

(論文内容の要旨)

炎症は異物の進入や組織の障害などの生体組織にとって好ましくない刺激に対して免疫系が引き起こす局所的な防御反応であり、炎症の一連のプロセスにおいては、サイトカインやケモカインなどの炎症性メディエーターや種々の免疫細胞が複雑に関与する。炎症は病原体による外的侵襲のみならず、動脈硬化や癌、さらに膠原病などにおける自己に対する過剰な免疫応答においても起こるが、急性あるいは慢性炎症の何れにおいても、組織常在性マクロファージが重要な役割を果たしている。したがって、マクロファージの活性化を抑制するステロイドや転写因子に対するデコイ型核酸を細胞選択的にマクロファージにターゲティングすることのできるシステムの開発は、難治性の炎症性疾患に対する新しい治療法の開発に繋がるものと期待される。マクロファージには、厳密な基質特異性を有するマンノースレセプターが特異的に発現していることから、マンノースを認識素子とした標的指向化のアプローチが有望と思われる。一方、リポソームやエマルションなどの脂質ナノ微粒は異なった特性のもとに各種薬物を包含でき、薬物のキャリアとして応用の可能性が広い。しかし、組織常在性マクロファージを標的とした糖修飾脂質ナノ微粒子を開発するためには、製剤設計の最適化、投与経路の選択、ならびに疾患モデルによる治療評価を通じた総合的な開発が不可欠である。申請者は、マンノース修飾脂質ナノ微粒子を設計し、静脈内および気道内投与における体内動態解析と疾患モデルにおける抗炎症効果の評価を行って、その動態制御機能を総合的に評価した。

第 I 章 マンノース修飾エマルションの静脈内投与によるマクロファージ選択的ターゲティング機能の評価

全身性の炎症反応には、しばしば肝臓の常在性マクロファージである Kupffer 細胞の活性化が関与する。そこで、脂溶性薬物の送達に適する脂質ナノ微粒子の O/W エマルションに対して、薬品動態制御学分野で開発したマンノース修飾コレステロール誘導体 (Man-C4-Chol) を用いてマンノース修飾を行い、製剤特性の評価を行った。平均粒子径を約 110-130 nm に調製したマンノース修飾エマルションは、約 400 nm のエマルションに比べ保存時の平均粒子径の経時変化が小さく安定であった。マウスに静脈内投与後、マンノース修飾リポソームは速やかに血液中から消失し、大部分は Kupffer 細胞や肝類洞血管内皮細胞で構成される肝臓非実質細胞に集積した。さらに、この高い肝臓への取り込みは、過剰量のマンノース修飾タンパク質やリポソームの前投与により有意に阻害を受けたことから、マンノースレセプターを介した現象であることが示唆された。次に、ターゲティング機能の最適化を目指して、マクロファージによる取り込み及び内在化に及ぼすマンノース密度の影響を検討した結果、初代培養マウス腹腔マクロファージでは、Man-C4-Chol の含有重量比 5.0%以上でマンノースレセプターを介した取り込みが認められ、取り込み量は含有量に応じて増加した。同様に、マウスへ静脈内投与後の肝臓非実質細胞への取り込みは、マンノース密度の増大に伴い増加して Man-C4-Chol 含有比 5.0 および 7.5%で最も高い値が得られ、開発した製剤が肝臓非実質細胞への優れたターゲティング機能を持つことが証明された。

第 II 章 気道内投与による肺胞マクロファージ選択的薬物ターゲティングを目的としたマンノース修飾リポソームの開発

肺常在性マクロファージである肺胞マクロファージの活性化は、高い罹患率や死亡率を示す多くの肺疾患における炎症反応に関与しており、抗炎症治療の重要な標的となっている。本

