

200940007A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュ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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿曾 幸男

平成22(2010)年 4月

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿曾 幸男

平成22（2010）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
阿曾幸男		

II. 分担研究報告

プラスミドDNA/リポソームの表面状態と遺伝子発現効率	-----	13
米谷芳枝		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	20
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	23
-----------------	-------	----

## 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

研究代表者 阿曾幸男 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室長

モデルタンパク質として $\beta$ ガラクトシダーゼを用い、スクロースなどの6種類の糖類を添加剤として用いた凍結乾燥製剤について酵素活性の変化をもとに40°Cおよび50°Cにおける保存安定性を明らかにした。失活速度とタンパク質カルボニル炭素のNMR緩和時間との間に相関がみられ、NMR緩和時間はタンパク質凍結乾燥製剤の保存安定性の予測に有用であることが示唆された。また、非イオン性界面活性剤としてmannosylerythritol (MEL-A)とTween 80を用いて表面改質したりポソームとDNAとの複合体(リポプレックス)の細胞取り込みに対する影響について検討した。誘電緩和測定の結果、リポプレックスの表面の水和状態においては、Tween 80はMEL-Aより水和させることが明らかになった。この評価法は、遺伝子導入用リポソームベクターの細胞内取り込みの予測に有用となることが示唆された。

### 研究分担者

米谷芳枝 星薬科大学 医薬品化学研究所教授

協力研究者

宮崎玉樹 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糖類を添加剤として用いて調製した $\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤について、製剤

中のガラクトシダーゼの  $^{13}\text{C}$ -NMR 緩和時間を  $40^\circ\text{C}$  および  $50^\circ\text{C}$  において測定し、これらの温度における保存安定性との関連を検討した。②非ウイルス性遺伝子導入製剤に関しては、前年度の検討によって遺伝子導入効率と細胞への取り込みに対する影響を及ぼすことが明らかになったバイオ界面活性剤である mannosylerythritol (MEL-A) や Tween 80 について (Fig. 1)、リポプレックスの表面の水和状態に焦点をあて、リポソームに MEL-A、または Tween80 を添加し、リポソームとそのリポプレックスの表面水和状態を蛍光標識による測定と水の誘電緩和測定の2つの方法から検討を行った。

## B. 研究方法

### (1) NMR 緩和時間によって表される凍結乾燥製剤中の $\beta$ -ガラクトシダーゼの分子運動性と安定性との関連

スクロース、トレハロース、スタキオース、イソマルトース、デキストラン、ヒドロキエチルスターチ (HES) を添加剤として用いて、 $\beta$ -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、2-ニトロフェニルガラクトピラノシドを基質として  $\beta$ -ガラクトシダーゼの残存活性を測定した。凍結乾燥製剤の  $\beta$ -ガラクトシダーゼのカルボニル炭素について、 $40^\circ\text{C}$  および  $50^\circ\text{C}$  において、スピン格子緩和時間 ( $T_1$ ) を測定した。

### (2) プラスミド DNA/リポソーム複合体の表面水和状態と細胞内取り込み

#### リポプレックスの調製

第二級のアミノ基と末端に水酸基を有し、コレステロールと結合したカチオン性脂質 OH-Chol (Fig. 1) とヘルパー脂質 DOPE (モル比で 1:1) からなるリポソームを修正エタノール注入法で調製し、超音波を照射して粒径を約 200nm にした。または、OH-Chol、DOPE と MEL-A、または Tween 80 がモル比で 1:1:0.5-1 の表面修飾リポソームも同様に調製した。DNA としては、ルシフェラーゼをコードしたプ

ラスミド DNA pCMV-luc を用いた。カチオン性リポソームと DNA の (+/-) 荷電比は 3/1 として水中でリポソーム/DNA 複合体 (リポプレックス) を調製した。

#### リポソームとリポプレックスの物性測定

リポソームとリポプレックスのサイズと表面電位は、電気泳動光散乱光度計 (ELS-Z2、大塚電子株) を用いて、表面の水和状態は蛍光物質 6-dodecanoyl-2-demethylaminonaphthalene (laurdan) を 0.2mol%/total lipid 添加したリポソームを用いて、 $25^\circ\text{C}$  で Ex340nm おける Em440 と 490 nm での蛍光強度の差から GP (generalized polarization) 値を求めて評価した。

$$\text{GP(Ex340)} = (\text{I440} \cdot \text{I490}) / (\text{I440} + \text{I490})$$

誘電緩和測定は、 $25^\circ\text{C}$  行った。

#### リポプレックスの細胞内取り込み

A549 細胞にローダミンでラベルしたリポプレックスを添加して、PBS 中で 2 時間インキュベーションをし、フローサイトメーターで取り込みを評価した。

#### (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。

## C. 研究結果

### (1) NMR 緩和時間によって表される凍結乾燥製剤中の $\beta$ -ガラクトシダーゼの分子運動性と安定性との関連

前年度までの検討によって、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調製した凍結乾燥製剤中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼの失活速度はスクロース > トレハロース > スタキオースの順であることが明らかになった。また、 $25^\circ\text{C}$  における  $\beta$ -ガラクトシダーゼのカルボニル炭素の緩和時間はスクロース > トレハロース > スタキオースの順であり、スクロースとの凍結乾燥中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼの運動性が最も低いことを明らかにした。保存安定

性と NMR 緩和時間で表される分子運動性の関連をさらに検討するため、スクロース、トレハロース、スタキオース、イソマルトース、デキストラン、HES を添加剤として用いた凍結乾燥製剤について酵素活性の変化をもとに保存安定性を検討するとともに、保存実験を行った温度において、タンパク質カルボニル炭素の NMR 緩和時間の測定を行った。

Fig.2 に 40°C における  $\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の失活のタイムコースを示す。スクロース、トレハロース、イソマルトースは失活が遅く、300 日保存後も、90%以上の活性が残存していた。スタキオースを添加した製剤は 240 日保存により、活性が保存前の約 90%に減少した。一方、デキストランや HES を添加した製剤においては初期に速やかな失活がみられ、それに引き続いてゆるやかな活性の減少が観測された。添加剤によって  $\beta$ -ガラクトシダーゼの失活速度に大きな差がみられた。スクロース、トレハロース、イソマルトース、スタキオースを添加剤として用いた凍結乾燥製剤中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼの失活速度は一次速度式に従い速度定数を算出した。得られた速度定数を Fig.3 に示す。デキストランと HES を添加した凍結乾燥製剤において観測された初期の速やかな失活は凍結乾燥によってダメージをうけた  $\beta$ -ガラクトシダーゼの失活によるものと考えられることから、これらの凍結乾燥製剤の失活のタイムコースは 2 つの指数関数の和によって表されると仮定し、フィッティングを行った。Fig.3 には後半の緩やかな失活の速度定数を示す。添加剤のよって  $\beta$ -GA の安定性は大きく異なることが分かった。

