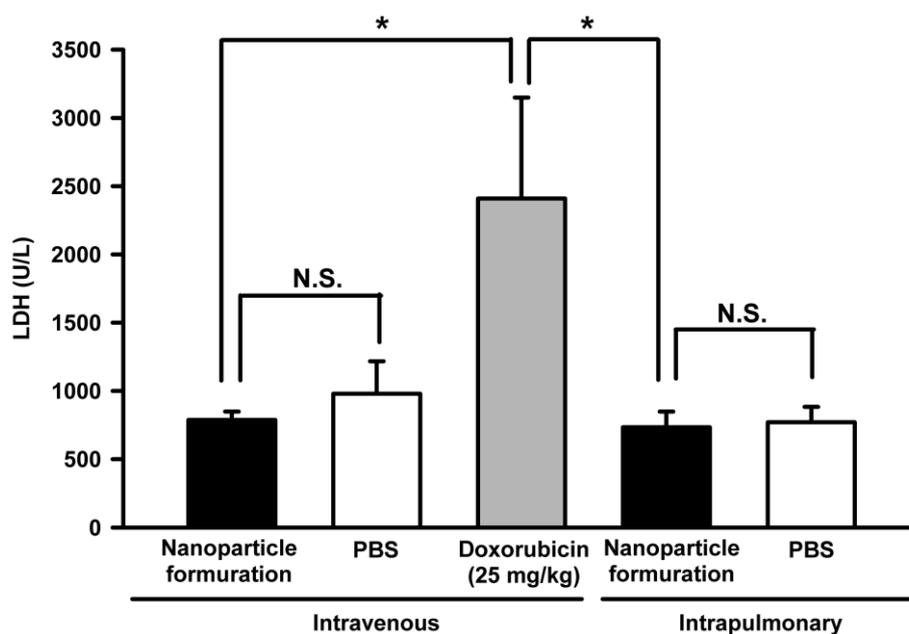


Figure 17 The lactate dehydrogenase (LDH) activities in plasma after intrapulmonary administration of nanoparticle formulations containing antitumor siRNA to mice

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. PBS was administered intrapulmonarily or intravenously as each negative control. Doxorubicin (25 mg/kg) was administered intravenously as a positive control. After 24 h administration, plasma was collected and LDH activities were determined. Each value represents the mean \pm S.D. (n = 4). N.S; not significant, * $p < 0.01$.

第4節 考察

本章では、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 を封入したナノ粒子製剤（抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤）を肺投与型 DDS として用い、その肺がん治療における有用性を評価した。

ナノ粒子製剤を肺投与した際の siRNA 肺内送達能を検討したところ、静脈内投与時に比べ、肺投与では肺内への高い送達効率を得られた（Figure 14）。一般に、リポソームのような粒子径 100 nm 以上のナノ粒子を肺投与すると、肺胞表面に存在する肺胞マクロファージに貪食される⁵²⁾。しかしながら、ナノ粒子表面にポリエチレングリコール（PEG）を導入することで、肺胞マクロファージによる貪食を回避し、肺内滞留性を向上させることが可能となる⁵³⁾。本研究で設計・調製したナノ粒子製剤も、その表面に PEG を導入しているために高い肺内滞留性を有すると考えられ、腫瘍細胞近傍に到達するとシグマレセプターへの結合を介して能動的に細胞内に取り込まれると推察される。

抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤を繰り返し肺投与することで、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（Figure 15）。この結果は、肺投与による腫瘍細胞への効率的な siRNA 送達（Figure 14）と腫瘍関連タンパク質の発現抑制（Figure 13）に基づくものと考えられる。標的とした VEGF、c-Myc 及び MDM2 は、いずれもヒト非小細胞肺がん及びヒト小細胞肺がんなどの原発性肺がんにおいても、その発症及び進行に関与している⁵⁴⁻⁵⁶⁾。また、第2章の考察でも述べたように、抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤は、シグマレセプターが発現しているこれらの原発性肺がん細胞においても siRNA を標的指向化することが期待できる。これらの知見は、抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤が、転移性肺がんのみならず、原発性肺がんの治療においても優れた抗腫瘍効果を発揮することを示唆するものである。

