

氏名	チッティマ マナギット Chittima Managit
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第573号
学位授与の日付	平成17年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	Development of galactosylated liposome and emulsion for hepatocyte-selective drug delivery (肝実質細胞選択的薬物送達を目的としたガラクトース修飾リポソームおよびエマルジョン製剤の開発)
論文調査委員	(主査) 教授 橋田 充 教授 高倉 喜信 教授 乾 賢一

論文内容の要旨

近年、薬理活性が強い反面副作用が強く投与の難しい薬物が数多く開発されており、こうした薬物を有効に臨床適用するため、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の概念に基づき、その体内動態を精密に制御し作用部位へ特異的に送達させるターゲティング技術の開発が期待されている。ターゲティング法のうち標的部に親和性を有する物質をキャリアに用い、キャリア自身の体内動態に薬物を乗せることで、薬物を薬理活性部位へ到達させ副作用発現部位への蓄積を防ぐ方法は最も一般的で有用性が高いと考えられる。キャリアのなかでも微粒子性製剤は、多くの薬物に利用可能なことからDDSとして応用性が広い。しかしながら、静脈内投与された微粒子性製剤は、Kupffer細胞や脾臓マクロファージなどの細網内皮系細胞へ取り込まれることが知られており、幅広い治療に応用するためには、細胞レベルで細胞特異性を付与する技術の開発が必要不可欠である。肝実質細胞が有するアジアロ糖タンパク質レセプター(ASGPR)は細胞特異的で、また比較的厳密な基質認識性を有することから、ガラクトース修飾を利用した肝実質細胞標的化ターゲティング型微粒子性製剤の実用化が期待されている。微粒子性製剤を代表するリポソームとエマルジョンは内封できる薬物の物性や量に関して異なった特性を有し、治療目的に応じて選択される。そこで著者は、新規ガラクトース誘導体Gal-C4-Cholを用いて、リポソームおよびエマルジョンの肝実質細胞ターゲティング型DDS製剤の製剤設計を行い、*in vitro*細胞取り込みおよび*in vivo*体内動態解析を通じてその動態制御機能を評価した。

1. 肝実質細胞指向型ガラクトース修飾リポソームの開発

効率的な標的指向化を実現する為には、生体内でリポソーム表面にリガンドを安定に保持させることが重要と考え、これを実現するためにガラクトース修飾コレステロール誘導体Gal-C4-Cholを用いたガラクトース修飾リポソームを調製した。

ASGPRが発現しているヒト肝臓癌由来細胞株HepG2を用いて*in vitro*で細胞への取り込みを検討した結果、Gal-C4-Chol含有比3.5%以上でASGPRを介した取り込みが認められ、取り込み量は含有比に応じて増加した。また、Gal-C4-Chol含有比5.0%のガラクトース修飾リポソームをマウスへ静脈内投与10分後投与量の約80%もの高い肝臓への集積が認められ、これが過剰量のガラクトース修飾牛血清アルブミン(BSA)前投与により抑制されたことからASGPRによる取り込みが示唆された。さらに、肝構成細胞間における分布を分離評価した結果、実質細胞/非実質細胞間比(PC/NPC比)が15と肝実質細胞選択的であることが確かめられた。

2. ガラクトース修飾リポソームに対するより精密な体内動態の制御法の開発

前章で開発したガラクトース修飾リポソームに対し、ASGPRへの認識効率を変化させるため、高分子であるTween20または様々な分子量のPEG脂質誘導体による修飾併用したリポソームを調製し、静脈内投与されたガラクトース修飾リポソームの体内動態の精密制御を試みた。Tween20または分子量350, 2000のポリエチレングリコール(PEG)脂質含有により、静脈内投与後の血液中からの消失および肝臓への取り込みは減少し、みかけの肝臓への取り込みが低下したが、肝構成細胞間での分布においては未修飾PEG₃₅₀リポソームがPC/NPC比1.8であったのに対し、ガラクトース修飾PEG₃₅₀リポ

ソームでは7.7であり、肝実質細胞選択性が維持されていることが示された。以上、Tween20やPEG脂質などの併用によりASGPRへの認識効率や非特異的な臓器移行を変化させ、ガラクトース修飾リポソームの肝実質細胞への取り込みをより精密に制御できることが示唆された。