Fig.4 にスタキオースを添加剤として用いた凍結乾燥製剤の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルの例を示す。50-100 ppm 付近の大きなピークはスタキオース由来であることが、糖単独のスペクトル測定から確認された。他の添加剤においても同様の化学シフトにピークが観測された。175ppm 付近のシグナルは  $\beta$ -ガラクトシダーゼのカルボニル炭素のシグナルであるとアサインされた。カルボニル炭素について Torchia のパルスシーケンズを用い、 $T_1$  を測定した。緩和の待ち時間とシグナル強度の関係を Fig.5 に示す。観測されたシグナルの減衰は 1 つの緩和時間によって

表された。しかし、カルボニル炭素のシグナルには複数のアミノ酸が寄与しているので、得られた緩和時間は  $\beta$ -ガラクトシダーゼのカルボニル炭素の平均の分子運動性を表すものと考えられる。40°C と 50°C の 2 つの温度で測定した  $\beta$ -ガラクトシダーゼの失活速度と  $\beta$ -ガラクトシダーゼカルボニル炭素の  $T_1$  との関係を Fig.6 に示す。ここで、 $T_1$  は温度が高いほど短いことから、“Slow motional regime” における値と考えられ、 $T_1$  が短いほどカルボニル炭素の分子運動性が高いことを示す。 $T_1$  が大きくカルボニル炭素の分子運動性が低いと考えられる凍結乾燥製剤ほど、 $\beta$ -GA の失活速度が小さく安定であることが明らかになった。また、異なる温度で測定した失活速度と  $T_1$  のプロットが 1 つの曲線上に集まった。これは、 $T_1$  で表される分子運動性と失活速度が関連することを支持するデータであると考えられる。

## (2) プラスミド DNA/リポソームの表面状態と遺伝子発現効率

遺伝子導入効率を改善するために非イオン性界面活性剤によるリポソームの表面修飾を検討した。蛍光標識したリポソームの蛍光強度から導き出される GP 値は水和状態の指標といわれており、この値が高いほど脱水和状態にあるとされている。OH-Chol リポソームに MEL-A、または Tween 80 で修飾したベクターにおいては、Tween 80 は MEL-A よりリポプレックスの GP 値を減少させたので表面を水和させることが明らかになった(Fig.7)。

誘電緩和の測定では、まずリポソームの濃度がどの程度で測定できるかを検討した。リポソーム懸濁液(総脂質量約 6 mg/mL)を超遠心(452000 x g, 30min, 4°C)により 5 倍に濃縮した総脂質量約 30mg/mL のリポソームと、それを希釈した 15, 10 mg/mL のリポソーム懸濁液の誘電緩和測定を行った (Fig.8)。総脂質量約 10mg/mL のリポソームでも測定できることが明らかになったため、超遠心による濃縮ではなく、リポソームをこの濃度で調製することにした。

このリポソームおよびリポプレックスの誘電緩和測定を行った (Fig.9)。GP 値と同様に MEL-A を添加したものは添加しないものよりも脱水和状態にあり、一方で Tween 80 を添加したものは水和状態にあるという傾向が確認された。このリポソームのゼータ電位を測定したところ、Fig. 10 のようになった。

#### D. 考察

##### (1) NMR 緩和時間によって表される凍結乾燥製剤中の $\beta$ -ガラクトシダーゼの分子運動性と安定性との関連

種々の糖を添加剤として用いた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤について、タンパク質カルボニル炭素の緩和時間と失活速度の間には関連がみられた。緩和時間に基づく安定性予測の可能性が示唆された。しかし、保存安定性の時間スケールは月~年の時間スケールであるのに対し、 $T_1$  は非常に短い時間スケールで起こる分子運動によって支配される。中性子散乱測定によって測定される MHz オーダーの分子運動性が保存安定性と関連するとの報告もあることから、これは失活速度と  $T_1$  の関連を否定するものではないと考えられる。スケールの小さな分子運動とタンパク質の保存安定性の関連性を説明する理論の構築が必要であると考えられる。

##### (2) プラスミド DNA/リポソームの表面状態と遺伝子発現効率

遺伝子導入用リポソームベクターでは、カチオン性脂質が用いられている。アニオン性の DNA とリポプレックスを作り、なおかつアニオン性電荷をもつ細胞と相互作用させるために、カチオン性リポソームと DNA の (+/-) 荷電比を調整してカチオン性になるようにしている。従って、このカチオン性脂質のリポプレックスにおいては、DNA とリポソーム脂質膜との強い分子的相互作用により、サイズや表面状態が変化することが知られている。そのため、これまでリポプレックスの表面状態は表面電位の測定で評価されてきた。ここ

では新たに表面の水和状態が細胞内取り込みや遺伝子導入効率の指標になる可能性を検討した。

まず、カチオン性脂質としては、生体分解性が高く、DNA と適度に相互作用をする脂質として、コレステロール誘導体 (OH-Chol) を選択した。リポソームの表面電位は、MEL-A や Tween 80 の添加によって大きく変化しなかった。リポプレックスの表面の水和状態においては、Tween 80 は MEL-A より水和させることが明らかになった。細胞への取り込みについては、Tween 80 は MEL-A より低下させた。したがって、リポプレックスの水和状態が、細胞内取り込みに関係することが示唆された。

#### E. 結論

(1)  $^{13}\text{C}$ -NMR 緩和時間測定は不安定な高分子医薬品製剤の保存安定性を評価できる有用な手法であることが明らかになった。

(2) 本研究の結果より、遺伝子導入用リポソーム製剤には、リポソーム/DNA 複合体の高いカチオン性の表面電位と水和状態が、細胞内取り込みに関係すると推察された。今後のリポソームベクターの遺伝子導入効率を予見するうえでの 1 つのマーカーとして、誘電緩和測定によるリポソームの表面水和状態を使用できる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Bingquan Wang, Marcus T. Cicerone, Yukio Aso, Michael J. Pikal : The impact of thermal treatment on the stability of freeze-dried amorphous pharmaceuticals: II. aggregation in an IgG1 fusion protein. *J. Pharm. Sci.* (2010) **99**, 683-700.
- 2) 阿曾幸男, 吉岡澄江 : 非晶質の緩和と結晶化, 難水溶性薬物の物性評価と製剤設計の新展開, シーエムシ出版, 224-235 (2010).
- 3) Aso, Y., Yoshioka, S., Miyazaki, T.,