章では、気道内投与による肺胞マクロファージへのターゲティングを目指して、デバイスでの噴射投与に適したマンノース修飾リポソームを選択し、ターゲティング型 DDS の製剤設計を行った。Man-C4-Chol を 5.0% の重量比で含有するマンノース修飾リポソームは、マンノースレセプターを介して肺胞マクロファージへ高く取り込まれ、この際、肺胞界面活性剤はマンノース修飾リポソームの安定性や取り込みに影響を及ぼさなかった。そこで、炎症治療に多用されるが全身性の副作用が問題となるステロイドを対象薬物に選び、気道内噴射におけるマンノース修飾リポソームの動態制御機能の評価と局所炎症反応に対する効果の解析を行った。デキサメタゾンの脂溶性プロドラッグであるパルミチン酸デキサメタゾンは、マンノース修飾リポソームに安定に封入され平均粒子径は約 100-110 nm であった。LPS 誘発性肺疾患ラットにおいて、パルミチン酸デキサメタゾン封入マンノース修飾リポソームの投与により、対照のデキサメタゾン水溶液あるいはパルミチン酸デキサメタゾン封入リポソーム投与と比較して、TNF α 、IL-1 β 等の炎症性サイトカイン、cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1、CINC-1 等のケモカインの産生、好中球浸潤、NF κ B 活性化、p38 MAP キナーゼの活性化などに対する有意な抑制効果が認められた。また、パルミチン酸デキサメタゾン封入リポソーム投与では、血液中への薬物移行は低く抑えられ、副作用の指標とされる血中グルコース濃度の上昇も認められなかった。

第 III 章 気道内投与による肺胞マクロファージ選択的ターゲティングを目的としたマンノース修飾カチオン性リポソーム/NF κ B デコイ複合体の開発

NF κ B は炎症メディエーターの発現に重要な役割を果たす転写因子であり、NF κ B に対するデコイ核酸 (NF κ B デコイ) による NF κ B 活性化の特異的抑制は、新しい抗炎症療法となり得ると考えられる。そこで、気道内投与による NF κ B デコイの肺胞マクロファージへの細胞選択的送達を目指して、マンノース修飾カチオン性リポソームの NF κ B デコイへの適用を試み製剤設計を行った。NF κ B デコイとマンノース修飾カチオン性リポソームを静電的相互作用に基づいて複合体化した製剤は平均粒子径約 90-110 nm で、比較的安定であり、気道内投与デバイスを用いてスプレー噴射をしても、NF κ B デコイ/マンノース修飾カチオン性リポソーム複合体の平均粒子径は影響を受けず、NF κ B デコイの分解も認められなかった。蛍光標識 NF κ B を用いた検討で、ラットへ気道内投与後 NF κ B/マンノース修飾カチオン性リポソーム複合体では、対照実験の NF κ B デコイ水溶液あるいは NF κ B デコイ/カチオン性リポソーム複合体投与の場合に比べ、肺胞マクロファージへの高い集積が確かめられた。また、LPS 誘発性肺疾患ラットにおいて、NF κ B デコイ/マンノース修飾カチオン性リポソーム複合体の投与は、NF κ B デコイ水溶液あるいは NF κ B デコイ/カチオン性リポソーム複合体投与に比べ、TNF α や IL-1 β 等の炎症性サイトカインおよび CINC-1 等のケモカインの産生および NF κ B 活性化に対して有意な抑制効果を示した。以上、マンノース修飾カチオン性リポソームを利用して NF κ B デコイを肺胞マクロファージに細胞選択的にターゲティングすることにより、NF κ B 活性化抑制に基づいた抗炎症効果を得ることに成功した。

以上、申請者はマンノースレセプター認識機構を利用して静脈内および気道内投与により組織常在性マクロファージに選択的かつ効率的に送達することの出来るターゲティング型製剤の開発を目指し、マンノース修飾脂質ナノ微粒子を設計、調製してその製剤特性を明らかにした。また、LPS 誘発性肺疾患動物を用いて、ステロイドや NF κ B デコイを封入したマンノース修飾脂質ナノ微粒子の気道内投与による肺胞マクロファージへのターゲティングにより優れた抗炎症効果を得ることに成功した。本研究で得られた知見は、ステロイドやデコイ型核酸を用いた有効かつ安全な抗炎症療法の開発に対して有用な基礎的情報を提供するものと思われる。

ふりがな
氏名

わっさな ういじやっかならん
Wassana
Wijagkanalan

(論文審査の結果の要旨)