肺がん治療において、抗腫瘍薬の血液を介した他臓器への分布に起因する全身性副作用の発現が問題となっている。そこで、抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤を肺投与した際の血漿中 LDH 活性を測定したところ、LDH の活性増加はみられなかった（Figure 17）。それゆえ、抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤の肺投与は、全身的な細胞障害とこれに起因する全身性副作用の発現を回避可能な生

体適合性に優れた投与システムであることが示された。

上述のように、抗腫瘍 siRNA 封入ナノ粒子製剤の肺投与は、肺がん治療において高い治療効果と安全性を兼ね備えた有用性の高い肺投与型 DDS であることが明らかとなった。このナノ粒子製剤は、siRNA の物理化学的性質に基づいて調製するため、いかなる遺伝子を対象とした siRNA にも応用可能である。例えば、非小細胞肺がんでは過剰発現し、アポトーシスを阻害するとされている Bcl-xL⁵⁷⁾ や、肺がんでは細胞増殖を促進する KRAS 遺伝子変異の転写因子である GATA2⁵⁸⁾ などの遺伝子発現を抑制する siRNA を封入することで、さらなる治療効果の向上が期待できる。また、脂肪酸、ゲムシタビン及びカルシウムの複合体⁵⁹⁾ からなる製剤コアを使用したり、ドキシソルビシン結合ポリアスパラギン酸⁶⁰⁾ をキャリア高分子として使用することで、siRNA に加えて抗腫瘍薬もナノ粒子製剤に併用封入が可能なことから、ナノ粒子製剤の汎用性は極めて高いといえる。さらに、薬剤抵抗性に関わる MRP1 などを標的とした siRNA によるがん治療の研究⁶¹⁾ も行われていることから、肺がんの腫瘍部位のみで薬剤耐性に関するタンパク質を阻害することで、併用される抗腫瘍薬の効果を増強するという、新たな治療戦略にもナノ粒子製剤の肺投与が応用できるのではないだろうか。

総括

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。

1. 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。
2. 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。
3. 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。

本研究の成果は、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。

謝辞

本研究の遂行に際して、終始御懇篤なる御指導とご鞭撻を賜りました北海道薬科大学 薬剤学分野 丁野純男教授に厚く感謝の意を表します。

本研究の遂行に際して、数々の御懇篤なる御指導と御鞭撻、並びに御激励を賜りました北海道薬科大学 薬事管理学分野 多田均教授に厚く感謝の意を表します。

本研究の細部にわたり、終始御懇篤なる御指導とご鞭撻、並びにご激励を賜りました北海道薬科大学 薬剤学分野 戸上紘平講師に厚く感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、有益な御示唆を頂きました北海道薬科大学 医薬化学分野 伊藤慎二教授に深く感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、有益な御示唆を頂きました北海道薬科大学 臨床薬理学分野 戸田貴大教授に深く感謝の意を表します。

実験協力並びに論文作成にご協力を頂きました、北海道薬科大学 薬剤学分野の諸氏に感謝致します。

日本薬学会長井記念薬学奨励金に採用いただき、生活面での経済的な御支援を賜りましたこと、厚く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) National Cancer Center Japan. Cancer statistics in japan '16. (2016),
- 2) Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. (2015), 65, 87-108
- 3) Shtivelman E, Hensing T, Simon GR, Dennis PA, Otterson GA, Bueno R and Salgia R. Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer. *Oncotarget*. (2014), 5, 1392-1433
- 4) Kim HS, Kim JH, Kim B, Choi HC, Kwon JH and Choi DR. Phase ii study of weekly carboplatin and irinotecan as first-line chemotherapy for patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. (2013), 71, 1591-1597
- 5) Jaggi AS and Singh N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. *Toxicology*. (2012), 291, 1-9
- 6) Launay-Vacher V, Rey JB, Isnard-Bagnis C, Deray G and Daouphars M. Prevention of cisplatin nephrotoxicity: State of the art and recommendations from the european society of clinical pharmacy special interest group on cancer care. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. (2008), 61, 903-909
- 7) Togami K, Chono S and Morimoto K. Aerosol-based efficient delivery of clarithromycin, a macrolide antimicrobial agent, to lung epithelial lining fluid and alveolar macrophages for treatment of respiratory infections. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*. (2012), 25, 110-115
- 8) Togami K, Chono S and Morimoto K. Aerosol-based efficient delivery of azithromycin to alveolar macrophages for treatment of respiratory infections. *Pharmaceutical development and technology*. (2013), 18, 1361-1365
- 9) Togami K, Chono S, Seki T and Morimoto K. Aerosol-based efficient delivery of telithromycin, a ketolide antimicrobial agent, to lung epithelial lining fluid and alveolar macrophages for treatment of respiratory infections. *Drug development and industrial*

