

201132038A

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、核酸等の高分子医薬製剤の高感度安定性評価技術の
確立に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿曾 幸男

平成24（2012）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、核酸等の高分子医薬製剤の高感度安定性評価技術の
確立に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿曾 幸男

平成 24 (2012) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

タンパク質、核酸等の高分子医薬製剤の 高感度安定性評価技術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	-----	17
米谷芳枝		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	25
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	27
-----------------	-------	----

タンパク質、核酸等の高分子医薬製剤の高感度安定性評価技術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 β -ガラクトシダーゼを用い、スクロースなどの添加剤を用いて調製した凍結乾燥製剤中の β -ガラクトシダーゼの保存安定性と、分子運動性の関連を検討した。 β -ガラクトシダーゼの失活速度は構造緩和を引き起こすスケールの大きな分子運動よりも、NMR 緩和時間によって表されるスケールの小さな分子運動がより密接に関連することが示された。スケールの小さな分子運動性を指標とする安定性予測の可能性が示唆された。in vivo 遺伝子導入用ベクターである正電荷リポソームとプラスミド DNA の複合体(リポプレックス)は、遺伝子導入効率を上げるために、poly(ethylene glycol) (PEG)脂質で修飾されることが多い。リポプレックスの粒子径とゼータ電位は測定されているが、PEGの表面水和状態の測定の報告は少ない。本研究では、PEG 修飾リポプレックスの表面水和状態を蛍光標識による GP 測定と水の誘電緩和を測定し、細胞内取り込み及び遺伝子発現への影響を調べた。その結果、水の誘電緩和測定によって PEG 修飾リポソームの水和状態が測定できることと、PEG の表面状態がリポプレックスの細胞内取り込みに影響することが明らかとなった。また、PEG 修飾リポソーム表面での PEG のマッシュルーム・ブラシ分布状態も GP 測定と水の誘電緩和測定によって推定でき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

ヒト型抗体医薬に代表されるように、近年のバイオテクノロジーの発展はタンパク質や核酸などの高分子医薬を製剤化し、医療の現場で用いようとする流れを加速している。高分子医薬は熱力学的に不安定であり、製剤化やその後の保存中に温度や湿度などの環境要因の影響を受け薬理効果を失いやすい。このような高分子医薬を医療の場で活用するためには高度な製剤学的工夫による安定化を施す必要がある。製剤学的工夫による安定化効果を確認し、その最適化を行えるように、短期間で高分子医薬製剤の安定性を評価でき

る評価法の開発が不可欠である。最近、中性子散乱によって測定される比較的スケールの小さなローカルな運動性と安定性との関連を示唆する報告がなされているが、本研究においては中性子散乱のような特殊な装置によらず、ローカルな運動性の指標である β 緩和時間の測定法を開発することを特徴とし、 β 緩和時間に基づいた高分子医薬製剤の安定性評価法を開発することを目的とする。また、タンパク質や核酸のローカルな分子運動性を抑制することにより、高い安定性を有するタンパク質製剤および核酸医薬のリポソーム製剤の開発を目指す。

本年度はタンパク質の凍結乾燥製剤については、 β ガラクトシダーゼをモデルタンパクとして用い、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、ヒドロキシエチルスターチを添加剤として用いた凍結乾燥製剤の保存安定性を検討し、 β ガラクトシダーゼの保

存安定性と¹³C-NMR緩和時間によって表される分子運動性との関連を明らかにした。また、PEG脂質で修飾したリポソームおよびそのリポプレックスの表面水和状態を、GP測定と水の誘電緩和時間測定の方法から検討を行った。これらの結果は、遺伝子導入用リポソームベクターの開発の上で新しい知見を与え、誘電緩和時間測定をすることによってリポソームの最適PEG修飾率の予測が可能となることが期待される。

B. 研究方法

(1) 凍結乾燥製剤中のβ-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25°C、12%相対湿度(RH)に1日保存して水分含量を調整した後、および種々の温度条件に保存した後、25、40、50°Cに保存した。製剤中に残存するβ-ガラクトシダーゼの活性を2-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシドを基質として用いて測定した。

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

25°C、11%相対湿度に1日保存することにより水分含量を調整した凍結乾燥製剤について、¹³C-CP/MAS NMRにより、25、40、50°Cにおけるβ-ガラクトシダーゼのカルボニル炭素のスピン-格子緩和時間(T₁)の測定を行った。

