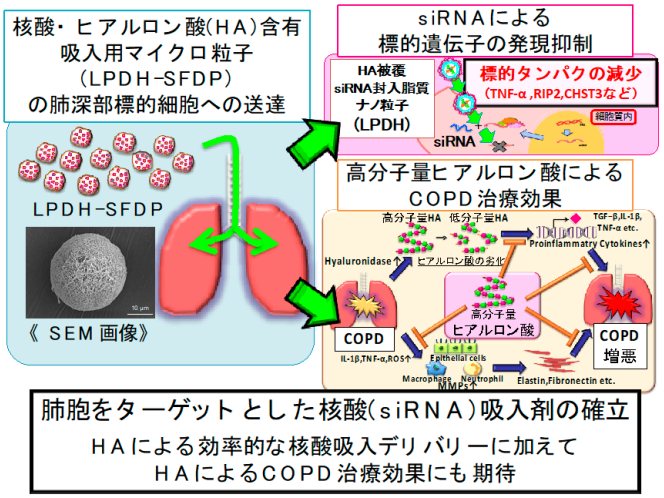
209　肺胞を標的とした核酸吸入剤の開発～COPD治療へ～	福重　香

【目的】肺胞まで到達する吸入剤は、肺疾患の治療のみならず、種々の薬物の全身投与手段としても極めて有望である。また、特定遺伝子の発現亢進に起因する疾患治療のため、siRNA（small interfering RNA）薬の開発が期待されている。しかし、siRNA 吸入剤の開発において、肺深部の肺胞まで siRNA を安全かつ効率的に送達させることがボトルネックとなっている。本研究では、我々が開発を進めてきた核酸・ヒアルロン酸（HA）含有吸入用マイクロ粒子製剤 LPDH-SFDP（Spray-freeze-dried particles（SFDP）containing a hyaluronic acid（HA）-coated liposome-protamine-DNA complex（LPDH））の疾患治療への応用を試み、siRNA 吸入剤の実現を目指す。本研究では、疾患治療、特に COPD 治療への応用を目指すにあたり、LPDH-SFDP 作製法の再検討を行う。既存の作製法より低密度な粒子の作製を期待し、直径 1μm 以下の微細気泡であるウルトラファインバブル（UFB）の応用を試みる。加えて、COPD モデルラットの作製を行い、LPDH-SFDP 吸入投与による治療実験に進む。

【方法】UFB は、独自に開発したベンチュリー式 UFB 作製装置により、ガス成分を大気として作製した。ナノトラッキング法による粒子径測定により UFB の物理物性を評価した。UFB は、LPDH 分散液に分散させて加えた他、LPDH-SFDP の作製法は過去の研究とほぼ同様である。COPD 治療に向けた siRNA を内封する HA 被覆脂質ナノ粒子（LPDH）を作製し、さらに、糖アルコールを用いた噴霧凍結乾燥法により、核酸および HA を肺胞まで送達する低密度の多孔性マイクロ粒子（LPDH-SFDP）を作製した。作製した LPDH-SFDP の物性評価は、走査型顕微鏡（SEM）を用いた形状評価により行った。また、ブタ膵臓エラスターゼ（PPE）（100 U/0.5 ml）を SD ラットの肺へ均等に曝露し、COPD モデルラットを作製した。

【結果】作製した UFB の粒子径を測定したところ平均粒子径 135.1±2.6 nm であり、全体として 200 nm 以下の微細気泡の作製を確認できた。粒子濃度は、$1.5\times10^{9}\pm2.0\times10^{7}$個／ml であった。LPDH-SFDP を作製する際、この微小で高濃度の UFB を LPDH 分散液に含有させてマイクロ粒子を作製することで、マイクロ粒子の骨格となるマンニトールが物理的に阻害され、既存の作製法より低密度な粒子が作製できると考えている。作製した LPDH-SFDP を SEM 画像で確認したところ、UFB の有無に関わらず、平均粒子径約 30～40μm の粒子が観察された。空隙率に関しても、観察できる差異はなかったが、今回用いた UFB の平均粒子径は 130 nm と小さく、目視できるレベルにない。少なくとも、UFB を用いても粒子を破壊するような悪影響がないことは確認できた。今後、この粒子の空気動力学径を測定し、肺深部への送達性を評価していく。COPD モデルラットの作製では、エラスターゼ投与により肺胞の破壊がみられ軽度の COPD 病態の作製に成功した。現在、この COPD モデルラットに、LPDH-SFDP を吸入投与する治療実験を進めている。