- Kawanishi, T.: Feasibility of  $^{19}\text{F}$ -NMR for assessing the molecular mobility of flufenamic acid in solid dispersions. *Chem. Pharm. Bull.*, (2009) 57, 61-64.
- 4) Y. Hattori, M. Hakoshima, K. Koga and Y. Maitani, Increase of therapeutic effect by treating nasopharyngeal tumor with combination of HER-2 siRNA and paclitaxel, *International Journal of Oncology*, in press.
- 5) K. Koga, Y. Hattori, M. Komori, R. Narishima, M. Yamasaki, M. Hakoshima, T. Fukui and Y. Maitani, Combination of RET siRNA and irinotecan inhibited the growth of medullary thyroid carcinoma TT cells and xenografts *via* apoptosis, *Cancer Science*, in press.
- 6) K. Goto, Y. Chiba, K. Matsusue, Y. Hattori, Y. Maitani, H. Sakai, S. Kimura, M. Misawa, The proximal STAT6 and NF-kappaB sites are responsible for IL-13- and TNF-alpha-induced RhoA transcriptions in human bronchial smooth muscle cells. *Pharmacol Res.*, in press.
- 7) H. Ma, K. Shiraishi, T. Minowa, K. Kawano, M. Yokoyama, Y. Hattori, Y. Maitani, Accelerated blood clearance was not induced for a gadolinium-containing PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle in mice, *Pharm Res.*, in press.
- 8) T. Minowa, K. Kawano, H. Kuribayashi, K. Shiraishi, T. Sugino, Y. Hattori, M. Yokoyama, Y. Maitani, Increase in tumour permeability following TGF- $\beta$  type I receptor inhibitor treatment observed by dynamic contrast-enhanced MRI. *British Journal of Cancer*, 101(11), 1884-1890 (2009).
- 9) Y. Maitani and Y. Hattori, Oligoarginine-PEG-lipid particles for gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(10):1065-1077 (2009).
- 10) Y. Ishii, Y. Hattori, T. Yamada, S. Uesato, Y. Maitani, Y. Nagaoka, Histone Deacetylase Inhibitor Prodrugs in Nanoparticle Vector Enhanced Gene Expression In Human Cancer Cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 4603-4610 (2009).
- 11) Shiraishi K, Kawano K, Minowa T, Maitani Y, Yokoyama M. Preparation and in vivo imaging of PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agents. *J Control Release*, 136(1):14-20 (2009).
- 12) Y. Chiba, S. Onoda, Y. Hattori, Y. Maitani, H. Sakai, and M. Misawa. Upregulation of ADAM8 in the Airways of Mice with Allergic Bronchial Asthma. *Lung*, 187:179-185 (2009).
- 13) Y. Hattori, L. Shi, W. Ding, K. Koga, K. Kawano, M. Hakoshima, Y. Maitani, Novel irinotecan-loaded liposome using phytic acid with high therapeutic efficacy for colon tumors, *J. Control. Release*, 136:30-37 (2009).
- 14) Y. Hattori, K. Koga, T. Izumisawa, M. Yamasaki, R. Narishima, S. Yoshida, T. Fukui, Y. Maitani, The distribution of mRNA expression and protein after hydrodynamic injection of transgene in mice, *Biol. Pharm. Bull.* 32(4): 755-759 (2009).
- 15) M. Furuhata, T. Izumisawa, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, Decaarginine-PEG-liposome Enhanced Transfection Efficiency and Function of Arginine Length and PEG, *Int J Pharm.* 37(1-2):40-46 (2009).
- 16) Y. Li, X. R. Qi, Y. Maitani, T. Nagai, PEG-PLA diblock copolymer micelle-like nanoparticles as all-trans-retinoic acid carrier: in vitro and in vivo characterizations, *Nanotechnology*, 20(5):55106.
- 17) W. Ding, T. Izumisawa, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani, Non-ionic surfactant modified cationic liposomes mediated gene transfection in vitro and in the mouse lung, *Biol. Pharm. Bull.* 32(2):311-315 (2009).
- 18) K. Kawano, E. Onose, Y. Hattori, Y. Maitani, Higher liposomal membrane fluidity enhances the in vitro anti-tumor activity of folate-targeted liposomal mitoxantrone, *Molecular Pharmaceutics*, 6(1), 98-104 (2009).
- 19) W. Ding, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani, Surface properties of lipoplexes modified with MEL-A and Tween 80, *Chem. Pharm. Bull.* 57(2), 138-143 (2009).
- 20) T. Fujita, M. Furuhata, Y. Hattori, H. Kawakami, K. Toma, Y. Maitani, Calcium enhanced delivery of tetraarginine-PEG-lipid-coated DNA/protamine complexes, *Int J Pharm.* 368, 186-192 (2009).
- 21) . Hattori and Y. Maitani. Folate-linked lipid-based nanoparticle gene delivery to the tumor, *Encyclopedia of Nanoscience and*



