

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

タンパク質及び核酸含有製剤の高感度安定性評価法の
確立に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉岡 澄江

平成20（2008）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

タンパク質及び核酸含有製剤の高感度安定性評価法の確立に関する研究 --- 1

吉岡澄江

II. 分担研究報告

糖の遺伝子導入リポソーム製剤による導入効率に対する影響 ----- 18

米谷芳枝

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 24

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 28

タンパク質及び核酸含有製剤の高感度安定性評価法の確立に関する研究

主任研究者 吉岡澄江 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室室長

β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤や遺伝子導入リポソーム凍結乾燥製剤の保存安定性はスクロースによって著しく改善され、その作用は、タンパク質やDNA分子の局所的分子運動性を抑制する作用に起因することを明らかにした。また、遺伝子導入ナノ粒子製剤やリポソーム製剤の *in vitro* における遺伝子導入効率は糖の影響を受け、スクロースが最も効率が高いこと、さらに、*in vivo* における活性発現には、リポソーム/DNA複合体のサイズの制御が重要であることを明らかにした。

分担研究者

米谷芳枝 星薬科大学 医薬品化学研究所教授

協力研究者

阿曾幸男 国立衛研 薬品部主任研究官

A. 研究目的

近年、熱力学的に不安定なタンパク質や核酸などの高分子医薬に対し、高度な製剤学的工夫を施すことにより安定化を行い製剤化する試みが多数行われている。不安定な高分子医薬を医療の場で活用するためには、有効期間の間、その品質が保持されていることが不可欠であり、特に、高度な安定化を行った製剤は、安定性が製剤ロットによって変動する恐れがあり、製剤間の安定性の差を感度良く検出し、安定性試験を行ったロットと同等の安定性を有することを保証する必要がある。近年、我々や米国の研究グループの研究によって、高分子医薬品の安定性と製剤の分子運動性が密接に関連することが明らかになり、製剤の分子運動性に基づいて医薬品の安定性を予測できる可能性が示されつつある。また、保存安定性を支配する分子運動として、構造緩和を引き起こすスケールの大きな運動(分子の並進運動や分子全体の回転運動)に加え、それよりスケールの小さな運動の重要性が指摘されている。

本研究においては、タンパク質や核酸などの高分子医薬の製剤化法として **first choice** される凍

結乾燥製剤を安定化製剤のモデルとし、固体高分解能NMRや誘電緩和スペクトルなどを用い、分解に必要な分子運動性を高感度に検出すること、および、医薬品の分解にともなうナノワットレベルの極微小な熱を検出することによって、保存安定性と関連する医薬品の物理化学的な特性を明らかにし、安定性を予測する手法の開発を行う。また、遺伝子導入効率が高く、保存安定性に優れた非ウイルス性遺伝子導入製剤の製剤設計を行ない、得られた製剤に本研究で開発された安定性評価法を適用し、その有用性を確認することも目的とする。

本年度は、①マイクロ熱量計によって、 β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤が発生する熱を測定し、熱の時間変化を解析することにより構造緩和時間を算出し、製剤の運動性を明らかにした。また、緩和の終点における発熱量に基づく製剤の安定性評価の可能性について検討した。② ^{13}C や ^{15}N の固体高分解能NMRや従来よりも高周波領域の誘電緩和測定によって、安定性との関連が示唆されている比較的小さなスケールの運動性を高感度に測定する手法の検討を行った。③糖とプラスミドDNA(DNA)との相互作用をナノ粒子ベクターを用

いて、*in vitro*における遺伝子導入効率と、スクロースを用いて凍結乾燥再水和法によって調製したDNA封入リポソーム製剤の*in vivo*における遺伝子導入効率を調べ、保存安定性に優れた非ウイルス性遺伝子導入製剤の製剤設計の基礎的検討を行った。

B. 研究方法

(1)タンパク質凍結乾燥製剤の凝集速度を決める分子運動性とその制御

スクロース、トレハロースあるいはスタキオースを添加剤として用いて、 β -ガラクトシダーゼの凍結乾燥製剤(タンパク質:糖=2:1)を調製した。製剤を12%相対湿度(RH)および種々の温度条件に保存した後、 β -ガラクトシダーゼの凝集量をHP-SECで測定した。凍結乾燥製剤中の β -ガラクトシダーゼのカルボニル炭素の回転系スピン-格子緩和時間($T_{1\rho}$)を固体NMRで測定した。

製剤の発生する熱を等温マイクロ熱量計を用い20、25、40°Cで測定し、また、製剤の T_g を温度変調DSCで測定した。

タンパク質の分子運動性を ^{15}N -NMRによって測定できるかを明らかにするため、BSAをモデルとして検討した。

(2)遺伝子導入製剤の遺伝子導入効率に及ぼす糖の影響

ナノ粒子による遺伝子導入実験

OH-Chol脂質とTweem80からなるナノ粒子を修正エタノール注入法で調製した。糖としては、2糖類のマルトース、トレハロース、ラクトース、スクロース、セルビオースを用いた。細胞はPC-3、SKBr-3、L1210を用いた。DNAとしては、分泌性ルシフェラーゼをコードしたプラスミドDNA pCMV-Glucを用いた。ナノ粒子とDNAの(+/-)荷電比は3/1として0~50mM NaCl水溶液中で複合体(ナノ粒子/DNA)を調製した。このナノ粒子/DNAを50mM NaCl水溶液を用いたときは125 mM、その他のときは150 mMの各糖を添加した培地で3時間インキュベーションし、その後培地を糖無添加の培地に変えて、さらに48時間10%FBS含有培地でインキュベーションして、その後分泌されたルシフェラーゼ発現量をピカジーンを用いて測定した。

凍結乾燥再水和法調製リポソーム製剤による遺伝子導入実験

MHAPCとDOPE脂質がモル比で1:1のリポソーム(MHAPC-Lip)、または、MHAPCとDOPEとバイオ界面活性剤MEL-Aがモル比で1:1:0.5のリポソーム(MEL-A-MHAPC-Lip)を薄膜法で調製し、ルシフェラーゼをコードしたプラスミドDNA pCMV-lucを用いて、(+/-)荷電比3/1の複合体を調製した。この懸濁液に全脂質の5倍質量のスクロース、またはマルトースを添加した懸濁液(A)、その凍結乾燥製剤(B)およびそれを再水和した懸濁液(C)を用いて、A549細胞、またはマウスに気管内投与をして遺伝子導入効率を調べた。なお、(C)は1.55 mg粉末を60 μl 水で再水和した(333 ng DNA/ml)。凍結乾燥再水和前リポソームのサイズは、約200 nmであり、凍結乾燥再水和後は約1-5 μm であった。

遺伝子導入効率は、A、C懸濁液を1ウエルあたり2 μg DNAとなるように添加して、24時間10%FBS含有培地でインキュベーションし、ルシフェラーゼ発現量を測定した。Bでは、3.1 mg(40 μg DNA含有)の凍結乾燥製剤をマウスの気管に内径5 μm の注射針の注射筒を用いて肺に投与した。

遺伝子導入ナノ粒子製剤の細胞毒性

遺伝子発現時の各細胞に対する毒性は、WST8測定から評価した。

DNAの分子運動性に及ぼす糖の影響

サケ由来のDNAをモデルとし、スクロース、イソマルトース(IM)、イソマルトトリオース(IMT)を添加し、凍結乾燥した。凍結乾燥製剤中のDNAのデオキシリボース炭素について、実験室系および回転系スピン-格子緩和時間(T_1 および $T_{1\rho}$)を ^{13}C -NMRで測定した。

(倫理面への配慮)

用いた培養細胞は広く用いられているものであり、倫理面の問題はないと判断した。マウスを用いた実験については、動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験をおこなった。

C. 研究結果

(1)タンパク質凍結乾燥製剤の凝集速度を決め

る分子運動性とその制御

スクロース、トレハロースあるいはスタキオースを添加剤として含有する β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤は、いずれの製剤も保存中に一次速度式に従う β -ガラクトシダーゼの凝集を示した。凝集が10%進行するのに要する時間(t_{90})の温度依存性をFig. 1に示す。 T_g における t_{90} はスタキオース<トレハロース<スクロースの順に大きくなり、凝集速度は添加剤に大きく依存した。また、 T_g 以上の温度領域における t_{90} の温度依存性の傾きは T_g 以下にくらべ大きく、分子運動性が凝集速度に寄与することが示唆される。Fig. 2に β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の T_g とガラクトシダーゼのカルボニル炭素の T_{1p} を示す。 T_g は構造緩和を引き起こすスケールの大きな分子運動(分子の並進や回転運動など)の指標であり、 T_g が高い製剤ほど、ある温度における構造緩和を引き起こす分子運動性が低いことを意味する。それに対し T_{1p} は構造緩和よりもスケールの小さな分子運動の指標であり、 T_{1p} が大きいほどその分子運動性が低いことを意味する。凍結乾燥製剤の T_g はスクロース<トレハロース<スタキオースの順に高くなり、構造緩和を引き起こす分子運動性はスクロース>トレハロース>スタキオースの順に低くなることが示された。凍結乾燥製剤の T_{1p} はスタキオース<トレハロース<スクロースの順に大きく、 T_{1p} に反映されるスケールの小さな運動性はスタキオース>トレハロース>スクロースの順に小さくなることが示された。したがって、凝集速度は T_g で表される構造緩和を引き起こす分子運動性よりも、 T_{1p} に反映されるスケールの小さな運動性と密接に関連していることが示された。

