

氏名	やま　　うち　　まさ　　ひろ 山　　内　　雅　　博
学位(専攻分野)	博　　士　(薬　　学)
学位記番号	論　薬　博　第　738　号
学位授与の日付	平　成　19　年　9　月　25　日
学位授与の要件	学　位　規　則　第　4　条　第　2　項　該　当
学位論文題目	リポソーム製剤からの低分子医薬および核酸医薬の放出特性制御に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 橋田 充 教授 半田 哲郎 教授 高倉 喜信

論 文 内 容 の 要 旨

リポソーム製剤は、抗がん剤や抗真菌剤を対象に実用化され、さらに静脈内投与可能なターゲティング型DDS製剤として開発研究が活発に進められている。しかしリポソームを薬物キャリアーとして利用する場合、薬物の安定保持と標的部位における速やかな薬物放出という相反する機能が同時に製剤に求められるため、開発上多くの困難を生じている。著者は、リポソーム製剤の薬物保持および放出に関する特性の制御を目的として、低分子モデル薬物として7-ヒドロキシスタウロスポリン (UCN-01)、ピンクリスチン、ドキソルピシン、高分子モデル薬物としてアニオン性デキストラン (DFA)、オリゴヌクレオチド、siRNAを用いてリポソーム製剤を調製し、各製剤における血液中での薬物漏出のメカニズムを解析して、薬物保持能と放出特性に優れたリポソーム製剤の開発を行った。

I. リポソームからの低分子薬物の放出制御

現在、臨床試験が進められている抗がん剤UCN-01は、ヒト血漿中の α_1 -酸性糖蛋白 (hAGP) と非常に強く結合することが明らかとなっている。一般に非結合型の薬物のみが細胞膜を透過できるため、このhAGPとの結合によってUCN-01の薬効が低下する可能性が危惧されたことから、血液中でのhAGPとの結合を抑制し、かつ腫瘍細胞内への効率的な送達を可能とする製剤として、リポソーム製剤の開発が検討された。最初に、常法により粒子径100nmのUCN-01リポソームを調製し、hAGP添加ラット血漿中における漏出性を評価した結果、UCN-01はリポソームから速やかに漏出しほぼ全てhAGPと結合した。従って、UCN-01は一般的なリポソームでは血液中での保持能が不十分で何らかの製剤学的工夫が必要であることが明らかとなった。そこで、リポソームを構成する脂質を変え、また粒子径を調節したUCN-01リポソームを調製し、薬物保持能と放出特性を評価した。検討の結果、脂質に水素添加大豆ホスファチジルコリンを使用し、粒子径を120nm以上にした場合、hAGP添加ラット血漿中でのUCN-01の漏出およびhAGPとの結合が顕著に抑制され、リポソームからのUCN-01の漏出性に粒子径が大きく影響することが明らかとなった。そこで次に、粒子径の増加による漏出制御現象が、一般性を持つ現象であるかどうかを検証するため、他の低分子薬物についても同様の検討を行った。その結果、ドキソルピシンの場合には粒子径に関わらずほとんど血漿中での漏出は認められず、一方、ピンクリスチンの場合にはUCN-01の場合と同様に粒子径の増加とともに漏出の抑制が認められた。一般に、ドキソルピシンはリポソームに安定に保持され、ピンクリスチンは漏出しやすい薬物として知られている。以上より、粒子径の調節による薬物の漏出制御は、リポソーム膜を拡散により透過しやすい薬物に対してより効果的であることが明らかとなった。さらに、以上で見出された粒子径の増加による漏出制御のメカニズムに関して検討を行った結果、電子顕微鏡観察、NMR測定、保持容積から、粒子径の増加に伴い、膜数が増加することが明らかとなり、この膜数の増加と漏出制御に相関が認められたことから、粒子径増加による漏出制御は膜数の増加によることが明らかとなった。

II. リポソームからの高分子薬物の放出制御

アンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNAなどの核酸医薬は、低分子医薬、蛋白医薬に続く、第三の医薬として期待さ

れているが、組織移行性、細胞内移行性がともに極めて低いことから、核酸医薬の実用化には、組織移行性と細胞内移行性を同時に兼ね備えたキャリアの開発が不可欠であるといわれている。そこで、著者は核酸医薬など高分子化合物に応用可能なリポソーム製剤の開発を試みた。種々の検討の結果、血中での速やかな消失やリポソームからの核酸の乖離を防ぐため、複合体型リポソームを中性脂質で被覆することを着想し、同時に標的組織に移行後被覆に使用した脂質が速やかに剥離し内部の核酸が放出するように、被覆に用いる脂質として卵黄ホスファチジルコリンを選択した。モデルとなるポリアニオンとして、DFAを使用し、被覆リポソームの調製方法を検討した結果、62.5%エタノール水溶液中ではDFA/カチオン脂質の複合体が溶解せず、被覆に使用した中性脂質が溶解することを見出した。本知見に基づき、この条件下で両者を混合した後蒸留水を添加し、エタノールの割合を徐々に低下させてエタノールが5%以下になったときに超遠心分離によりエタノールを除去し、目的とするリポソームを得た。得られたリポソームは、常法で調製される複合体型リポソームと比較して血漿中で漏出を抑制し、ラットに静脈内投与後高い血中滞留性を示した。以上の結果より、調製したリポソームがDFA/カチオン脂質の複合体を中性脂質で被覆した新規な構造を有し、高分子薬物のキャリアとして優れた薬物放出特性を有することが示唆された。