## 2. 学会発表

- 1) 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 川西 徹: 原子間力顕微鏡を用いた非晶質ニフェジピン表面の結晶化観察, 日本薬剤学会第 24 年会 (2009. 5)
- 2) 阿曾幸男, 太田 鋼, 宮崎玉樹, 川西 徹: 熱刺激電流測定法による数種のセファロスポリン系抗生物質の水分子の運動性の測定日本薬剤学会第 24 年会 (2009. 5)
- 3) Yukio Aso, Tsuyoshi Ohta, Tamaki Miyazaki and Toru Kawanishi: Stabilization and controlled release of  $\beta$ -galactosidase in cross-linked hydrophilic polymers prepared by  $\gamma$ -irradiation, Controlled Release Society Annual Meeting (2009. 7)
- 4) Miyazaki T., Aso, Y., Kawanishi T.: Crystallization rate of nifedipine at the surface of the amorphous solids determined by atomic force microscopy. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2009.11).
- 5) Aso Y., Miyazaki T., Yoshioka S., Kawanishi T.: Temperature dependence of  $\beta$ -relaxation time of flufenamic acid in solid dispersions determined from  $^{19}\text{F}$ -NMR relaxation time. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2009.11).
- 6) 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 川西 徹: 結晶化の駆動力および結晶-非晶質界面自由エネルギーから予測されるニフェジピン類薬物の核生成速度, 日本薬学会第 130 年会 (2010. 3).
- 7) 阿曾幸男, 太田 鋼, 宮崎玉樹, 川西 徹: 加水分解速度の異なる結合を介して架橋したデキストランゲルからの  $\beta$ -ガラクトシダーゼの放出制御, 日本薬学会第 130 年会 (2010. 3)
- 8) 古賀公子, 服部喜之, 米谷芳枝: 悪性内分泌腫瘍における RET 標的 siRNA とイリノテカンの併用治療 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 9) 林京子, 米谷芳枝 甲斐敬, 林利光: ポリエチレンイミンの性器ヘルペス治療効果 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 10) 服部喜之, 古賀公子, 泉澤友宏, 山崎正博, 成島遼太, 福井哲也, 米谷芳枝: ハイドロダイナミクス法により遺伝子導入したマウスにおける mRNA 発現体内分布と発現タンパク質活性 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 11) 谷口幸寛, 川野久美, 米谷芳枝: 葉酸修飾抗癌剤封入微粒子製剤の血管新生阻害剤併用による抗腫瘍効果の増強 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 12) 下條裕樹, 渡辺和男, 梅田勲, 川野久美, 服部喜之, 米谷芳枝: Layer-by-Layer 法を用いた高分子電解質修飾リポソーム製剤の調製と評価 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 13) 箕輪卓也, 川野久美, 栗林秀人, 白石貢一, 服部喜之, 横山昌幸, 米谷芳枝: Gd 封入リポソーム造影剤を用いた DCE-MRI による TGF- $\beta$  阻害剤の評価 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 14) 丁武孝, 服部喜之, 米谷芳枝: 遺伝子導入用葉酸修飾ナノプレックスの開発 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 15) 箱島基貴, 服部喜之, 米谷芳枝: ヒト咽頭上皮癌における Her-2 siRNA とパクリタキセルの併用治療の検討 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 16) 川野久美, 服部喜之, 横山昌幸, 岩倉浩, 赤水尚史, 米谷芳枝: 副腎腫瘍発症遺伝子改変マウスの MRI による腫瘍増殖評価 第 4 回日本分子イメージング学会総会・学術集会 (2009.5)
- 17) 勢子祐貴, 川野久美, 服部喜之, 米谷芳枝: PC-12 細胞担癌ヌードマウスに対するリポソーム製剤の抗腫瘍効果の評価 日本薬剤学会 第 24 年会 (2009.5)
- 18) 若杉亜以, 浅川真澄, 清水敏美, 米谷芳枝: ドキソルビシン・オーガニックナノチューブ複合体の調製と評価 第 25 回日本 DDS 学会 (2009.7)
- 19) 生形晴哉, 服部喜之, 米谷芳枝: アンジオテンシン II を用いた昇圧療法によるドキソルビシン封入リポソーム製剤の担がんマウスの体内分布の評価 第 25 回日本 DDS 学会 (2009.7)
- 20) 馬会利, 白石貢一, 箕輪卓也, 川野久美, 横山昌幸, 服部喜之, 米谷芳枝: Accelerated Blood Clearance Phenomenon was not Induced by Repeated Injections of Gadolinium-containing Polymeric Micelle 第 25 回日本 DDS 学会 (2009.7)
- 21) 米谷芳枝: リポソーム化造影剤を用いた DCE-MRI による TGF- $\beta$  阻害剤の評価 第 25 回日本 DDS 学会 (2009.7)
- 22) Y. Maitani: Liposomal Drug Delivery System for HSV-tk Suicide Gene Therapy BIT's 2nd Annual World Summit of Antivirals (WSA-2009)(2009.7, 中国)
- 23) Ai Wakasugi, Masumi Asakawa, Masaki Kogiso, Toshimi Shimizu and Yoshie Maitani: Development of organic nanotube entrapped anticancer drug 17th International

Symposium on Microencapsulation  
(2009. 9 名古屋)

24) K. Kawano, E. Onose, Y. Hattori, Y. Maitani: In vitro anti-tumor activity of folate-targeted liposomal mitoxantrone with higher membrane fluidity 17th International Symposium on Microencapsulation (2009. 9 名古屋)

25) Y. Hattori, N. Kanamoto, K. Kawano, H. Iwakura, T. Akamizu, K. Nakao and Y. Maitani: Molecular characterizations of tumors from human pheochromocytoma and adrenal neuroblastoma-model transgenic mice 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10)

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

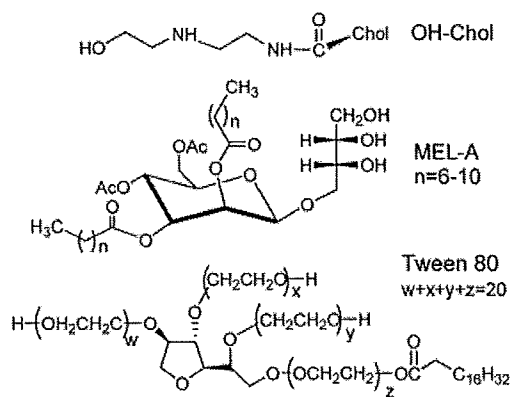


Fig.1. Chemical structures of cationic lipids and surfactants.

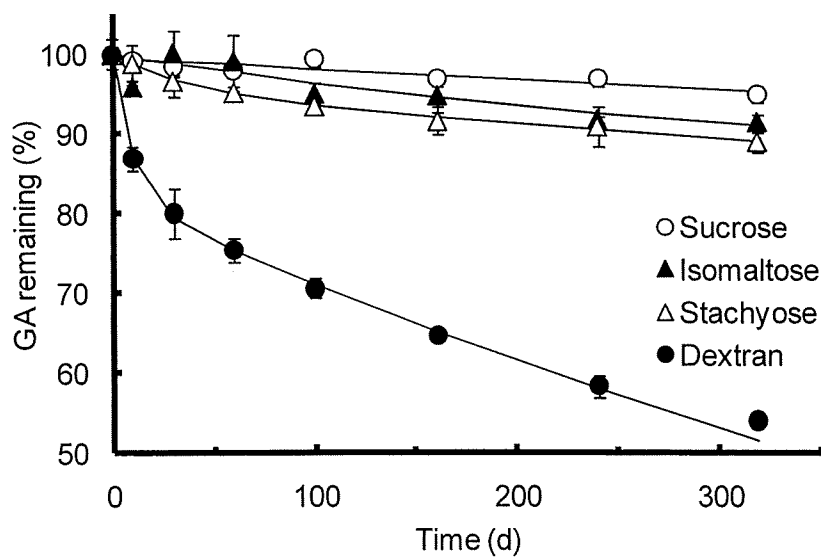


Fig.2. Degradation of  $\beta$ -galactosidase in lyophilized formulations with sugars at 40 °C.  
Sugar fraction: 0.33 w/w, 12%RH.