構造緩和を引き起こす分子運動性の指標である構造緩和時間は T_g とフラジリティ m に依存するため、 T_g の知見のみから正確に評価することはできない。そこで、等温マイクロ熱量計によって、 β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤が構造

緩和するときに発生する微小な熱を観測し、その時間変化から構造緩和時間を算出した。Fig. 3にトレハロースを含有する β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤について観測されたHeat flowの測定例を示す。測定開始直後に大きな発熱がみられ、その後発熱は徐々に減少し一定の値に収束した。初期に観測されるHeat flowには、試料が測定条件と平衡になるときに発生する熱が含まれているため、0.5日以降の、徐々に減少するHeat flowの時間変化をもとに構造緩和時間を算出した。温度が高いほど緩和が速やかに進行するため、大きなHeat flowが観測された。0.5日以降のHeat flow(P)の時間変化を1式に従いフィットし、 τ_0 、 τ_1 、 β の値を算出した。ここで、 $\Delta H_r(\infty)$ の値は T_g と熱量測定温度 T および T_g における比熱変化 ΔC_p の値を用い、2式に従い算出した。Fig. 4に示すようにシンボルで示したPの実測値は1式に従い計算した実線に良くフィットした。フィッティングによって得られた τ_0 、 τ_1 、 β の値から3式に従い構造緩和時間 τ_D^β を算出し、その結果をFig. 5に示す。20~40℃における構造緩和時間はスクロース<トレハロース<スタキオースの順に大きくなり、 β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の構造緩和を引き起こす分子運動性がスクロース>トレハロース>スタキオースの順に小さくなることが確認され、 β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の凝集速度は構造緩和時間に反映される分子運動性よりも、 T_{1p} に反映される分子運動とより密接に関連することが明らかとなった。

Fig. 3に示すように、 β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の発生する熱は0にならず、一定の値に収束した。この熱はタンパク質の分解に基づく反応熱(P_k)と考えられた。Fig. 6に P_k に及ぼす添加剤の影響を示す。スクロースを添加した製剤の P_k は他の添加剤を加えた製剤に比べ有意に小さく、Fig. 1に示すように、スクロースを添加剤として用いた製剤が安定であることと対応す

$$P = 177.8 \frac{\Delta H_r(\infty)}{\tau_0} \left(1 + \frac{\beta t}{\tau_1}\right) \left(1 + \frac{t}{\tau_1}\right)^{\beta-2} \exp \left[-\left(\frac{t}{\tau_0}\right) \left(1 + \frac{t}{\tau_1}\right)^{\beta-1} \right] + P_k \quad (1)$$

$$\Delta H_r(\infty) = (T_g - T) \cdot \Delta C_p \quad (2)$$

$$\tau_D^\beta = (\tau_0)^\beta (\tau_1)^{\frac{(\beta-1)}{\beta}} \quad (3)$$

る結果が得られた。製剤の保存安定性を評価する上でも等温マイクロ熱量測定が有用であることがわかった。

β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の凝集速度が構造緩和の運動性ではなく、それよりもスケールが小さな $T_{1\rho}$ に反映される分子運動性とより密接に関連することが明らかになった。添加剤共存下に、そのようなタンパク質の運動性を選択的に検出するうえで、糖など添加剤のシグナルの妨害を受けない ^{15}N -NMR を用いることは有用と考えられる。 ^{15}N は天然存在比が低く、 ^{13}C にくらべ約 50 分の 1 の感度であり、 ^{15}N 標識化合物を用いて検討する例が多いが、本研究においては、非標識タンパク質を用いても、 ^{15}N -NMR によってタンパク質の運動性が測定可能かを検討した。Fig.7 (A)、(B) に ^{15}N 標識アラニンおよび非標識アラニンの ^{15}N -NMR スペクトルを示す。標識体は -348ppm にシグナルが観測され、4 回の積算で s/n 比の良いスペクトルが得られた。非標識体においては 1000 回の積算では十分な s/n 比が得られないが、-348ppm に標識体と同様なシグナルが得られ、非標識タンパク質についても ^{15}N -NMR 測定の可能性が示唆された。BSA をモデルとして測定した結果、10000 回の積算により、Fig.7(C) に示すように -270ppm 付近にアラニンに比べブロードなシグナルが観測された。タンパク質の含量が高い製剤においては、許容できる実験時間内に緩和時間の測定が可能であると考えられる。

(2) 遺伝子導入製剤の遺伝子導入効率に及ぼす糖の影響

ナノ粒子/DNA の遺伝子導入効率に対する糖の影響

ナノ粒子/DNA は細胞培地に各糖を添加して、2 種類の細胞で遺伝子導入効率を調べた (Fig.8)。どちらの細胞においても、スクロースの添加時に最も高い遺伝子発現が見られ、マルトース、トレハロース、ラクトースでは遺伝子発現の低下が見られた。このときの細胞毒性は各糖類で顕著な差が見られなかったことにより、遺伝子発現の差は細胞への導入効率の差によると推察された。

また、スクロースの添加において、複合体形成時の塩の影響を調べたところ、10~50mM NaCl でさらに発現が高くなることが明らかになった (Fig.9)。

遺伝子導入リポソーム製剤へ糖の影響

MHAPC-Lip、MEL-A-MHAPC-Lip/DNA 複合体とマルトース、またはスクロースを添加した懸濁液 A、または、その凍結乾燥再水和液 C と細胞とインキュベーションした結果、MEL-A-MHAPC-Lip にスクロースを添加した系では、凍結乾燥前 A に比べて約 10 倍高い遺伝子導入効率を示した (Fig.10)。さらに、この凍結乾燥製剤 B をマウスに気管内投与して、肺での遺伝子導入効率を調べたが、十分な発現はみられなかった。

DNA の分子運動性に及ぼす糖の影響

スクロースを添加した遺伝子導入リポソーム凍結乾燥製剤は IM や IMT を添加した製剤くらべて保存安定性に優れ、50°C、50 日保存後も遺伝子導入活性を有する。保存安定性に及ぼす糖の影響を DNA の運動性の観点から考察するために、サケ由来の DNA をモデルとして用い、 ^{13}C -NMR 緩和時間の測定を行った。DNA の ^{13}C -NMR スペクトルを Fig.11 に示す。15ppm 付近に見られるシグナルはチミンのメチル炭素、40ppm 付近のシグナルはデオキシリボースの CH_2 炭素、60 から 90ppm に見られるシグナルはデオキシリボースの酸素が結合した炭素、110ppm より低磁場に見られるシグナルは塩基の炭素のシグナルと考えられる。添加剤として用いる糖の炭素のシグナルは 60 から 100ppm に現れるので、糖と重ならない 40ppm 付近のシグナルを DNA の運動性の測定に用いた。

Fig.12 にデオキシリボース炭素のスピンの格子緩和過程のタイムコースを示す。上の図は MHz オーダーの運動性を反映する実験室座標系におけるスピンの格子緩和過程、下の図は数十 kHz オーダーの運動性を反映する回転座標系におけるスピンの格子緩和過程を示す。ばらつきが大きいものの、どちらの緩和過程の場合も DNA 単独に比べ糖を添加した場合、緩和が遅くなり、運動性が低下していることが明らかとなった。

Fig.13にDNAのデオキシリボース炭素の T_1 、 $T_{1\rho}$ に及ぼす糖の影響を示す。DNA単独にくらべ糖が存在すると T_1 、 $T_{1\rho}$ は増大し、その順序はスクロース>IM>IMTの順であった。遺伝子導入効率の保存安定性の最も良かったスクロース製剤がDNAの局所的な運動性は最も小さいことから、保存安定性とDNAの局所的な運動性に関連があると考えられる。

D. 考察

タンパク質凍結乾燥製剤の凝集速度を決める分子運動性とその制御

β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤について、等温マイクロ熱量測定により20~40℃において実測した構造緩和時間は凝集速度と関連しないことが示され、構造緩和時間に反映されるスケールの大きな分子運動よりも、 $T_{1\rho}$ に反映される分子運動性が凝集速度とより密接に関連することが明らかとなった。したがって、 $T_{1\rho}$ に反映される分子運動性を制御することにより、安定なタンパク質凍結乾燥製剤の設計につながるものと考えられる。また、等温マイクロ熱量測定により観測されるPkの値は β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の凝集速度と関連することが明らかとなり、等温マイクロ熱量測定は不安定な高分子医薬品製剤の保存安定性を高感度に評価できる有用な手法であることが明らかになった。今後、 $T_{1\rho}$ に反映される運動の実態を誘電緩和時間などの測定によって明らかにする必要があると考えられる。