- pharmacy*. (2010), 36, 861-866
- 10) Togami K, Chono S and Tada H. Alteration in intrapulmonary pharmacokinetics of aerosolized model compounds due to disruption of the alveolar epithelial barriers following bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Journal of pharmaceutical sciences*. (2016), 105, 1327-1334
 - 11) Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG and Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. (2008), 14, 1310-1316
 - 12) In GK and Nieva J. Emerging chemotherapy agents in lung cancer: Nanoparticle therapeutics for non-small cell lung cancer. *Translational Cancer Research*. (2015),
 - 13) Iwamoto T. Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: Review of the efficacy and side effects of approved drugs. *Biological and pharmaceutical bulletin*. (2013), 36, 715-718
 - 14) Chono S, Tanino T, Seki T and Morimoto K. Efficient drug delivery to alveolar macrophages and lung epithelial lining fluid following pulmonary administration of liposomal ciprofloxacin in rats with pneumonia and estimation of its antibacterial effects. *Drug development and industrial pharmacy*. (2008), 34, 1090-1096
 - 15) Dekhuijzen PN, Vincken W, Virchow JC, Roche N, Agusti A, Lavorini F, van Aalderen WM and Price D. Prescription of inhalers in asthma and copd: Towards a rational, rapid and effective approach. *Respiratory medicine*. (2013), 107, 1817-1821
 - 16) Kim I, Byeon HJ, Kim TH, Lee ES, Oh KT, Shin BS, Lee KC and Youn YS. Doxorubicin-loaded highly porous large plga microparticles as a sustained- release inhalation system for the treatment of metastatic lung cancer. *Biomaterials*. (2012), 33, 5574-5583
 - 17) Urva SR, Shin BS, Yang VC and Balthasar JP. Sensitive high performance liquid chromatographic assay for assessment of doxorubicin pharmacokinetics in mouse plasma and tissues. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. (2009), 877, 837-841
 - 18) Saitoh Y, Terada N, Saitoh S, Ohno N, Jin T and Ohno S. Histochemical analyses and quantum dot imaging of microvascular blood flow with pulmonary edema in living

- mouse lungs by "in vivo cryotechnique". *Histochemistry and cell biology*. (2012), 137, 137-151
- 19) Gagnadoux F, Hureauux J, Vecellio L, Urban T, Le Pape A, Valo I, Montharu J, Leblond V, Boisdron-Celle M, Lerondel S, Majoral C, Diot P, Racineux JL and Lemarie E. Aerosolized chemotherapy. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*. (2008), 21, 61-70
 - 20) Qiu X, Liang Y, Sellers RS, Perez-Soler R and Zou Y. Aerosol azacytidine inhibits orthotopic lung cancers in mice through its DNA demethylation and gene reactivation effects. *PLoS one*. (2014), 9, e109874
 - 21) Bianchi A, Dufort S, Lux F, Fortin PY, Tassali N, Tillement O, Coll JL and Cremillieux Y. Targeting and in vivo imaging of non-small-cell lung cancer using nebulized multimodal contrast agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2014), 111, 9247-9252
 - 22) Cella D, Peterman A, Hudgens S, Webster K and Socinski MA. Measuring the side effects of taxane therapy in oncology: The functional assesment of cancer therapy-taxane (fact-taxane). *Cancer*. (2003), 98, 822-831
 - 23) Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohmmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK and Mukherjee SK. Rna interference: Biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology review : MMBR*. (2003), 67, 657-685
 - 24) Behlke MA. Progress towards in vivo use of sirnas. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. (2006), 13, 644-670
 - 25) Meade BR and Dowdy SF. Exogenous sirna delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Advanced drug delivery reviews*. (2007), 59, 134-140
 - 26) Zhao N, Zu ZX, Liu CM, Dong WJ, Liu DP and Liang CC. Knockdown of mouse adult beta-globin gene expression in mel cells by retrovirus vector-mediated rna interference. *Molecular biotechnology*. (2004), 28, 195-199
 - 27) McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ and Kay MA. Rna interference in adult mice. *Nature*. (2002), 418, 38-39
 - 28) Banerjee R, Tyagi P, Li S and Huang L. Anisamide-targeted stealth liposomes: A potent carrier for targeting doxorubicin to human prostate cancer cells. *International journal of*