炎症は異物の進入や組織の障害などの刺激に対して免疫系が引き起こす局所的な防御反応で、炎症性メディエーターや種々の免疫細胞が複雑に関与し、とりわけ組織常在性マクロファージが重要な役割を果たしている。したがって、マクロファージを標的とする標的指向化製剤の開発は、難治性の炎症性疾患に対する新しい治療法の開発に繋がるものと期待される。申請者は、マンノース修飾脂質ナノ微粒子を設計し、静脈内および気道内投与における体内動態解析と疾患モデルにおける抗炎症効果の評価を行って、その動態制御機能を総合的に評価した。

全身性の炎症反応には、しばしば肝臓の常在性マクロファージである **Kupffer** 細胞の活性化が関与する。そこで、脂溶性薬物の送達に適する脂質ナノ微粒子の **O/W** エマルションをマンノース修飾コレステロール誘導体 (**Man-C4-Chol**) を用いて修飾し、製剤特性の評価を行った。平均粒子径を約 **110-130 nm** に調製したマンノース修飾エマルションは、保存時に平均粒子径の経時変化が小さく安定で、マウスに静脈内投与後速やかに血液中から消失し、大部分は **Kupffer** 細胞や肝類洞血管内皮細胞で構成される肝臓非実質細胞に集積した。マクロファージによる取り込み及び内在化に及ぼすマンノース密度の影響を検討した結果、**Man-C4-Chol** の含有重量比 **5.0%** 以上でレセプターを介した取り込みが認められ、同様にマウスへ静脈内投与後の肝臓非実質細胞への取り込みも含有比 **5.0** および **7.5%** で最も高い値が得られた。次に、肺常在性マクロファージである肺胞マクロファージが多くの肺疾患における炎症反応に関与することから、気道内投与による肺胞マクロファージへの標的指向化を目指し、デバイスでの噴射投与に適したマンノース修飾リポソームを選択してターゲティング型 **DDS** の製剤設計を行った。**Man-C4-Chol** を **5.0%** の重量比で含有するマンノース修飾リポソームは、肺胞界面活性剤の影響を受けることなく肺胞マクロファージへ取り込まれ、パルミチン酸デキサメタゾン封入マンノース修飾リポソームの投与により、**LPS** 誘発性肺疾患ラットにおいて **TNF α** 、**IL-1 β** 等の炎症性サイトカイン、**cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1**、**CINC-1** 等のケモカインの産生、好中球浸潤、**NF κ B** 活性化、**p38 MAP** キナーゼの活性化などに対する有意な抑制効果が認められた。**NF κ B** は炎症メディエーターの発現に重要な役割を果たす転写因子であり、**NF κ B** に対するデコイ核酸 (**NF κ B** デコイ) による **NF κ B** 活性化の特異的抑制は、新しい抗炎症療法となり得ると考えられる。そこで、気道内投与による **NF κ B** デコイの肺胞マクロファージへの細胞選択的送達を目指して、マンノース修飾カチオン性リポソームの **NF κ B** デコイへの適用を試み製剤設計を行った。**NF κ B** デコイとマンノース修飾カチオン性リポソームを静電的相互作用に基づいて複合体化した製剤は平均粒子径約 **90-110 nm** で比較的安定であり、蛍光標識 **NF κ B** を用いた検討で、ラットへ気道内投与後肺胞マクロファージへの高い集積が認められ、また、**LPS** 誘発性肺疾患ラットにおいて、**NF κ B** デコイ/マンノース修飾カチオン性リポソーム複合体の投与は **TNF α** や **IL-1 β** 等の炎症性サイトカインお

よび CINC-1 等のケモカインの産生および NFκB 活性化に対して有意な抑制効果を示した

以上、申請者はマンノースレセプター認識機構を利用した静脈内および気道内投与による組織常在性マクロファージに対する標的指向化を目的にマンノース修飾脂質ナノ微粒子を設計、調製しその製剤特性を明らかにした。また、ステロイドやNFκBデコイを封入したマンノース修飾脂質ナノ微粒子の気道内投与による肺胞マクロファージへのターゲティングにより優れた抗炎症効果を得ることに成功した。本研究で得られた知見は、ステロイドやデコイ型核酸を用いた有効かつ安全な抗炎症療法の開発に対して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）の学位論文として価値あるものと認める。
さらに、平成21年2月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。