遺伝子導入製剤の遺伝子導入効率に及ぼす糖の影響

遺伝子導入用リポソームベクターでは、 T_g の低いスクロースを添加して凍結乾燥再水和時すると遺伝子導入効率が高くなり、糖はリポソームの安定性よりもDNAの局所の安定性に寄与している可能性があることを報告した。

もし、糖がDNAの局所の安定性に寄与しているならば、リポソームでなく、ナノ粒子によっても同じように遺伝子導入効率が上昇するはずで

ある。そこで、本研究は、5種類の2糖がナノ粒子/DNAの遺伝子導入効率に及ぼす影響について調べた。その結果、リポソームの凍結乾燥再水和時と同様に、スクロースの培地への添加によって遺伝子導入効率が高くなった。この結果より、スクロースは複合体中のDNAや、複合体の分散性などに大きな影響を与えることが示唆された。また、複合体形成時の塩濃度が遺伝子導入効率に大きく寄与することも明らかとなった。スクロースは、複合体中のDNAと局所的な水素結合等の相互作用によって安定性に寄与している可能性が示唆された。

スクロースを添加した凍結乾燥再水和法で調製した遺伝子封入りリポソーム製剤をマウスの肺に投与して遺伝子導入効率を調べた結果、十分な発現を得ることはできなかった。これはリポソームのサイズが1ミクロン以上の大きさになったために、粘膜透過性が低下したためと推察された。

スクロースを添加した遺伝子導入リポソーム製剤はIMやIMTより保存安定性に優れており、DNA炭素のNMR緩和時間の測定から、スクロースが凍結乾燥製剤中のDNAの運動性を強く抑制することが示され、DNAの運動性と保存安定性が関連することが明らかになった。今後、リポソームの運動性に対する糖の影響を明らかにすることも必要であると考えられる。

E. 結論

(1)タンパク質凍結乾燥製剤の凝集速度は構造緩和時間で表されるスケールの大きな分子運動性よりも、 $T_{1\rho}$ に反映されるスケールの小さな運動性と密接に関連していることが明らかになった。

(2)等温マイクロ熱量測定は不安定な高分子医薬品製剤の保存安定性を高感度に評価できる有用な手法であることが明らかになった。

(3)遺伝子導入ナノ粒子製剤やリポソーム製剤のin vitroにおける遺伝子導入効率は糖の影響を受け、スクロースが最も効率が高いことが明らかとなった。

(4) 遺伝子導入用リポソーム製剤の *in vivo* で
の活性発現には、リポソーム/DNA 複合体のサイ
ズの制御が重要であることが明らかとなった。

(5) DNA の運動性を抑制する効果の大きい糖
を添加した遺伝子導入リポソーム製剤は保存安
定性に優れていることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshioka, S., Aso, Y., Kawanishi, T.:
Wide-Ranging Molecular Mobilities of Water in
Active Pharmaceutical Ingredient (API)
Hydrates as Determined by NMR Relaxation
Times. *J Pharm. Sci.*, (2008) in press.
- 2) Maitani Y., Aso Y., Yamada A., Yoshioka S.:
Effect of sugars on storage stability of
lyophilized liposome/DNA complexes with high
transfection efficiency. *Int. J. Pharm.*, (2008) in
press.
- 3) 吉岡澄江、阿曾幸男、川西徹:平成18年度「日本
薬局方の試験法に関する研究」研究報告書—水分
吸着曲線の解析による局方収載添加剤の吸湿性に
関する研究—医薬品研究, (2008) **39**, 51-56.
- 4) Yoshioka, S., Miyazaki, T., Aso, Y., Kawanishi,
T.: Significance of Local Mobility in
Aggregation of β -Galactosidase Lyophilized
with Trehalose, Sucrose or Stachyose. *Pharm.*
Res., (2007) **24**, 1660-1667.
- 5) 吉岡澄江、阿曾幸男、川西徹:平成17年度「日本
薬局方の試験法に関する研究」研究報告書—水分
吸着曲線の解析による局方収載添加剤の吸湿性に
関する研究— 医薬品研究, (2007) **38**, 228-234.
- 6) Yoshioka S., Aso Y.: Correlations between
Molecular Mobility and Chemical Stability
During Storage of Amorphous Pharmaceuticals.
J. Pharm. Sci., (2007) **96**, 960-981.
- 7) Miyazaki T., Yoshioka S., Aso, Y., Kawanishi
T.: Crystallization rate of amorphous nifedipine
analogues unrelated to the glass transition
temperature. *Int. J. Pharm.*, (2007) **336**,
191-195.
- 8) Aso Y., Yoshioka S., Miyazaki T., Kawanishi T.,
Tanaka K., Kitamura S., Takakura A., Hayashi
T., Muranushi N.: Miscibility of nifedipine and
hydrophilic polymers as measured by $^1\text{H-NMR}$
spin-lattice relaxation. *Chem. Pharm. Bull.*,
(2007) **55**, 1227-1231.
- 9) Y. Maitani, Y. Aso, A. Yamada, S. Yoshioka.
Effect of sugars on storage stability of
lyophilized liposome /DNA complexes with
high transfection efficiency, *Int. J. Pharm.*, in
press.
- 10) A. Hayama, T. Yamamoto, M. Yokoyama, K.
Kawano, Y. Hattori, Y. Maitani. Polymeric
micelles modified by folate-PEG-lipid for
targeted drug delivery to cancer cells in vitro.
J. Nanosci. Nanotechnol., (2007) **8 (5)**, 1-6.
- 11) M. Furuhashi, R. Danev, K. Nagayama, Y.
Yamada, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori,
Y. Maitani. Decaarginine-PEG-artificial
lipid/DNA complex for gene delivery:
nanostructure and transfection efficiency, *J.*
Nanosci. Nanotechnol., (2008) **8 (6)**, 1-8 .
- 12) N. Takahashi, Y. Watanabe, Y. Maitani, T.
Yamauchi, K. Higashiyama, T. Ohba.
p-Dodecylaminophenol derived from the
synthetic retinoid, fenretinide: Antitumor
efficacy in vitro and in vivo against human
prostate cancer and mechanism of action. *Int.*
J. Cancer, (2008) **122**, 689-698.
- 13) H.L. Ma, X.R. Qi, W.X. Ding, Y. Maitani, T.
Nagai. Magnetic targeting after femoral
artery administration and biocompatibility
assessment of superparamagnetic iron oxide
nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A*
(2007) **84**, 598-606.
- 14) W. Ding, Y. Hattori, Y. Maitani.
Hydroxyethylated cationic cholesterol

- derivatives in liposome vectors promote gene expression in the lung. *Int. J. Pharm.*, accepted.
- 15) M. Fukushima, Y. Hattori, H. Tsukada, K. Koga, E. Kajiwara, K. Kawano, T. Kobayashi, K. Kamata, Y. Maitani. Adiponectin gene therapy of streptozotocin-induced diabetic mice using hydrodynamic injection. *J. Gene Med.*, **9**: 976-985 (2007).
- 16) Y. Hattori, Y. Maitani.
Low-molecular-weight polyethylenimine enhanced gene transfer by cationic cholesterol-based nanoparticle vector, *Biol. Pharm. Bull.*, **30(9)** 1773-1778 (2007).
- 17) Y. Maitani, S. Igarashi, M. Sato, Y. Hattori. Cationic liposome (DC-Chol/DOPE=1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression, *Int. J. Pharm.*, **342**: 33-39 (2007).
- 18) Y. Hattori, W. Ding, Y. Maitani. Highly efficient cationic hydroxyethylated cholesterol-based nanoparticle-mediated gene transfer in vivo and in vitro in prostate carcinoma PC-3 cells, *J. Control. Release*, **120**: 122-130 (2007).
- 19) E. Kajiwara, K. Kawano, Y. Hattori, M. Fukushima, K. Hayashi, Y. Maitani. Long-circulating liposome-encapsulated ganciclovir enhances the efficacy of HSV-TK suicide gene therapy, *J. Control. Release*, **120**: 104-110 (2007).
- 20) Y. Hattori, M. Fukushima and Y. Maitani. Non-viral delivery of connexin 43 gene with histone deacetylase inhibitor to human nasopharyngeal tumor cells enhances gene expression and inhibits in vivo tumor growth, *Int. J. Oncol.*, **30**: 1427- 1439 (2007).
- 21) Y. Zhang, X.R. Qi, Y. Gao, L. Wei. Y. Maitani, T. Nagai. Mechanisms of co-modified liver-targeting liposomes as gene delivery carriers based on cellular uptake and antigens inhibition effect. *J. Control. Release*, **117**: 281-290 (2007).
- 22) Y. Hattori and Y. Maitani, DNA/lipid complex incorporated with fibronectin to cell adhesion enhances transfection efficiency in prostate cancer cells and xenografts. *Biol. Pharm. Bull.* **30**: 603-607 (2007).
- 23) M. Fukushima, Y. Hattori, T. Yoshizawa, Y. Maitani. Combination of non-viral connexin 43 gene therapy and docetaxel inhibits the growth of human prostate cancer in mice. *International Journal of Oncology*, **30**:225-231 (2007).
2. 学会発表
- 1) 吉岡澄江, 阿曾幸男, 大迫 勉, 川西 徹:
NMR 緩和時間に反映される医薬品水和物中の水分子の運動性. 日本薬学会第 128 年会 (2008. 3).
- 2) 阿曾幸男, 吉岡澄江、川西 徹: デキストランゲル生成過程における β -ガラクトシダーゼおよびインスリンの活性に及ぼす γ 線照射の影響とデキストランによる失活抑制作用. 日本薬学会第 128 年会 (2008. 3).
- 3) Yoshioka, S., Miyazaki T., Aso, Y., Kawanishi T.: Significance of Local and Global Mobility in Aggregation of Lyophilized- β -Galactosidase. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2007.11).
- 4) Aso, Y., Miyazaki T., Yoshioka, S., Kawanishi T.: A comparison of the physical stability of amorphous nitrendipine and its enantiomer, American Association of Pharmaceutical Scientists. Annual Meeting (2007.11).
- 5) 阿曾幸男, 吉岡澄江, 川西 徹: ^{19}F -NMR による非晶質フルフェナム酸の結晶化過程の解析, 第 46 回 NMR 討論会 (2007.9).
- 6) 吉岡澄江, 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 川西 徹: タンパク質凍結乾燥製剤の凝集速度に及ぼす局所的分子運動性の影響. 日本薬剤学会第 22 年会 (2007.5).
- 7) 阿曾幸男, 吉岡澄江、宮崎玉樹、川西 徹: 非