本研究の概要



209. 肺胞を標的とした核酸吸入剤の開発～COPD 治療へ～

福重　香

愛知医科大学 医学部 解剖学講座

Key words：遺伝子（siRNA）デリバリー，脂質ナノ粒子，吸入粒子製剤，ヒアルロン酸

緒　言

近年、開発が盛んなバイオ医薬は、従来の低分子医薬と比較して構造安定性に乏しく、そのほとんどが患者負担の大きい注射剤であるため、その解決法の 1 つとして吸入剤化が望まれている。種々の薬剤の吸入剤化研究が進められ、2014 年には、待望の小型インスリン吸入製剤 Afrezza®（MannKind 社）が米国 FDA に認可された。しかし、それに続く吸入型バイオ医薬品は、未だ技術的な課題が多く開発途上であり、効率的に薬剤を肺胞まで送達するドラッグデリバリー（DDS）キャリアが必須である。

siRNA をはじめとする機能性核酸の吸入剤化の実現には肺深部への送達性に加え、安定性・安全性の確保も重要である。我々はこれまでに、生体膜由来のリン脂質に siRNA を内封し、さらにこれを高分子量のヒアルロン酸（HA）で被覆することで、標的細胞内への導入効率および安定性・安全性を向上させた核酸内封脂質ナノ粒子（LPDH）を開発してきた［2］。さらに、これを多孔性で低密度の粉体マイクロ粒子内部に含有することで、効率的に機能性核酸を肺組織深部に到達させるキャリアである LPDH-SFDP (Spray-freeze-dried particles (SFDP) containing a hyaluronic acid（HA）-coated liposome-protamine-DNA complex（LPDH)）の開発を行ってきた［1］。

吸入薬剤のバイオアベイラビリティには、①肺胞への送達効率と②薬剤の安定性が大きく影響する。①肺深部への到達性は、粒子サイズに依存し、形状や密度を考慮した粒子径（空気動力学径）が 1～5μm 程度で、見かけの粒子径（幾何学径）がこれよりやや大きい粒子が優れることが知られている。②薬剤の安定化については、国内外で、種々の添加剤を用いた検討が進められてきたが、我々は、元より生体に存在する HA に注目した。これまでは、主にターゲティングリガンドとして様々な DDS キャリアに用いられてきた HA だが、製剤安定化への寄与についても注目され始めている。

これまでの検討から、HA の吸入剤への応用により、吸入効率はもちろんのこと、安全性にも優れた吸入用粒子が作製できると考えているが、LPDH-SFDP をより肺深部への送達に適した粒子にするためには、更なる低密度化が必要である。また、疾患治療への応用には、生体での検討も必要であり、この粒子の開発は未だ初期段階である。疾患治療への応用の第一歩として、現在、根本的な治療法がない慢性閉塞性肺疾患（COPD）に焦点を当てた検討を目指す。HA は、潤滑・緩衝作用を持ち、変形性関節症治療などに用いられてきたが、最近、肺胞内にも HA が存在し、COPD の病態において、肺を防御する作用を示すことが明らかになった。そのため、本研究で開発したキャリアにより HA が肺胞まで送達されれば、COPD 治療に効力を発揮すると考えている。遺伝子レベルの病態制御が可能な siRNA と高分子量 HA を肺深部に送達する吸入薬剤の開発により、薬剤開発が急務である COPD 治療への貢献を目指している。

本研究では、疾患治療、特に COPD 治療への応用を目指すにあたり、直径 1μm 以下の微細気泡であるウルトラファインバブル（UFB）を用いた LPDH-SFDP 作製法の再検討と、COPD モデルラットの作製を行った。