次に、DFAで確立した調製方法がオリゴヌクレオチド (ODN) に適応できるかを検証するため、同様の方法でリポソームを調製した結果、ほぼ定量的な薬物封入が得られ、また得られたリポソームは血漿中において速やかな漏出を示さず徐々にODNを放出した。また、マウスに静脈内投与した場合、優れた血中滞留性を示し、腫瘍への移行性もODN単独で投与したときと比べ、大幅に向上することが確認された。以上の薬物保持特性および組織移行性に関する検討結果より、調製したリポソームは標的組織移行後徐々にODNを放出し、その後ODNは共存するカチオン脂質的作用により細胞内へ効率良く移行することが期待された。そこで、siRNAを封入したリポソームを調製し抗腫瘍効果試験を実施した結果、siRNA単独投与では薬効を示さなかったのに対し、強い抗腫瘍効果が得られた。

以上、本研究ではリポソーム製剤の有効性を支配する血液における薬物漏出特性に関して種々検討を行い、そのメカニズムの一端を明らかにした。また、低分子薬物と高分子薬物それぞれに対して製剤学的検討を行い、薬物放出特性を制御したリポソーム製剤の開発に成功した。これらの知見は、今後のリポソーム製剤の開発にあたり、有用な基礎的情報を提供するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

リポソーム製剤は、抗がん剤や抗真菌剤を対象に実用化され、静脈内投与可能なターゲティング型DDS製剤としても開発研究が活発に進められている。しかしリポソームを薬物キャリアとして利用する場合、薬物の安定保持と標的部位における速やかな薬物放出という相反する機能が同時に製剤に求められるため、開発上多くの困難を伴う。申請者は、リポソーム製剤の薬物保持および放出に関する特性の制御を目的として、低分子モデル薬物として7-ヒドロキシスタウロスポリン (UCN-01)、ビンクリスチン、ドキソルビシン、高分子モデル薬物としてアニオン性デキストラン (DFA)、オリゴヌクレオチド (ODN)、siRNAを用いてリポソーム製剤を調製し、各製剤における血液中的薬物漏出機構を解析して、薬物保持能と放出特性に優れたリポソーム製剤の開発を行った。

低分子モデル薬物のUCN-01は、ヒト血漿中の α_1 -酸性糖蛋白 (hAGP) と非常に強く結合し薬効が低下するため、血液中的hAGPとの結合を抑制しかつ腫瘍細胞内への効率的な送達を可能とするリポソーム製剤の開発が望まれる。そこで、常法により平均粒子径100nmのUCN-01リポソームを調製したが、UCN-01はリポソームから速やかに漏出した。そこで、構成脂質や平均粒子径を調節した各種リポソームを調製し、薬物保持能と放出特性を評価した結果、脂質にHSPCを使用し粒子径を120nm以上にした場合に、hAGP添加ラット血漿中でのUCN-01の漏出およびhAGPとの結合が顕著に抑制され、放出特性に粒子径が関与することが明らかとなった。粒子径による漏出制御現象が、一般性のある現象であるかどうかを検証するため、他の低分子薬物についても同様の検討を行った結果、リポソームに安定に保持されるドキソルビシンでは粒子径に関わらずほとんど血漿中漏出は認められず、一方、漏出しやすいビンクリスチンでは、粒子径の増加とともに放出抑制が認められた。以上より、粒子径の調節による薬物の放出制御は、リポソーム膜を拡散により透過しやすい薬物に対してより効果的であることが明らかとなり、さらに、本現象の機構に関して検討を行った結果、電子顕微鏡観察、NMR測定、保

持容積から、粒子径の増加に伴う膜数の増加が確かめられ、膜数が放出制御に関与することが示された。

一方、アンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNAなどの核酸医薬は、低分子医薬、蛋白医薬に続く、第三の医薬として期待されているが、組織や細胞内移行性が極めて低いことから、実用化には組織移行性と細胞内移行性を同時に持つキャリアの開発が必要とされる。そこで、申請者は核酸医薬など高分子化合物に応用可能なリポソーム製剤の開発を試み、種々の検討の結果、血中での速やかな消失やリポソームからの薬物の脱離を防ぐため、複合体型リポソームをさらに中性脂質で被覆することを着想し、併せて標的組織に移行後被覆に使用した脂質が速やかに剥離し内部の薬物が放出されるように、被覆に用いる脂質として卵黄ホスファチジルコリンを選択した。モデルポリアニオンとして、DFAを使用し、被覆リポソームの調製方法を検討した結果、62.5%エタノール水溶液中ではDFA/カチオン脂質の複合体は溶解せず、被覆に使用した中性脂質のみ溶解することを見出し、本条件下で両者を混合した後蒸留水を添加し、エタノールの割合を徐々に低下させてエタノールが5%以下になったときに超遠心分離によりエタノールを除去、目的とするリポソームを得た。得られた製剤は、常法で調製されるリポソームと比較して、放出が抑制されラットで静脈内投与後高い血中滞留性が得られた。以上の結果より、本製剤がDFA/カチオン脂質の複合体を中性脂質で被覆した新規な構造を有し、高分子薬物のキャリアとして優れた薬物放出特性を有することが示された。次に、本調製方法がODNに適応できるかを検証した結果、定量的な薬物封入と緩徐なODNの放出が得られ、またマウスに静脈内投与した場合に、優れた血中滞留性と高い腫瘍移行性が得られた。また、siRNAを封入したリポソームはsiRNA単独投与では薬効を示さなかった腫瘍モデルに対し、強い抗腫瘍効果を示した。

以上、本研究では、リポソーム製剤の血液中における薬物放出制御に関してその機構の一端を明らかにし、また、低分子薬物と高分子薬物それぞれに対して製剤学的検討を行い、薬物放出特性を制御したリポソーム製剤の開発に成した。これらの知見は、今後のリポソーム製剤の開発に有用な基礎的情報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19年8月23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。