- 晶質ジヒドロピリジン系薬物の物理的安定性と α および β 緩和時間で表される分子運動性との関係. 日本薬剤学会第 22 年会 (2007.5).
- 8) 吉岡澄江, 阿曾幸男, 川西 徹: 固体分散体中のアスピリンの拡散速度と化学反応性に関する分子動学的検討. 日本薬学会第 127 年会 (2007. 3).
- 9) 阿曾幸男, 吉岡澄江, 川西 徹: ^{13}C -NMR 緩和時間によるデキストランゲル中の β ガラク トシダーゼの分子運動性の測定. 日本薬学会第 127 年会 (2007. 3).
- 10) 羽山明宏, 山本竜広, 横山昌幸, 川野久美, 米谷芳枝, カンプトテシン封入高分子ミセルへの新規葉酸修飾法の検討と *in vivo* 評価. 日本薬学会第 127 年会, 2007.3.28-30
- 11) 山田敦史, 川野久美, 服部喜之, 米谷芳枝, ドキソルビシン封入葉酸修飾リポソームの抗腫瘍効果における PEG 脂質の影響. 日本薬学会第 127 年会, 2007.3.28-30
- 12) 吉澤隆, 服部喜之, 米谷芳枝, 葉酸受容体選択性 siRNA 遺伝子ベクターの開発. 日本薬学会第 127 年会, 2007.3.28-30
- 13) 藤田堯志, 古幡昌彦, 服部喜之, 川上宏子, 戸澗一孔, 米谷芳枝, *In vivo* 用オリゴアルギニン脂質ベクターの開発. 日本薬学会第 127 年会, 2007.3.28-30
- 14) 服部喜之, 丁武孝, 米谷芳枝, 正電荷コレステロールナノ粒子を用いた前立腺癌への遺伝子導入. 日本薬剤学会第 22 年会, 2007.5.21-23
- 15) 古幡昌彦, 川上宏子, 戸澗一孔, 服部喜之, 米谷芳枝, オリゴアルギニンミセル/DNA 複合体の構造と遺伝子導入効率. 日本薬剤学会第 22 年会, 2007.5.21-23
- 16) 丁武孝, 服部喜之, 東山公男, 米谷芳枝, Cationic Cholesterol Derivatives for Gene Delivery into the Lung. 日本薬剤学会第 22 年会, 2007.5.21-23
- 17) 施力, 服部喜之, 川野久美, 米谷芳枝, CPT-11 封入 PEG 修飾リポソームとカルボキシエステラーゼの腫瘍内補充による SN38 濃度の変化. 日本薬剤学会第 22 年会, 2007.5.21-23
- 18) 小野瀬絵里, 川野久美, 服部喜之, 米谷芳枝, ミトキサントロン封入葉酸修飾リポソームの膜流動性と抗腫瘍効果. 日本薬剤学会第 22 年会, 2007.5.21-23
- 19) 服部喜之, 米谷芳枝, 正電荷コレステロールナノ粒子による plasmidDNA と短鎖 2 本鎖 RNA の前立腺癌への遺伝子導入. 第 23 回日本 DDS 学会, 2007.6.14-15
- 20) 山田敦史, 阿曾幸男, 吉岡澄江, 米谷, 芳枝凍結乾燥再水和調製法による遺伝子封入リポソーム製剤の安定性に対する糖の影響. 第 23 回日本 DDS 学会, 2007.6.14-15
- 21) 日置敦子, 川野久美, 服部喜之, 米谷芳枝, 血中滞留性リポソームの *in vitro* 放出性評価. 第 51 回日本薬学会関東支部大会, 2007.10.6
- 22) 勢子祐貴, 羽山明宏, 山本竜広, 横山昌幸, 小野瀬絵里, 川野久美, 服部喜之, 米谷芳枝, 新規葉酸修飾カンプトテシン封入高分子ミセルの体内分布と抗腫瘍効果. 第 51 回日本薬学会関東支部大会, 2007.10.6
- 23) 古賀公子, 服部喜之, 米谷芳枝, 悪性内分泌腫瘍の RET を標的とした siRNA による遺伝子治療. 第 51 回日本薬学会関東支部大会, 2007.10.6
- 24) 萩原彩子, 服部喜之, 米谷芳枝, 癌細胞への siRNA 送達用脂質ナノ粒子の開発. 第 51 回日本薬学会関東支部大会, 2007.10.6

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

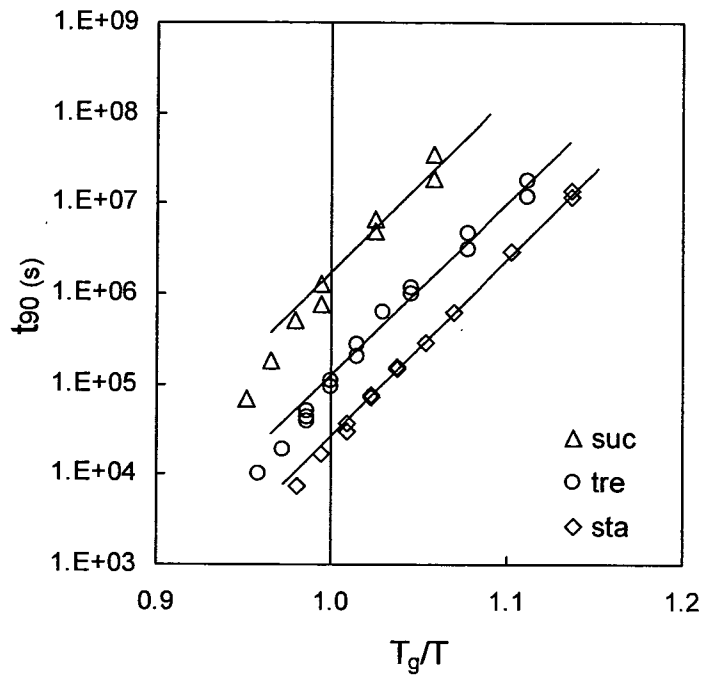


Fig.1. t_{90} for the aggregation of β -GA freeze-dried with sugars. Sugar fraction:0.33 w/w, 12%RH.