(2) PEG修飾リポソームおよびリポプレックスの表面水和状態の解析 リポプレックスの調製

カチオン性脂質としてはOH-CholとDOTAPを、中性のヘルパー脂質としてDOPEまたはコレステロール(Chol)を、PEG脂質として分子量2000を用いた(Fig. 1)。OH-Chol/DOPE/DSPE/DSPE-PEG(モル比1:1:x:0.2·x)、DOTAP/Chol

= 1/1,または2/1(モル比)にPEG-DSPE及びDSPEを同様に添加した3種類のリポソームを薄膜法にて調製し、超音波を照射して粒子径を約120nmにした。プラスミドDNAとしては、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として室温で5分間インキュベーションをして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)(Fig. 1)を0.2mol%総脂質に対して添加したリポソームを用いて、超純水、またはPBS 2mLで希釈し、希釈直後に、25°CでEx340nmにおけるEm440と490nmでの蛍光強度の差からGP(generalized polarization)値を求めて評価した。

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

誘電緩和測定は、デジタイジングオシロスコープ(54120B型、アジレント製)によって、25°Cの水中で行った。コントロールとしてpDNA水溶液の測定を行い、リポプレックスの測定値から差し引いた。

細胞内取り込みと遺伝子発現

FITC標識したpDNA(FITC-pDNA)を用いてリポプレックスを調製し、A549細胞ではリポプレックス投与後PBS中で2時間、Colon26(C26)細胞では、血清含有培地で3時間インキュベーションし、フローサイトメーターで測定した。遺伝子発現は、各細胞と24時間インキュベーション後、遺伝子発現量を測定した。なお、コントロールとして市販品のLipofectamine 2000(LA)を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究で行った実験は化学実験および培養細胞を用いた実験であり、倫理面の問題は無いと判断した。

C. 研究結果

(1) 凍結乾燥製剤中のβ-ガラクトシダーゼの分子運動性と安定性との関連

4種類の糖及びデキストラン、HESを添加剤として用いた凍結乾燥品中のβ-ガラクトシダーゼの安定性を活性変化に基づいて明らかにした。Fig.2に25、40、50℃におけるβ-ガラクトシダーゼの失活のタイムコースの例を示す。スクロースを添加剤として用いた凍結乾燥品中の25℃におけるβ-ガラクトシダーゼの失活は455日保存後もほとんど見られず、安定であった。50℃、40℃における失活のタイムコースは1次反応速度式(=指数関数)によって記述できた。トレハロース、スタキオース、イソマルトースを添加剤として用いた凍結乾燥品中のβ-ガラクトシダーゼの失活も1次反応速度式に従った。一方、デキストランおよびHES(Data not shown)を添加剤として用いた凍結乾燥製剤においては、検討した全ての温度において2相性の失活のタイムコースが観測された。失活のタイムコースは2つの指数関数の和にフィットできた。2相性のタイムコースが観測される理由の詳細は不明であるが、凍結乾燥によって活性低下を引き起こさない程度にβ-ガラクトシダーゼの構造に部分的な変化が起こり、そのような部分的に構造の変化したβ-ガラクトシダーゼは、保存中の失活を引き起こしやすく、それが保存初期の速やかな

活性の消失を引き起こすものと考えられる。Fig.3に失活速度定数に及ぼす添加剤の影響を示す。検討した添加剤の中で、スクロースが最も安定であり、トレハロース、イソマルトース、スタキオース、デキストラン、HESの順に速度定数が大きく、不安定であった。

製剤を構成する分子は様々なスケールの分子運動を行っている。構造緩和を引き起こすスケールの大きな分子運動性の指標として、エンタルピー緩和時間を等温マイクロ熱量測定により算出した。また、スケールの小さな分子運動性の指標として、タンパク質カルボニル炭素のスピン-格子緩和時間(T₁)を測定した。Fig.4に等温マイクロ熱量によって観測されるβ-ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤のHeat Flowの測定例を示す。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製剤について、12%RHで水分を調製し、40℃において測定した結果である。試料が測定温度と平衡に達するまでの約0.5日間に大きな発熱が観測され、その後、構造緩和に伴い、ゆっくり減衰する発熱が数日にわたって観測された。それ以降の発熱はほぼプラトーとなり、β-ガラクトシダーゼの分解に伴う発熱(P_k)と考えられる。観測されたHeat flow(P)の時間変化を1式に従いフィットし、τ₀、τ₁、βおよびP_kの値を推定した。ここで、ΔH_r(∞)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。分子運動性の指標であるτ_D^βの値は3式に従い計算した。τ_D^βおよびP_kの推定値をTable 1に示す。β-ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤のτ_D^βの値はスクロースを添加した製