方　法

1. 肺胞を標的とした、核酸・HA 含有吸入用マイクロ粒子（LPDH-SFDP）の作製

糖アルコール（マンニトール）を主成分として、siRNA および HA を肺胞まで送達する吸入用多孔性マイクロ粒子（LPDH-SFDP）を作製した。LPDH-SFDP は、低密度の多孔質粉末粒子を作製可能な噴霧凍結乾燥法（SFD 法：スプレーフリーズドライ法）により作製した。これまでの LPDH-SFDP［1］は、次の方法で作製してきた。LPDH 分散液を、5%マンニトール+2% L-ロイシン（添加剤）溶液と 1：1（体積比）の比率で混和し、マイクロスプレーヤー（Model 1A-1C：MicroSprayer, Penn-Century）を使用して 150/20 φ/H（mm）のディッシュ中の液体窒素（約 100 mL）に約 20 cm の高さから噴霧した。このマイクロ粒子が分散する液体窒素を回収し、−80℃下に静置することで、液体窒素を気化させた後、凍結乾燥機にかけることで LPDH-SFDP を作製した。現在、これまで用いてきた MicroSprayer は、Penn-Century 社のクローズにより使用できない。また、吸入効率の観点から更なる改良が必要であり、新たなスプレーヤーを選定した。東レ社のファインパーティクルスプレーヤーなど 3 つのスプレーヤーから噴霧された微粒子の粒径分布（空気動力学径）を APS（aerodynamic particle sizer）で計測した。加えて、ナノサイズの微細気泡である UFB の応用を試みた。これを LPDH 分散液に分散させることで、LPDH-SFDP の粒子密度を低下させ、より肺深部に到達する粒子となることを期待した。UFB は、独自に開発したベンチュリー式 UFB 作製装置により、ガス成分は大気として作製した。ナノトラッキング法による粒子径測定により UFB の物理物性を評価した。その他の LPDH-SFDP の作製法は、以前［1］と同様である。作製した LPDH-SFDP の物性評価は、走査型顕微鏡（SEM）を用いた形状評価により行った。

2. COPD モデルラットの作製

ブタ膵臓エラスターゼ（PPE）（100 U/0.5 ml）を、気管内投与スプレーヤーを用いてラット（SD、雄）の肺へ均等に曝露し、COPD モデルラットを作製した。1 週間経過観察した後に、肺を摘出し、組織切片（HE 染色）を作製してエラスターゼ非曝露群（Control）と比較した。

結果および考察

1.　肺胞を標的とした、核酸・HA 含有吸入用マイクロ粒子（LPDH-SFDP）の作製

3 つのスプレーヤーから噴霧された微粒子の粒径分布（空気動力学径）を APS で計測したところ、東レ社のスプレーヤーから噴霧された粒子の空気動力学径の中央値 MMAD（mass median aerodynamic diameter）は、5.0 μm、他 2 つは、5.1 μm、6.25 μm であった。この結果から、MMAD が一番小さい東レ社のものを採用した。

また、使用する UFB の粒子径を測定したところ平均粒子径 135.1±2.6 nm、D90 203.0±10.2 nm であり、全体として 200 nm 以下の微細気泡を作製できていることが確認できた（図 1 a）。粒子濃度は、$1.5\times10^{9}\pm2.0\times10^{7}$個／ml であった。LPDH-SFDP を作製する際、この微小で高濃度の UFB を LPDH 分散液に含有させてマイクロ粒子を作製することで、マイクロ粒子の骨格となるマンニトールが物理的に阻害され、既存の作製法より低密度な粒子が作製できると考えている。作製した LPDH-SFDP を SEM で確認したところ、UFB の有無に関わらず、以前の報告［1］と同様、平均粒子径約 30〜40 μm の粒子が観察された（図 1 b）。空隙率に関しても、観察できる差異はなかったが、今回用いた UFB の平均粒子径は 130 nm と小さく、目視できるレベルにない。少なくとも、UFB を用いても粒子を破壊するような悪影響がないことは確認できた。今後、この粒子の空気動力学径を測定し、肺深部への送達性を評価していく。現在、DPI 及び MDI の空気動力学径測定機器として日本薬局方に 17 改正から収載された NGI（Next Generation Impactor）による測定を準備している。