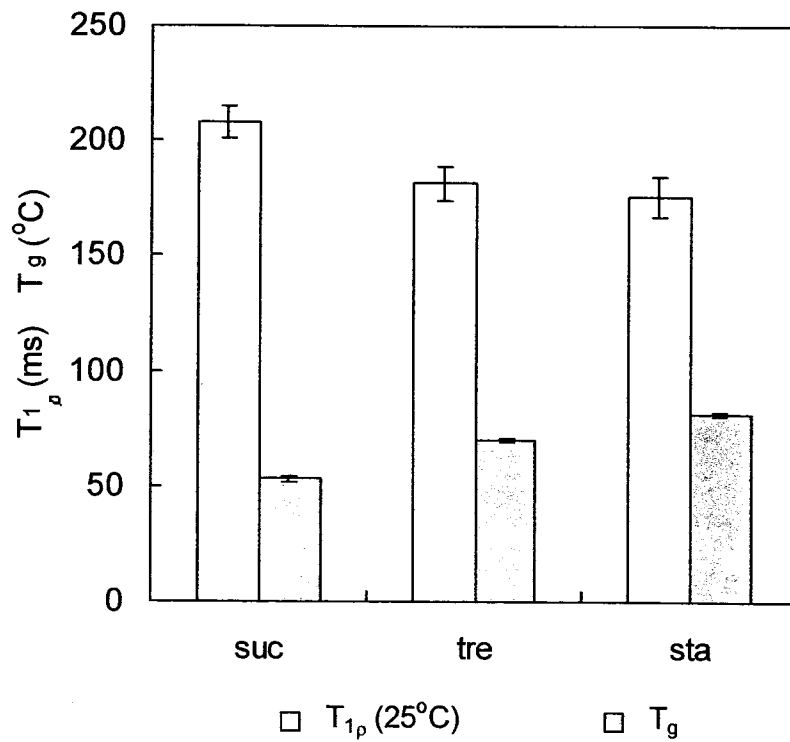


Fig.2. T_{1p} and T_g of β -GA freeze-dried with sugars. Sugar fraction: 0.33 w/w, 12%RH.

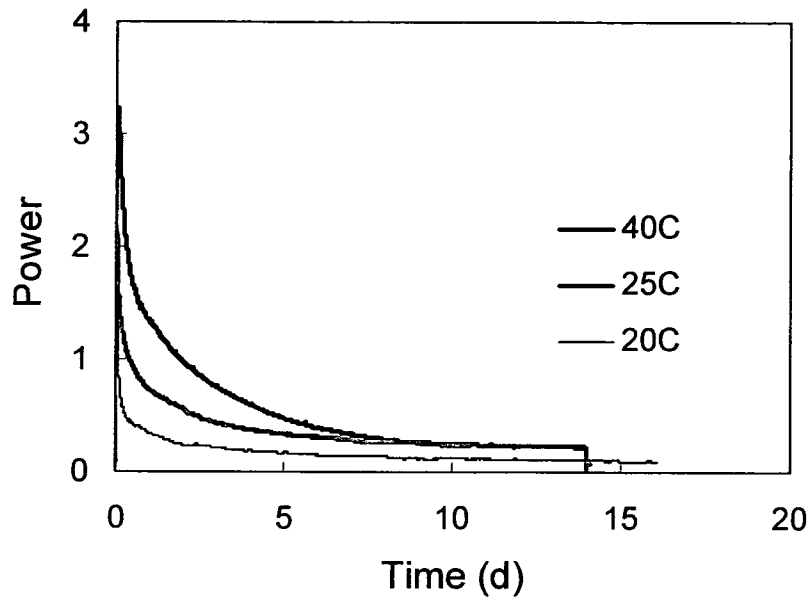


Fig.3. Isothermal microcalorimetry for β -GA-trehalose formulation.
 Sugar fraction: 0.33 w/w

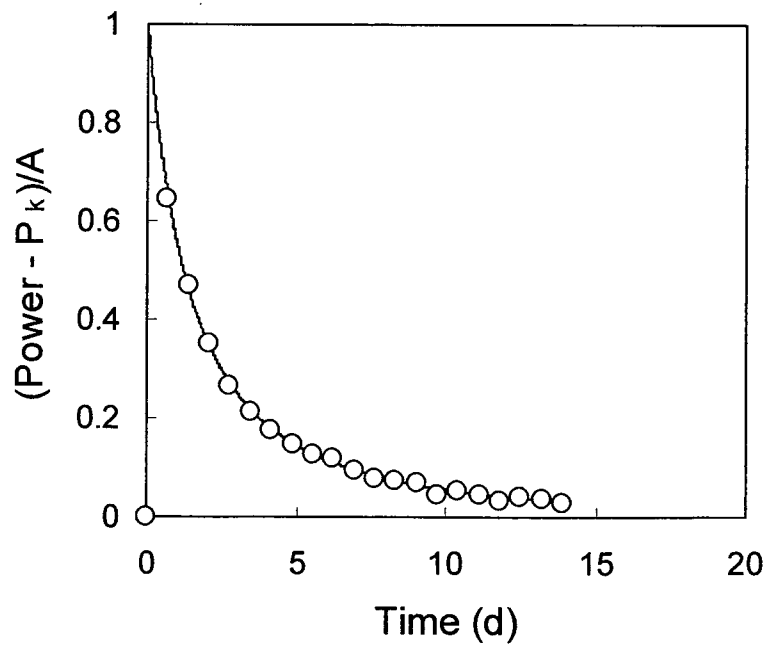


Fig.4. Curve-fitting of the power for β -GA-trehalose formulation at 25°C according to Eq. 1.

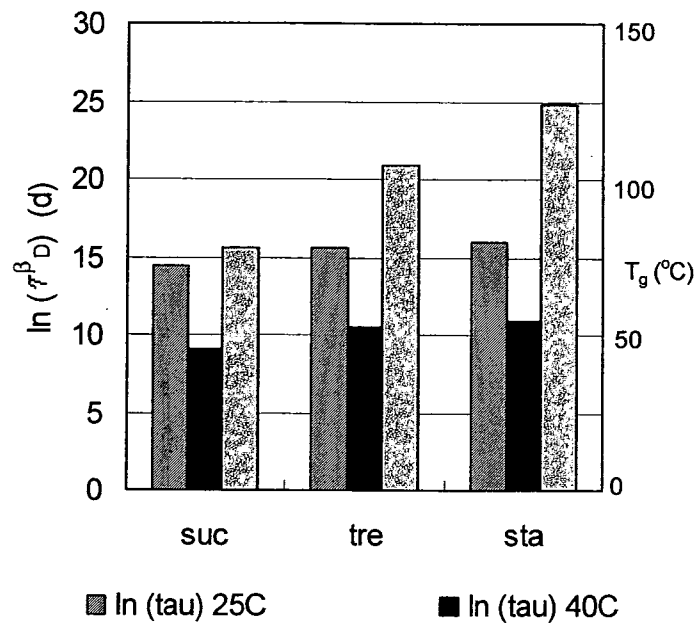


Fig.5. τ^β and T_g of β -GA-sugar formulations.
Sugar fraction: 0.33 w/w

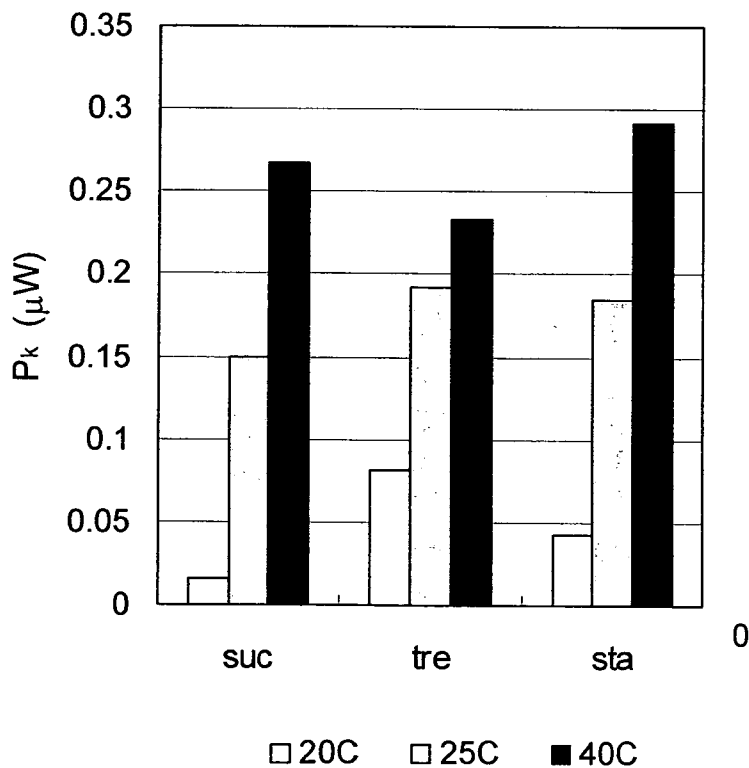


Fig.6. P_k for β -GA-sugar formulations determined by isothermal microcalorimetry.
Sugar fraction: 0.33 w/w