3. 肝実質細胞指向型ガラクトース修飾エマルジョンの開発

水中油型(o/w)エマルジョンは、リポソームと比較して、一般に脂溶性薬物をより大量に溶解することができるため、リポソームとは異なった適用が考えられる。そこで、Gal-C4-Cholを用いてガラクトース修飾o/wエマルジョンを調製し、標的指向型微粒子性製剤としての評価をおこなった。HepG2を用いて細胞への取り込みを検討した結果、Gal-C4-Chol含有比4.0%においてASGPRを介した取り込みが認められ、取り込み量は含有比に応じて増加した。また、Gal-C4-Chol含有比5.0%のガラクトース修飾o/wエマルジョンをマウスへ静脈内投与10分後、投与量の約70%の肝臓への集積が認められ、過剰量のガラクトース修飾BSA前投与により有意な抑制がみられたことからASGPRを介した取り込みであることが示された。さらに、肝構成細胞間での分布はPC/NPC比7.4と肝実質細胞選択的であることも確かめられた。

以上、著者はリポソームおよびエマルジョン製剤をもとにして、ASGPR認識を介して肝実質細胞に選択的かつ効率的な薬物送達が可能なるガラクトース修飾微粒子製剤の開発を行った。また、PEG修飾などの併用によりASGPRへの認識効率を変化させる新しい製剤設計により、ガラクトース修飾リポソームの全身動態と肝実質細胞への送達のより精密な制御を実現した。これらの知見は、微粒子製剤による細胞選択的ターゲティングシステムの開発に有益な設計指針を提供するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

薬物ターゲティング技術のなかでも、微粒子性製剤をキャリアに用い薬物を薬理活性部位へ到達させるアプローチは応用性が広いが、静脈内投与された微粒子性製剤はKupffer細胞や脾臓マクロファージなどの細網内皮系細胞へ取り込まれることから、細胞特異性を付与する技術の開発が不可欠と考えられる。中でも、肝実質細胞が有するアジアロ糖タンパク質レセプター(ASGPR)は細胞特異的かつ比較的厳密な基質認識性を有することから、ガラクトース修飾の応用が期待されている。申請者は、ガラクトース誘導体Gal-C4-Cholを用いて、リポソームおよびエマルジョンの肝実質細胞ターゲティング型DDS製剤の製剤設計を行い、*in vitro*細胞取り込みおよび*in vivo*体内動態解析を通じてその動態制御機能を評価した。

Gal-C4-Cholを用いてガラクトース修飾リポソームを調製し、ASGPRが発現しているヒト肝臓癌由来細胞株HepG2を用いて*in vitro*で細胞への取り込みを検討した結果、ASGPRを介した取り込みが認められ、取り込み量はGal-C4-Cholの含有比に応じて増加した。一方、Gal-C4-Chol含有比5.0%のガラクトース修飾リポソームをマウスに静脈内投与すると、10分後に投与量の約80%が肝臓に集積し、これが過剰量のガラクトース修飾牛血清アルブミン(BSA)前投与により抑制されたことからASGPRによる取り込みが示唆された。さらに、肝構成細胞間における分布を分離評価した結果、肝実質細胞選択的であることが確かめられた。

次に、ガラクトース修飾リポソームに対し、ASGPRへの認識効率を変化させるために高分子性界面活性剤Tween20あるいは分子量の異なるPEG脂質誘導体を用いて修飾を施し肝臓移行速度の制御を試みた。修飾により、肝実質細胞選択性は維持したまま、投与後の血液中からの消失および肝臓への取り込みが抑制できることが示された。

次に、水中油型(o/w)エマルジョンにGal-C4-Cholを用いてガラクトース修飾を施し、HepG2細胞への取り込みを検討した結果、含有比に応じてASGPRを介した取り込みが認められた。また、Gal-C4-Chol含有比5.0%のガラクトース修飾o/wエマルジョンをマウスに静脈内投与した結果、投与量の70%に達する肝実質細胞選択的な肝臓への集積が認められ、これがASGPRを介した取り込みであることが示された。

以上、申請者はASGPR認識を介して肝実質細胞に選択的かつ効率的に薬物送達可能なガラクトース修飾リポソームおよびエマルジョン製剤を開発した。また、PEG修飾との2重修飾によりASGPRへの認識効率を変化させる新しい手法を考案した。これらの知見は、微粒子製剤による細胞選択的ターゲティングシステムの開発に有益な設計指針を提供するものと思われる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成17年3月2日論文内容とそれと関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。