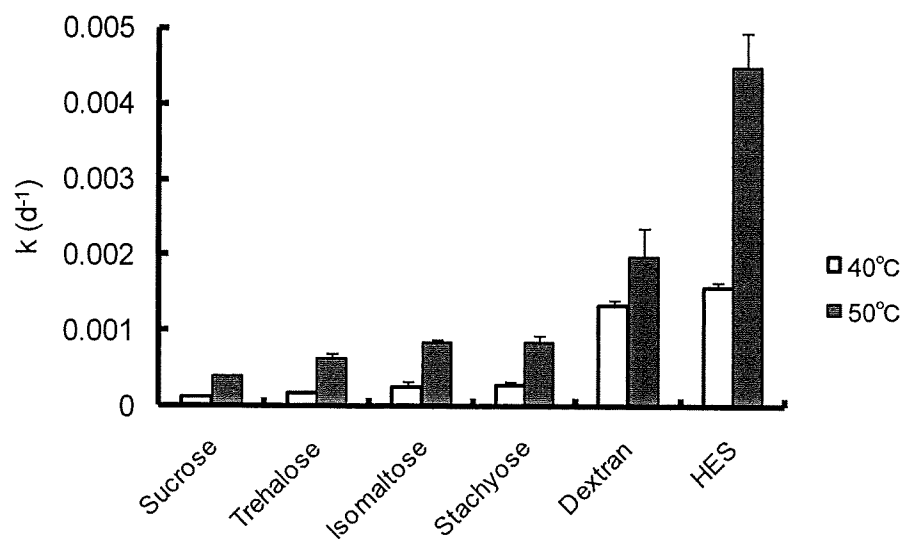


Fig.3. Degradation rate constant of  $\beta$ -galactosidase in freeze-dried formulations with sugars.

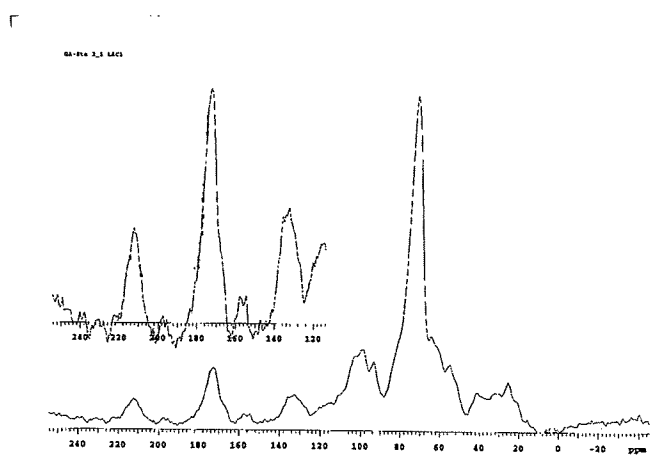


Fig.4.  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS spectra of lyophilized  $\beta$ -galactosidase formulation with stachyose.

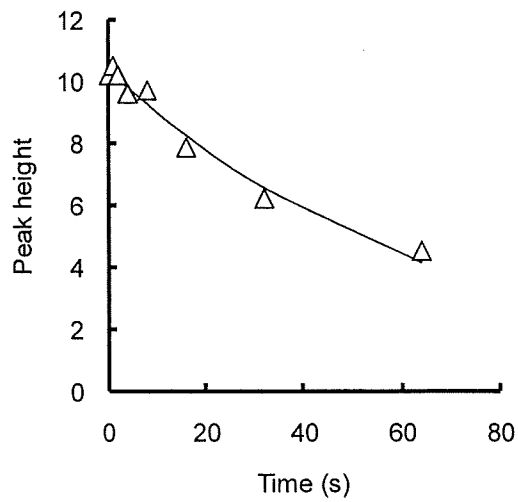


Fig.5.  $^{13}\text{C}$ -NMNR relaxation of GA carbonyl carbons..

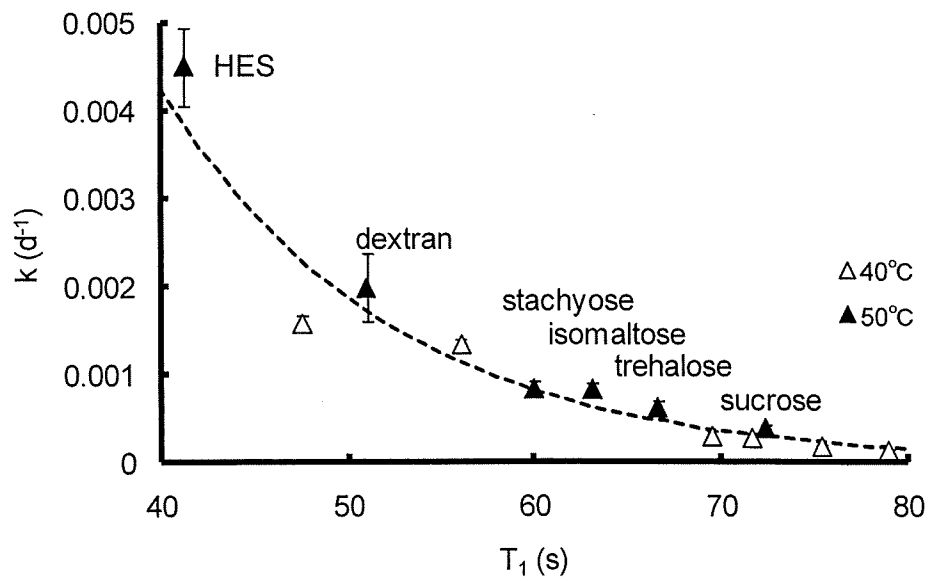


Fig.6. Correlation between degradation rate and  $T_1$  of carbonyl carbon of  $\beta$ -galactosidase.