- cancer*. (2004), 112, 693-700
- 29) Bangham AD, Standish MM and Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology*. (1965), 13, 238-252
 - 30) Funato K, Yoda R and Kiwada H. Contribution of complement system on destabilization of liposomes composed of hydrogenated egg phosphatidylcholine in rat fresh plasma. *Biochimica et biophysica acta*. (1992), 1103, 198-204
 - 31) Chono S, Tauchi Y, Deguchi Y and Morimoto K. Efficient drug delivery to atherosclerotic lesions and the antiatherosclerotic effect by dexamethasone incorporated into liposomes in atherogenic mice. *Journal of drug targeting*. (2005), 13, 267-276
 - 32) Li SD and Huang L. Surface-modified lpd nanoparticles for tumor targeting. *Annals of the New York Academy of Sciences*. (2006), 1082, 1-8
 - 33) Chono S, Li SD, Conwell CC and Huang L. An efficient and low immunostimulatory nanoparticle formulation for systemic sirna delivery to the tumor. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. (2008), 131, 64-69
 - 34) Huang T, Long M and Huo B. Competitive binding to cuprous ions of protein and bca in the bicinchoninic acid protein assay. *The open biomedical engineering journal*. (2010), 4, 271-278
 - 35) Dosio F, Arpicco S, Stella B and Fattal E. Hyaluronic acid for anticancer drug and nucleic acid delivery. *Advanced drug delivery reviews*. (2016), 97, 204-236
 - 36) Castillo J, Amaral A and Oliva R. Sperm nuclear proteome and its epigenetic potential. *Andrology*. (2014), 2, 326-338
 - 37) Chen B, Le W, Wang Y, Li Z, Wang D, Ren L, Lin L, Cui S, Hu JJ, Hu Y, Yang P, Ewing RC, Shi D and Cui Z. Targeting negative surface charges of cancer cells by multifunctional nanoprobes. *Theranostics*. (2016), 6, 1887-1898
 - 38) Tanaka F, Otake Y, Nakagawa T, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yanagihara K, Nakayama J, Fujimoto I, Ikenaka K and Wada H. Expression of polysialic acid and stx, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer. *Cancer research*. (2000), 60, 3072-3080
 - 39) Li Y, Wu Y, Huang L, Miao L, Zhou J, Satterlee AB and Yao J. Sigma receptor-mediated targeted delivery of anti-angiogenic multifunctional nanodrugs for combination tumor

- therapy. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. (2016), 228, 107-119
- 40) Wilke RA, Mehta RP, Lupardus PJ, Chen Y, Ruoho AE and Jackson MB. Sigma receptor photolabeling and sigma receptor-mediated modulation of potassium channels in tumor cells. *The Journal of biological chemistry*. (1999), 274, 18387-18392
- 41) Lee SJ, Yhee JY, Kim SH, Kwon IC and Kim K. Biocompatible gelatin nanoparticles for tumor-targeted delivery of polymerized siRNA in tumor-bearing mice. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. (2013), 172, 358-366
- 42) Qian Y, Qiao S, Dai Y, Xu G, Dai B, Lu L, Yu X, Luo Q and Zhang Z. Molecular-targeted immunotherapeutic strategy for melanoma via dual-targeting nanoparticles delivering small interfering RNA to tumor-associated macrophages. *ACS nano*. (2017), 11, 9536-9549
- 43) Xia Y, Xu T, Wang C, Li Y, Lin Z, Zhao M and Zhu B. Novel functionalized nanoparticles for tumor-targeting co-delivery of doxorubicin and siRNA to enhance cancer therapy. *International journal of nanomedicine*. (2018), 13, 143-159
- 44) Yogasundaram H, Bahniuk MS, Singh HD, Aliabadi HM, Uludag H and Unsworth LD. BSA nanoparticles for siRNA delivery: Coating effects on nanoparticle properties, plasma protein adsorption, and in vitro siRNA delivery. *International journal of biomaterials*. (2012), 2012, 584060
- 45) Ma T, Jiang JL, Liu Y, Ye ZB and Zhang J. Preparation and evaluation of nanoparticles loading plasmid DNAs inserted with siRNA fragments targeting c-myc gene. *Pharmaceutical biology*. (2014), 52, 1179-1188
- 46) de Nigris F, Balestrieri ML and Napoli C. Targeting c-myc, ras and IGF cascade to treat cancer and vascular disorders. *Cell cycle*. (2006), 5, 1621-1628
- 47) Grothey A. Future directions in vascular endothelial growth factor-targeted therapy for metastatic colorectal cancer. *Seminars in oncology*. (2006), 33, S41-49
- 48) Halaby MJ and Yang DQ. p53 translational control: A new facet of p53 regulation and its implication for tumorigenesis and cancer therapeutics. *Gene*. (2007), 395, 1-7
- 49) Yang Y, Hu Y, Wang Y, Li J, Liu F and Huang L. Nanoparticle delivery of pooled siRNA