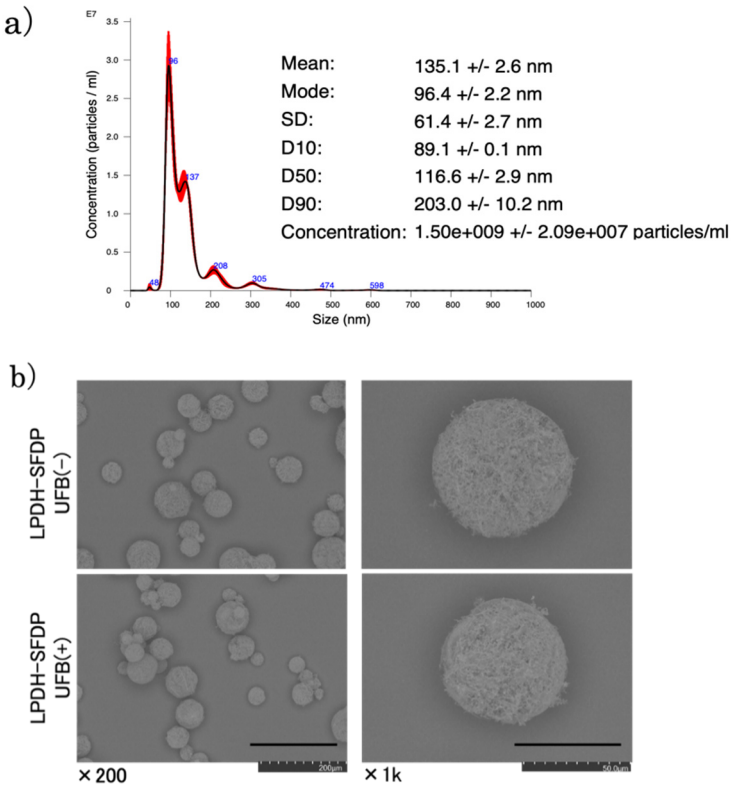


図1. 粒子の物性

a) ウルトラファインバブル（UFB）の物性：ナノサイトにより測定したUFBの粒子径（nm）および粒子濃度（個／ml）。

b) LPDH-SFDPのSEM画像（スケールバー：左図200μm、右図50μm）。

2. COPD モデルラットを用いた LPDH-SFDP の有用性評価

ブタ膵臓エラスターゼ（PPE）（100 U/0.5 ml）を SD ラットの肺へ均等に曝露し、COPD モデルラットを作製した。1 週間経過後の肺の組織切片は、図 2 のようになった。Elastase 群では、肺胞の破壊がみられ COPD 病態の作製に成功した。現在、この COPD モデルラットに LPDH-SFDP を吸入投与し、治療実験を進めている。この結果に合わせ、重度の COPD モデルラットの作製も検討し、詳細な評価を重ねていく。

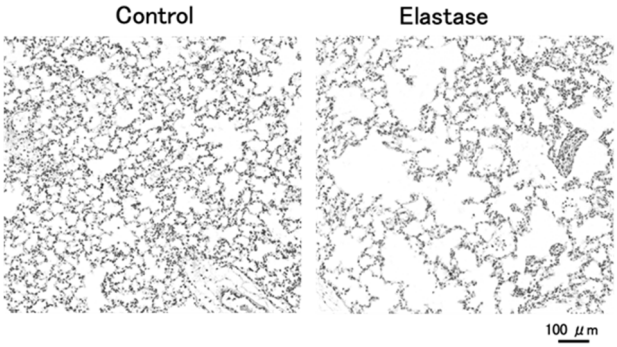


図 2. COPD モデルマウスの作製

コントロールラット（左図）およびElastase曝露ラット（1week）（右図）の肺組織像。HE染色、スケールバー：100μm。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、愛知医科大学医学部解剖学講座の内藤宗和教授、畑山直之准教授である。

文　献

1） Fukushige K, Tagami T, Naito M, Goto E, Hirai S, Hatayama N, Yokota H, Yasui T, Baba Y, Ozeki T. Developing spray-freeze-dried particles containing a hyaluronic acid-coated liposome-protamine-DNA complex for pulmonary inhalation. Int J Pharm. 2020 Jun 15;583:119338. Epub 2020 Apr 18. PMID: 32311468. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119338

2） Fukushige K, Tagami T, Ozeki T. The offset effect of a hyaluronic acid coating to cationic carriers containing siRNA: Alleviated cytotoxicity and retained gene silencing in vitro. Journal of Drug Delivery Science and Technology 2017 39 435-441. DOI: 10.1016/j.jddst.2017.03.024