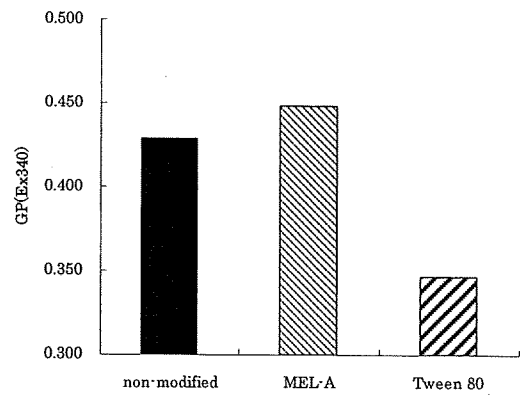


Fig.7. The change of surface hydration of liposomes as monitored by laurdan generalized polarization(GP) in PBS

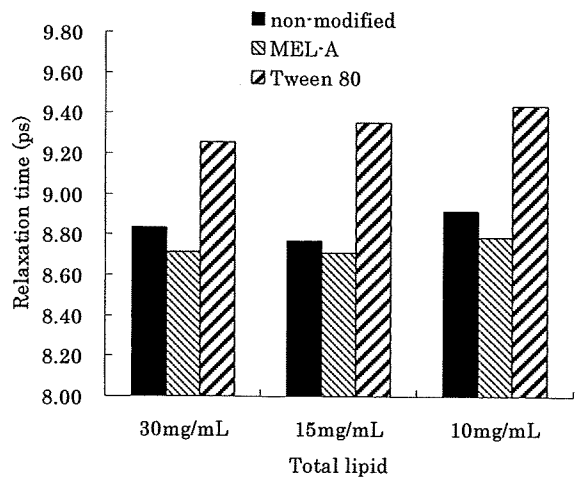


Fig.8. Dielectric relaxation of various concentrations of liposome suspension

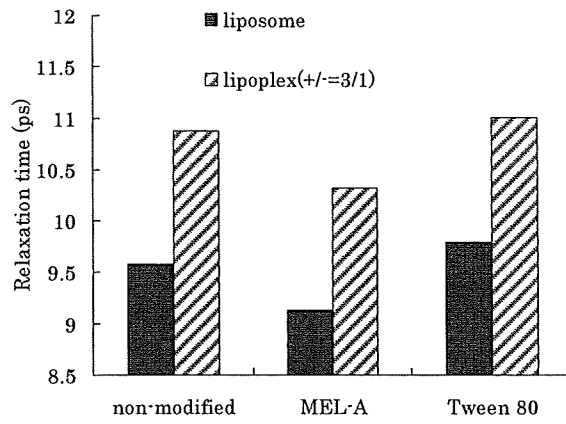


Fig.9. Dielectric relaxation of liposomes and lipoplexes

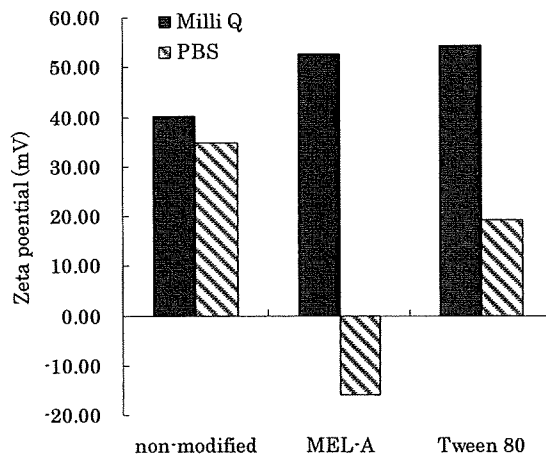


Fig.10. Zeta potentials of liposomes in Milli Q and PBS

## プラスミド DNA/リポソームの表面状態と遺伝子発現効率

研究分担者 米谷芳枝 星薬科大学 医薬品化学研究所 教授

遺伝子導入用リポソーム製剤は、安全性は高いが遺伝子導入効率が低いのが問題となっており、遺伝子導入効率を改善するために、リポソームの表面改質が行なわれている。本研究では非イオン性界面活性剤として mannosylerythritol (MEL-A) と Tween 80 を用いて表面改質したリポソームと DNA との複合体（リポプレックス）の細胞取り込みに対する影響について検討した。誘電緩和測定の結果、リポプレックスの表面の水和状態においては、Tween 80 は MEL-A より水和させることが明らかになった。この評価法は、遺伝子導入用リポソームベクターの細胞内取り込みの予測に有用となることが示唆された。

## A. 研究目的

現在、リポソームは遺伝子導入用非ウイルスベクターとして用いられている。しかしながら、リポソームの物性的な特徴としては粒子サイズと表面電位が測定されるのみである。リポソームと DNA との複合体（リポプレックス）を形成させるときも、その混合比をかえて調整したリポプレックスの粒子サイズと表面電位が測定され、遺伝子導入効率の評価に用いられる。一方、PEG 脂質でリポソームを修飾すると、未修飾のリポソームに比べて細胞内への取り込みがされにくくなり、また、リポプレックスも形成されにくくなることも報告されている。これらはリポソーム表面が PEG 修飾によって水和されたためと説明されている。

私たちはこれまでに、界面活性剤である非イオン性界面活性剤として Tween80 とバイオ界面活性剤である mannosylerythritol (MEL-A) を添加したリポソームを用いて、リポプレックスの表面状態と細胞内取り込み、遺伝子発現効率を評価してきた。MEL-A は *in vitro* と *in vivo* でともに発現を上昇したが、Tween 80 はいずれにおいても上昇しなかった。蛍光プローブを用いて測定したリポプレックスの表面の水和状態においては、

Tween 80 は MEL-A より水和させることが明らかになった。したがって、リポプレックスの表面電位と水和状態が、細胞内取り込みに関係することが推察された。

そこで、本年度はリポプレックスの表面の水和状態に焦点をあて、リポソームに MEL-A、または Tween80 を添加し、リポソームとそのリポプレックスの表面水和状態を蛍光標識による測定と水の誘電緩和測定の2つの方法から検討を行った。

## B. 研究方法

リポプレックスの調製

第二級のアミノ基と末端に水酸基を有し、コレステロールと結合したカチオン性脂質 OH-Chol (Fig. 1) とヘルパー脂質 DOPE (モル比で 1:1) からなるリポソームを修正エタノール注入法で調製し、超音波を照射して粒径を約 200nm にした。または、OH-Chol、DOPE と MEL-A、または Tween 80 がモル比で 1:1:0.5-1 の表面修飾リポソームも同様に調製した。DNA としては、ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA pCMV-luc を用いた。カチオン性リポソームと DNA の (+/-) 荷電比は 3/1 として水中でリポソーム/DNA 複合体（リポプ