- for effective treatment of non-small cell lung cancer. *Molecular pharmaceutics*. (2012), 9, 2280-2289
- 50) Decker T and Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (tnf) activity. *Journal of immunological methods*. (1988), 115, 61-69
- 51) Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS and St Clair DK. The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *The Journal of clinical investigation*. (1996), 98, 1253-1260
- 52) Chono S, Tanino T, Seki T and Morimoto K. Influence of particle size on drug delivery to rat alveolar macrophages following pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into liposomes. *Journal of drug targeting*. (2006), 14, 557-566
- 53) Muralidharan P, Mallory E, Malapit M, Hayes D, Jr. and Mansour HM. Inhalable pegylated phospholipid nanocarriers and pegylated therapeutics for respiratory delivery as aerosolized colloidal dispersions and dry powder inhalers. *Pharmaceutics*. (2014), 6, 333-353
- 54) Huang Q, Li L, Chen H, Dang Y, Zhang J, Shao N, Chang H, Zhou Z, Liu C, He B, Wei H and Xiao J. Mdm2 knockdown mediated by a triazine-modified dendrimer in the treatment of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. (2016), 7, 44013-44022
- 55) Jung JH, Kim MJ, Lee H, Lee J, Kim J, Lee HJ, Shin EA, Kim YH, Kim B, Shim BS and Kim SH. Farnesiferol c induces apoptosis via regulation of l11 and c-myc with combinational potential with anticancer drugs in non-small-cell lung cancers. *Scientific reports*. (2016), 6, 26844
- 56) Zhou F, Du J and Wang J. Albendazole inhibits hif-1alpha-dependent glycolysis and vegf expression in non-small cell lung cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry*. (2017), 428, 171-178
- 57) Othman N, In LL, Harikrishna JA and Hasima N. Bcl-xl silencing induces alterations in hsa-mir-608 expression and subsequent cell death in a549 and sk-lu1 human lung adenocarcinoma cells. *PLoS one*. (2013), 8, e81735
- 58) Shen S, Mao CQ, Yang XZ, Du XJ, Liu Y, Zhu YH and Wang J. Cationic lipid-assisted polymeric nanoparticle mediated gata2 sirna delivery for synthetic lethal therapy of kras

- mutant non-small-cell lung carcinoma. *Molecular pharmaceutics*. (2014), 11, 2612-2622
- 59) Zhang Y, Peng L, Mumper RJ and Huang L. Combinational delivery of c-myc sirna and nucleoside analogs in a single, synthetic nanocarrier for targeted cancer therapy. *Biomaterials*. (2013), 34, 8459-8468
- 60) Cheng H, Li YY, Zeng X, Sun YX, Zhang XZ and Zhuo RX. Protamine sulfate/poly(l-aspartic acid) polyionic complexes self-assembled via electrostatic attractions for combined delivery of drug and gene. *Biomaterials*. (2009), 30, 1246-1253
- 61) Shao SL, Cui TT, Zhao W, Zhang WW, Xie ZL, Wang CH, Jia HS and Liu Q. Rnai-based knockdown of multidrug resistance-associated protein 1 is sufficient to reverse multidrug resistance of human lung cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. (2014), 15, 10597-10601