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

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

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

剤が最も小さく、イソマルトース、トレハロース、スタキオースの順に大きかった。なお、デキストラン、HES 製剤は糖類に比べ T_g が高く、40℃におけるエンタルピー緩和速度が遅いことから、等温マイクロ熱量測定によるエンタルピー緩和時間の測定は困難であった。Fig.5 に乾燥状態の β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤について測定した緩和時間の温度依存性を示す。40℃における緩和時間は 12%RH で水分を調製した試料に比べ長いが、その順番はスクロース<トレハロース<スタキオースの順であり、水分を調整した試料と同じであった。傾きに差があり、温度が低くなるとその差は小さくなる傾向が見られた。 τ_D^β の値が小さいほど分子運動性が大きいことを意味し、失活速度定数の最も小さかったスクロース製剤が最もエンタルピー緩和を引き起こす分子運動性が高かった。従って、 β -ガラクトシダーゼの失活はエンタルピー緩和時間 ($=\tau_D^\beta$) を指標とする構造緩和を引き起こす分子運動によって引き起こされるのではないと考えられる。

12%RH で水分含量を調整した試料の 40℃における P_k の値は Table 1 に示すようにスクロース<イソマルトース<トレハロース<スタキオースであり、Fig.3 に示す失活速度定数と同じ順番であった。 P_k は β -ガラクトシダーゼの失活に伴う発熱を表すものであるから、 β -ガラクトシダーゼ 1 分子当たりの失活に伴う発熱の大きさが共存する添加剤によって影響を受けないと仮定すれば、 P_k は失活速度定数に比例すると期待できる。Fig.6 に示すように P_k と失活速度定数の関係はほぼ原点を通る直線によって表すことができた。この結果は P_k の値によって β -ガラクトシダーゼの安定性が予測できることを示唆する。乾燥状態の試料の P_k の値は Fig.7 に示すように、同じ温度で比較するとスクロース<トレハロース<スタキオースの順番であり、その値は 12%RH で水分を調製した試料の値より大きかった。この結果は水分を調整した β -ガラクトシダーゼに比べ乾燥状態

の β -ガラクトシダーゼが不安定であると考えられることができる。しかし、 β -ガラクトシダーゼ 1 分子当たり失活に伴う発熱の大きさが水分の影響を受ける可能性も排除できない。等温マイクロ熱量測定により P_k を適切に推定するためには、Heat flow の観測値に対するエンタルピー緩和に伴う発熱の寄与が小さくなるようにできるだけ長時間測定する必要がある。今回のデータは測定時間が十分でなく、エンタルピー緩和による熱と分解熱をうまく分離されていない可能性も否定できない。本研究においては保存中の水分を制御できるよう 12%RH で安定性試験を行ったため、乾燥状態における安定性試験は行っていない。今後、乾燥状態における安定性試験をおこない、 P_k による安定性予測の Feasibility の確認が必要である。

β -ガラクトシダーゼのスケールの小さな分子運動性の指標として、 β -ガラクトシダーゼカルボニル炭素の T_1 を測定した。ただし得られた値は β -ガラクトシダーゼの複数のカルボニル炭素の平均の緩和時間である。広い温度範囲における緩和時間の測定を行い、緩和時間の極小値を見出すことができれば、分子運動性の直接的な指標である τ_c (分子が 1 ラジアン回転するのに要する時間) を算出できるが、本研究では測定温度範囲が狭く、極小値が見いだされなかったため、 τ_c ではなく T_1 と β -ガラクトシダーゼの保存安定性との相関を検討した。Fig. 8 に種々の添加剤を用いて調製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 T_1 の温度変化を示す。 T_1 の値は温度が高いほど短かった。緩和時間が 1 つの相関時間によって記述できると仮定すれば、観測された T_1 は slow motional regime であることを示し、 T_1 が大きいほど Local な分子運動性が低いことを表す。Fig. 9 に T_1 と失活速度定数の関連を示す。デキストランや HES を添加剤として用いた製剤においては 2 相性の失活のタイムコースが得られ、2 つの速度定数が推定されたが、Fig. 9 には遅い失活の失活速度定数をプロットした。添加剤や測

定温度が異なる製剤について得られた結果であるにもかかわらず、失活速度定数の対数と T_1 の間には直線関係があるように見える。スクロースやトレハロースを添加した凍結乾燥品中の β -ガラクトシダーゼの 25°Cにおける失活速度は他のデータにくらべ直線からのずれが大きい、これらの凍結乾燥製剤においては β -ガラクトシダーゼはほとんど失活しておらず、速度定数の推定値に誤差が生じたものと考えられる。あるいは、これらの凍結乾燥品においては緩和時間が100秒近いので、スピン・格子緩和に対して分子運動以外のメカニズムが寄与しているためと考えられる。Fig. 9の結果はタンパクカルボニル炭素の T_1 に基づいて安定性が予測できることを示唆すると思われる。また、 T_1 の値をもとに適切な添加剤の選択が可能であると考えられる。