レックス)を調製した。

#### リポソームとリポプレックスの物性測定

リポソームとリポプレックスのサイズと表面電位は、電気泳動光散乱光度計 (ELS-Z2、大塚電子株)を用いて、表面の水和状態は蛍光物質 6-dodecanoyl-2-demethylaminonaphthalene (laurdan)を0.2mol%/total lipid添加したリポソームを用いて、25°CでEx340nmにおけるEm440と490 nmでの蛍光強度の差からGP (generalized polarization) 値を求めて評価した。

$$GP(Ex_{340}) = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490})$$

誘電率と誘電緩和は、25°C行った。

#### リポプレックスの細胞内取り込み

A549 細胞にローダンミンでラベルしたリポプレックスを添加して、PBS 中で2時間インキュベーションをし、フローサイトメーターで取り込みを評価した。

#### C. 研究結果

遺伝子導入効率を改善するために非イオン性界面活性剤によるリポソームの表面修飾を検討した。蛍光標識したリポソームの蛍光強度から導き出される GP 値は水和状態の指標といわれており、この値が高いほど脱水和状態にあるとされている。OH-Chol リポソームに MEL-A、または Tween 80 で修飾したベクターにおいては、Tween 80 は MEL-A よりリポプレックスの GP 値を減少させたので表面を水和させることが明らかになった(Fig. 2)。

誘電緩和の測定では、まずリポソームの濃度がどの程度で測定できるかを検討した。リポソーム懸濁液(総脂質量約 6 mg/mL)を超遠心(452000 x g, 30min, 4°C)により5倍に濃縮した総脂質量約 30mg/mLのリポソームと、それを希釈した15, 10 mg/mLのリポソーム懸濁液の誘電緩和測定

を行った (Fig. 3)。総脂質量約 10mg/mL のリポソームでも測定できることが明らかになったため、超遠心による濃縮ではなく、リポソームをこの濃度で調製することにした。

このリポソームおよびリポプレックスの誘電緩和測定を行った (Fig. 4)。GP 値と同様に MEL-A を添加したものは添加しないものよりも脱水和状態にあり、一方で Tween 80 を添加したものは水和状態にあるという傾向が確認された。このリポソームのゼータ電位を測定したところ、Fig. 5 のようになった。

#### D. 考察

遺伝子導入用リポソームベクターでは、カチオン性脂質が用いられている。アニオン性の DNA とリポプレックスを作り、なおかつアニオン性電荷をもつ細胞と相互作用させるために、カチオン性リポソームと DNA の(+/-)荷電比を調整してカチオン性になるようにしている。従って、このカチオン性脂質のリポプレックスにおいては、DNA とリポソーム脂質膜との強い分子的相互作用により、サイズや表面状態が変化することが知られている。そのため、これまではリポプレックスの表面状態は表面電位の測定で評価されてきた。ここでは新たに表面の水和状態が細胞内取り込みや遺伝子導入効率の指標になる可能性を検討した。

まず、カチオン性脂質としては、生体分解性が高く、DNA と適度に相互作用をする脂質として、コレステロール誘導体 (OH-Chol) を選択した。リポソームの表面電位は、MEL-A や Tween 80 の添加によって大きく変化しなかった。リポプレックスの表面の水和状態においては、Tween 80 は MEL-A より水和させることが明らかになった。細胞への取り込みについては、Tween 80 は MEL-A より低下させた。したがって、リポプレックスの水和状態が、細胞内取り込みに関係することが示唆された。

#### E. 結論

本研究の結果より、遺伝子導入用リポソーム製剤には、リポソーム/DNA 複合体の高いカチオン性の表面電位と水和状態が、細胞内取り込みに関係すると推察された。今後のリポソームベクターの遺伝子導入効率を予測するうえでの1つのマーカーとして、誘電緩和測定によるリポソームの表面水和状態を使用できる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Y. Hattori, M. Hakoshima, K. Koga and Y. Maitani, Increase of therapeutic effect by treating nasopharyngeal tumor with combination of HER-2 siRNA and paclitaxel, *International Journal of Oncology*, in press.
- 2) K. Koga, Y. Hattori, M. Komori, R. Narishima, M. Yamasaki, M. Hakoshima, T. Fukui and Y. Maitani, Combination of RET siRNA and irinotecan inhibited the growth of medullary thyroid carcinoma TT cells and xenografts *via* apoptosis, *Cancer Science*, in press.
- 3) K. Goto, Y. Chiba, K. Matsusue, Y. Hattori, Y. Maitani, H. Sakai, S. Kimura, M. Misawa, The proximal STAT6 and NF-kappaB sites are responsible for IL-13- and TNF-alpha-induced RhoA transcriptions in human bronchial smooth muscle cells. *Pharmacol Res.*, in press.
- 4) H. Ma, K. Shiraishi, T. Minowa, K. Kawano, M. Yokoyama, Y. Hattori, Y. Maitani, Accelerated blood clearance was not induced for a gadolinium-containing PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle in mice, *Pharm Res*, in press.
- 5) T. Minowa, K. Kawano, H. Kuribayashi, K. Shiraishi, T. Sugino, Y. Hattori, M. Yokoyama, Y. Maitani, Increase in tumour permeability following TGF-b type I receptor inhibitor treatment observed by dynamic contrast-enhanced MRI. *British Journal of Cancer*, 101(11), 1884-1890 (2009).
- 6) Y. Maitani and Y. Hattori, Oligoarginine-PEG-lipid particles for gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(10):1065-1077 (2009).
- 7) Y. Ishii, Y. Hattori, T. Yamada, S. Uesato, Y. Maitani, Y. Nagaoka, Histone Deacetylase Inhibitor Prodrugs in Nanoparticle Vector Enhanced Gene Expression In Human Cancer Cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 4603-4610 (2009).
- 8) Shiraishi K, Kawano K, Minowa T, Maitani Y, Yokoyama M. Preparation and in vivo imaging of PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agents. *J Control Release*, 136(1):14-20 (2009).
- 9) Y. Chiba, S. Onoda, Y. Hattori, Y. Maitani, H. Sakai, and M. Misawa. Upregulation of ADAM8 in the Airways of Mice with Allergic Bronchial Asthma. *Lung*, 187:179-185 (2009).
- 10) Y. Hattori, L. Shi, W. Ding, K. Koga, K. Kawano, M. Hakoshima, Y. Maitani, Novel irinotecan-loaded liposome using phytic acid with high therapeutic efficacy for colon tumors, *J. Control. Release*, 136:30-37 (2009).
- 11) Y. Hattori, K. Koga, T. Izumisawa, M. Yamasaki, R. Narishima, S. Yoshida, T. Fukui, Y. Maitani, The distribution of mRNA expression and protein after hydrodynamic injection of transgene in mice, *Biol. Pharm. Bull.* 32(4): 755-759 (2009).
- 12) M. Furuhashi, T. Izumisawa, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, Decaarginine-PEG-liposome Enhanced Transfection Efficiency and Function of Arginine Length and PEG, *Int J Pharm.* 37(1-2):40-46 (2009).
- 13) Y. Li, X. R. Qi, Y. Maitani, T. Nagai, PEG-PLA diblock copolymer micelle-like nanoparticles as all-trans-retinoic acid carrier: in vitro and in vivo characterizations, *Nanotechnology*, 20(5):55106.
- 14) W. Ding, T. Izumisawa, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani, Non-ionic surfactant modified cationic liposomes mediated gene transfection in vitro and in the mouse lung, *Biol. Pharm. Bull.* 32(2):311-315 (2009).
- 15) K. Kawano, E. Onose, Y. Hattori, Y. Maitani, Higher liposomal membrane fluidity enhances