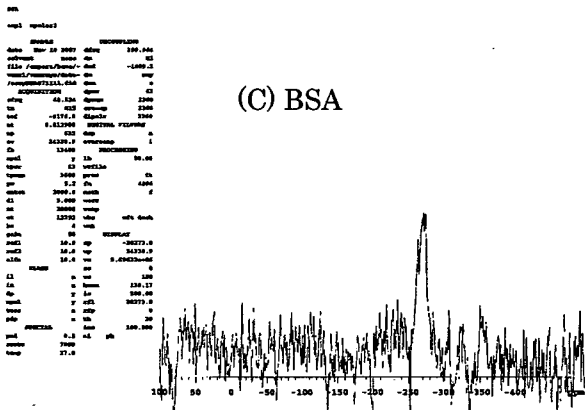
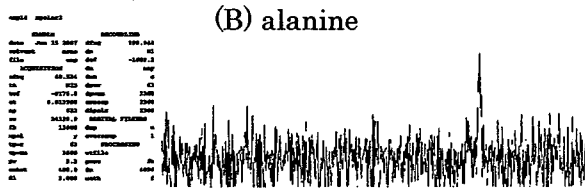
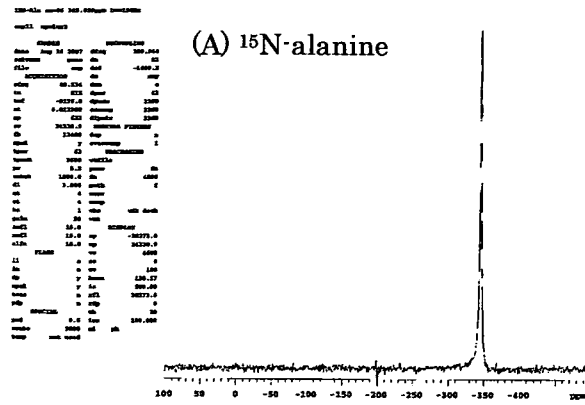


Fig.7 ^{15}N -NMR spectra of alanine and BSA

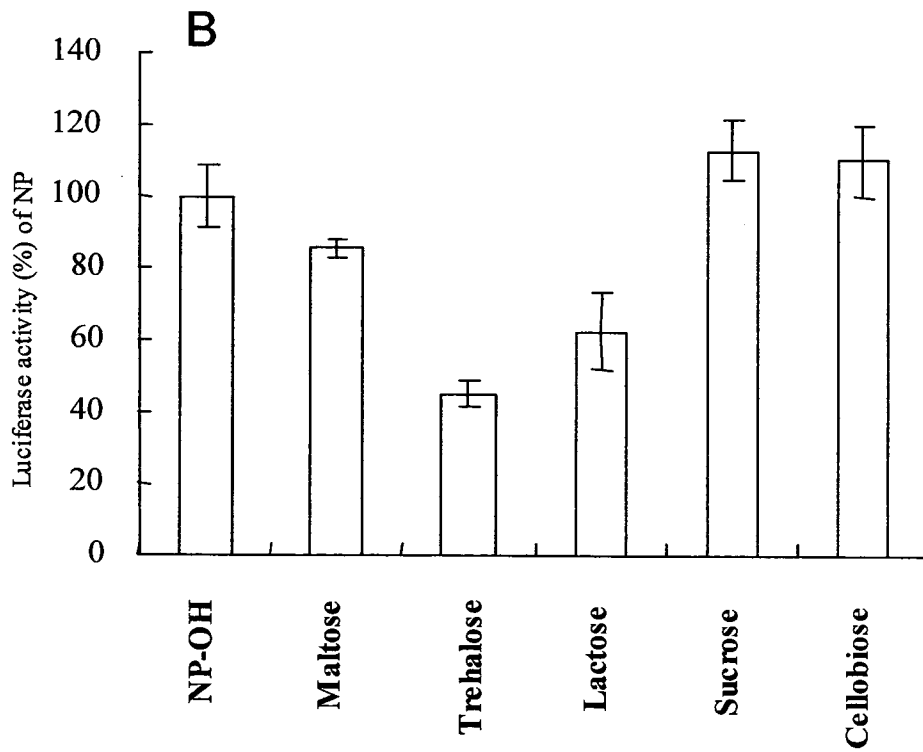
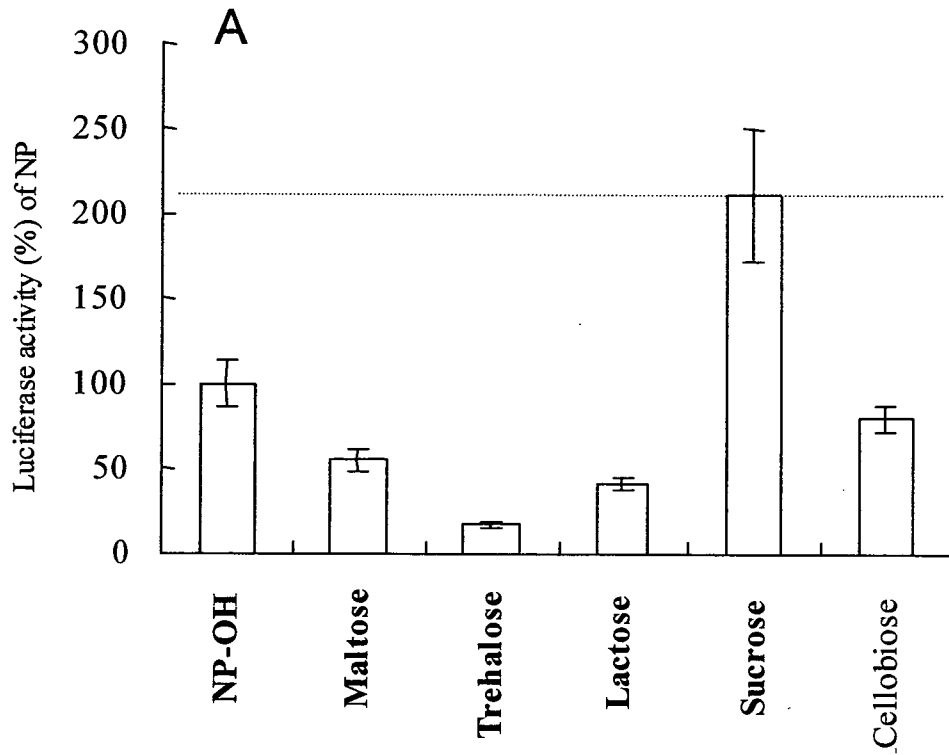


Fig.8 Effect of sugars in medium on gene expression of nanoparticle (NP-OH)

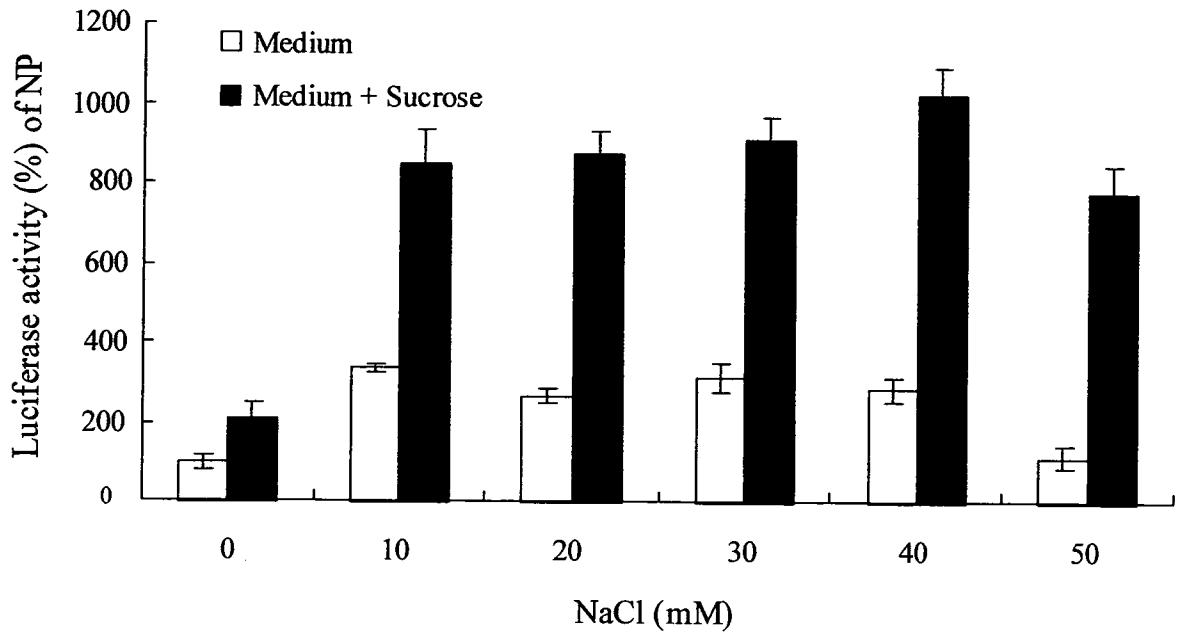


Fig. 9 Effect of NaCl concentration in medium with sucrose on gene expression of nanoparticle (NP-OH) vector in L1210 cellsvector in PC-3(A) and SKBr3 (B) cells