the in vitro anti-tumor activity of folate-targeted liposomal mitoxantrone, *Molecular Pharmaceutics*, 6(1), 98-104 (2009).

- 16) W. Ding, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani, Surface properties of lipoplexes modified with MEL-A and Tween 80, *Chem. Pharm. Bull.* 57(2), 138-143 (2009).
- 17) T. Fujita, M. Furuhashi, Y. Hattori, H. Kawakami, K. Toma, Y. Maitani, Calcium enhanced delivery of tetraarginine-PEG-lipid-coated DNA/protamine complexes, *Int J Pharm.* 368, 186-192 (2009).
- 18) Y. Hattori and Y. Maitani. Folate-linked lipid-based nanoparticle gene delivery to the tumor, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Edited by H. S. Nalwa, American Scientific Publishers, in press. 2009.

## 2. 学会発表

- 1) 古賀公子, 服部喜之, 米谷芳枝 悪性内分泌腫瘍における RET 標的 siRNA とイリノテカンの併用治療 日本薬学会第 129 年会 (2009.3)
- 2) 林京子, 米谷芳枝 甲斐敬, 林利光 ポリエチレンイミンの性器ヘルペス治療効果 日本薬学会第 129 年会 (2009.3)
- 3) 服部喜之, 古賀公子, 泉澤友宏, 山崎正博, 成島遼太, 福井哲也, 米谷芳枝 ハイドロダイナミクス法により遺伝子導入したマウスにおける mRNA 発現体内分布と発現タンパク質活性 日本薬学会第 129 年会 (2009.3)
- 4) 谷口幸寛, 川野久美, 米谷芳枝 葉酸修飾抗癌剤封入微粒子製剤の血管新生阻害剤併用による抗腫瘍効果の増強 日本薬学会第 129 年会 (2009.3)
- 5) 下條裕樹, 渡辺和男, 梅田勲, 川野久美, 服部喜之, 米谷芳枝 Layer-by-Layer 法を用いた高分子電解質修飾リポソーム製剤の調製と評価 日本薬学会第 129 年会 (2009.3)

- 6) 箕輪卓也, 川野久美, 栗林秀人, 白石貢一, 服部喜之, 横山昌幸, 米谷芳枝 Gd 封入りポソーム造影剤を用いた DCE-MRI による TGF- $\beta$  阻害剤の評価 日本薬学会第 129 年会 (2009.3)
- 7) 丁武孝, 服部喜之, 米谷芳枝 遺伝子導入用葉酸修飾ナノプレックスの開発 日本薬学会第 129 年会 (2009.3)
- 8) 箱島基貴, 服部喜之, 米谷芳枝 ヒト咽頭上皮癌における Her-2 siRNA とパクリタキセルの併用治療の検討 日本薬学会第 129 年会 (2009.3)
- 9) 川野久美, 服部喜之, 横山昌幸, 岩倉浩, 赤水尚史, 米谷芳枝 副腎腫瘍発症遺伝子変異マウスの MRI による腫瘍増殖評価 第 4 回日本分子イメージング学会総会・学術集会 (2009.5)
- 10) 勢子祐貴, 川野久美, 服部喜之, 米谷芳枝 PC-12 細胞担癌ヌードマウスに対するリポソーム製剤の抗腫瘍効果の評価 日本薬剤学会 第 24 年会 (2009.5)
- 11) 若杉亜以, 浅川真澄, 清水敏美, 米谷芳枝 ドキソルビシン-オーガニックナノチューブ複合体の調製と評価 第 25 回日本 DDS 学会 (2009.7)
- 12) 生形晴哉, 服部喜之, 米谷芳枝 アンジオテンシン II を用いた昇圧療法によるドキソルビシン封入りポソーム製剤の担がんマウスの体内分布の評価 第 25 回日本 DDS 学会 (2009.7)
- 13) 馬会利, 白石貢一, 箕輪卓也, 川野久美, 横山昌幸, 服部喜之, 米谷芳枝 Accelerated Blood Clearance Phenomenon was not Induced by Repeated Injections of Gadolinium-containing Polymeric Micelle 第 25 回日本 DDS 学会 (2009.7)
- 14) 米谷芳枝 リポソーム化造影剤を用いた

DCE-MRI による TGF- $\beta$ 阻害剤の評価 第 25 回日本 DDS 学会 (2009.7)

15) Y. Maitani Liposomal Drug Delivery System for HSV-tk Suicide Gene Therapy BIT's 2nd Annual World Summit of Antivirals (WSA-2009)(2009.7, 中国)

16) Ai Wakasugi, Masumi Asakawa, Masaki Kogiso, Toshimi Shimizu and Yoshie Maitani Development of organic nanotube entrapped anticancer drug 17th International Symposium on Microencapsulation (2009.9 名古屋)

17) K. Kawano, E. Onose, Y. Hattori, Y. Maitani In vitro anti-tumor activity of folate-targeted liposomal mitoxantrone with higher membrane fluidity 17th International Symposium on Microencapsulation (2009.9 名古屋)

18) Y. Hattori, N. Kanamoto, K. Kawano, H. Iwakura, T. Akamizu, K. Nakao and Y. Maitani Molecular characterizations of tumors from human pheochromocytoma and adrenal neuroblastoma-model transgenic mice 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10)