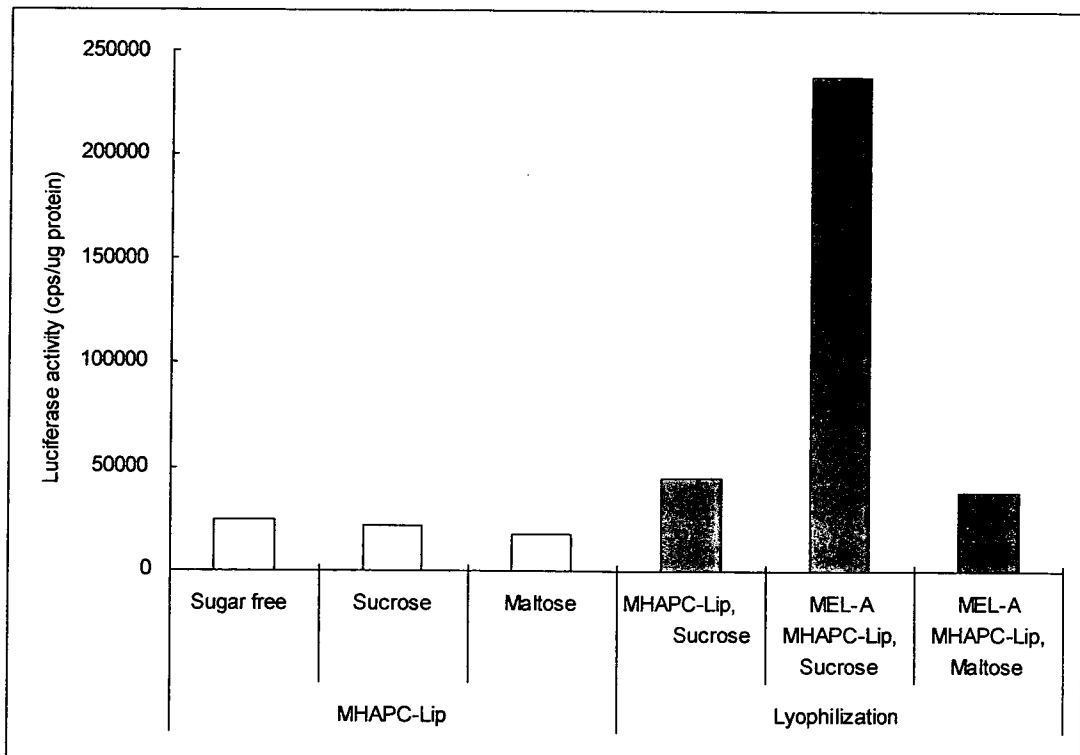


Fig10 Effect of sugars on gene expression of liposome and rehydration of lyophilized liposome vectors in A549 cells

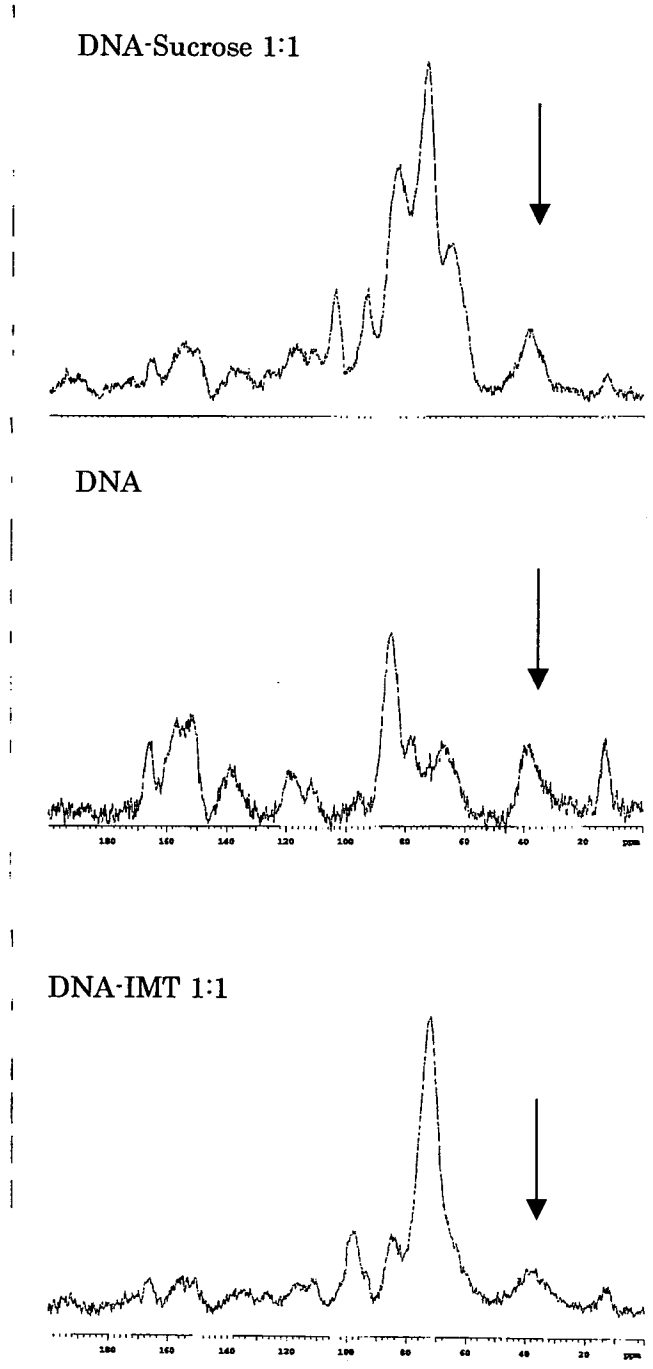


Fig.11 ^{13}C -NMR spectra of salmon DNA

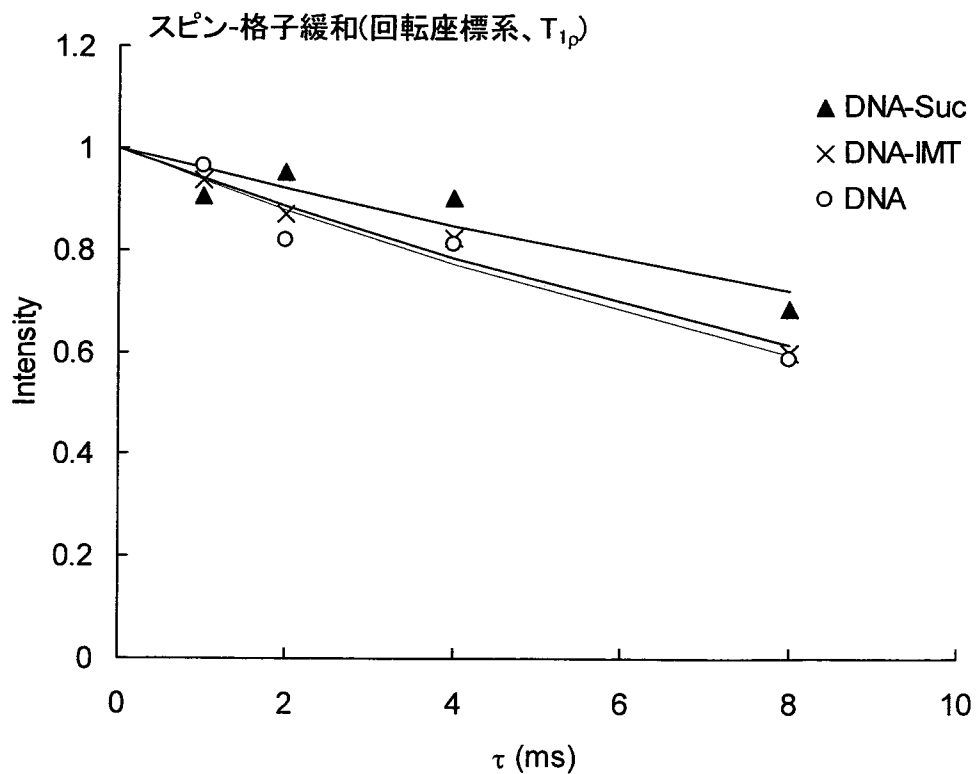
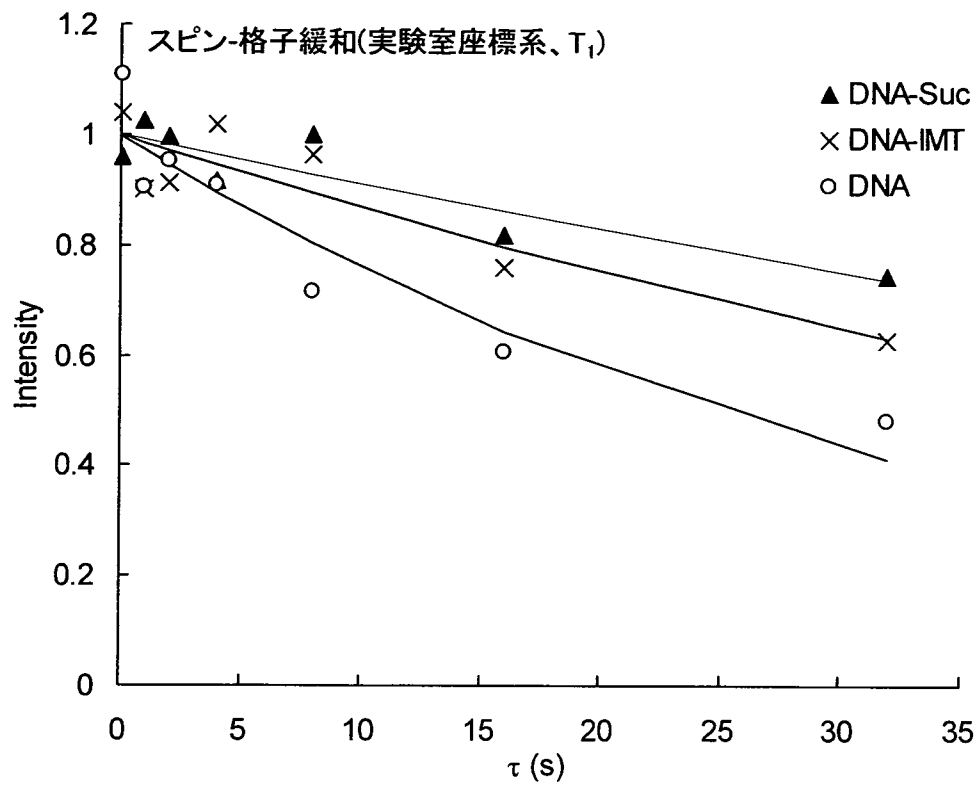


Fig.12 Spin-lattice relaxation of DNA deoxyribose carbon.

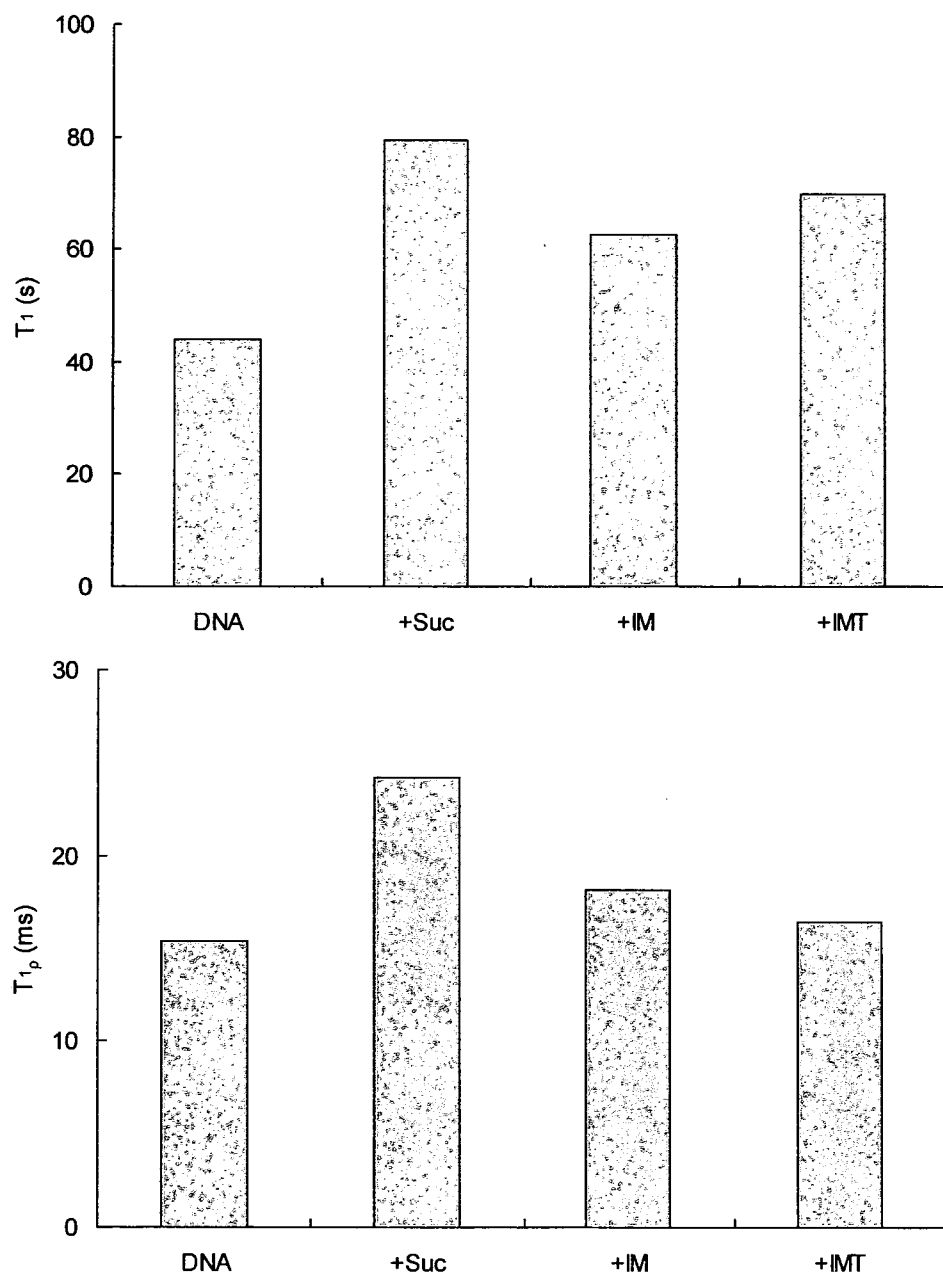


Fig.13 Effects of sugars on T_1 and T_{1p} of DNA deoxyribose carbon.

糖の遺伝子導入リポソーム製剤による導入効率に対する影響

分担研究者 米谷芳枝 星薬科大学 医薬品化学研究所 教授

これまでの遺伝子導入リポソーム製剤は、DNA と混合したときのリポソーム/DNA 複合体の凝集や遺伝子導入効率の低下が問題となっている。凍結乾燥再水和法で調製した遺伝子導入製剤は、凍結時に添加する糖の種類によって遺伝子導入効率が異なり、シュクロースを用いた製剤は *in vitro* で最も高い遺伝子導入効率を示した。しかし、この製剤のマウスへの気管内投与による肺での遺伝子発現は低い値となった。また、シュクロースは複合体中の DNA や、複合体の分散性に大きな影響を与えることも示唆された。本研究の結果より、*in vivo* 用遺伝子導入用リポソーム製剤には、リポソーム/DNA 複合体のサイズの制御が重要であることが示唆された。

A. 研究目的

現在、遺伝子導入用リポソームベクターはリポソーム懸濁液の状態であり、遺伝子との複合体は用時調製されている。遺伝子封入製剤は未だ市販されていない。これは、DNA は熱力学的に不安定で凝集等の物性変化を起こしやすいため、安定な遺伝子封入リポソーム製剤が調製できないためである。使用の簡便性や品質管理、大量生産などから、安定性の高い遺伝子封入製剤が望まれている。

凍結乾燥においては、トレハロースを代表とするガラス転移温度(Tg)の高い糖類がリポソームの内外液に存在すると、リポソーム凍結乾燥製剤の安定性を維持することが知られている。一方、リポソームへの薬物封入法の一つである凍結乾燥再水和法では、少量の糖類を外液に添加するとリポソーム膜が一時的に乱され、サイズの小さい薬物封入リポソームが調製できることが報告されている。

これまでに Tg の異なる 3 種類の糖と凍結乾燥再水和法によって遺伝子封入リポソーム製剤を調製して、糖の遺伝子発現効率に及ぼす影響を調べた結果、シュクロースを用いた製剤が最も高い遺伝子発現効率を示し、50℃で 50 日間保存にお

いても、用時調製リポソームベクターとほぼ同等の高い遺伝子導入効率を示す安定な製剤であることを明らかにした。

本年度は(1)糖とプラスミド DNA (DNA)との相互作用をナノ粒子ベクターを用いて、*in vitro*での遺伝子導入効率と、(2)シュクロースを用いて凍結乾燥再水和法によって調製した DNA 封入リポソーム製剤の *in vivo*での遺伝子導入効率を調べた。

B. 研究方法

ナノ粒子による遺伝子導入実験

OH-Chol 脂質と Tween80 からなるナノ粒子を修正エタノール注入法で調製した。糖としては、2 糖類のマルトース、トレハロース、ラクトース、シュクロース、セルビオースを用いた。細胞は PC-3、SKBr-3、L1210 を用いた。DNA としては、分泌性ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA pCMV-Gluc を用いた。ナノ粒子と DNA の(+/-)荷電比は 3/1 として 0~50mM NaCl 水溶液中で複合体(ナノ粒子/DNA)を調製した。このナノ粒子/DNA に 50mM NaCl 水溶液を用いたときは 125 mM、その他のときは 150 mM の各糖を添加した