(2) PEG 修飾リポソームおよびリポプレックスの表面水和状態の解析

PEG 修飾リポプレックスの粒子径は約 200–400nm となり、ゼータ電位は約 40mV であった。

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されており、この値が高いほど脱水和状態にあるとされている。OH-Chol/DOPE (1/1)リポソーム及びリポプレックスでは、PEG 修飾率が1–5%上昇しても、PBSや水中でGP値の大きな変化はみられなかった(Fig. 10A, B)。一方、DOTAP/Chol (1/1),(2/1)リポソーム及びリポプレックスでは(1/1)の組成の方がGP値は高い値を示し、Chol量が多くなると脱水和されていることが示唆された(Fig.11)。また、どちらの DOTAP/Chol リポソーム、リポプレックスでも 5%PEG 修飾によって、有意にGP値が低下し、水和したことが示された。

誘電緩和時間測定を行ったところ、OH-Chol/DOPE (1/1)リポソームおよびリポプレックスの PEG 修飾量が増加すると緩和時間の増加が見られ、水和する傾向が観察された(Fig.12)。DOTAP/Chol リポソームでは(1/1),(2/1)のどちら

の組成でも PEG 修飾によって緩和時間に有意な差は確認されなかった。一方、リポプレックスにおいて(1/1)では PEG 修飾によって緩和時間に有意な差はみられなかったが、(2/1)では有意に緩和時間が延長し水和する傾向がみられた(Fig. 13)。これは、Fig.11 より PBS 中で測定した GP 値から、5%PEG 修飾リポプレックスは水和しているという結果と一致した。

OH-Chol/DOPE リポプレックスの A549 細胞での細胞内取り込みでは PEG 修飾率が上昇すると細胞内取り込みが有意に低下した(Fig. 14A)。また、A549 細胞での遺伝子発現では PEG 修飾率 0–1.5%では遺伝子発現に有意な差はみられなかったが、PEG 修飾率 5%では遺伝子発現が低下した(Fig. 14B)。DOTAP/Chol リポプレックスでは(1/1)、(2/1)のどちらの組成でも PEG 修飾すると C26 細胞内取り込みが上昇した。また、遺伝子発現はどの組成のリポプレックスでも 5%PEG 修飾によって低下した。

D. 考察

(1) 凍結乾燥製剤中の β -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凍結乾燥製剤中の β -ガラクトシダーゼの失活速度とカルボニル炭素の T_1 が関連することが明らかになった。タンパク質医薬品の安定性に対して、構造緩和を引き起こすスケールの大きな分子運動よりも局所的なスケールの小さな分子運動性が重要な役割を果たすことを示唆する結果と考えられる。タンパク質の例を増やし、今回得られた結果の普遍性の確認が今後の検討課題と考えられる。また、スケールの小さな分子運動性がなぜ保存安定性と関連するのかというメカニズムに関する検討も必要であると考えられる。

(2) PEG 修飾リポソームおよびリポプレックスの表面水和状態の解析

遺伝子導入用リポソームベクターでは、一般に

カチオン性脂質が用いられている。アニオン性の pDNA 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 pDNA の(+/-)荷電比を調整してカチオン性にしている。さらに *in vivo* の遺伝子送達のために、リポソームの表面を PEG で修飾している。従って、リポプレックスにおいては、pDNA とリポソーム脂質膜との強い静電的相互作用により、サイズや表面状態が変化することや、PEG 脂質が 4%以下のリポソーム修飾ではマッシュルーム構造をとり、それ以上ではブラシ状態をとることが知られている。これまではリポプレックスの表面状態は表面電位で評価されてきたが、ここでは PEG 修飾によるリポソームとリポプレックスの表面水和状態を測定し、その細胞内取り込み及び遺伝子発現への影響を調べた。

まず、カチオン性脂質としてコレステロール誘導体 (OH-Chol) からなるリポソームやそのリポプレックスの水和状態は、PEG 脂質の添加によって GP 値は変化しなかったが、誘電緩和時間は高くなり、水和する傾向を示した。OH-Chol の二級アミノ基の解離状態が PEG によって遮蔽されるため GP 値に変動がなかったと推察された。リポプレックスの水の誘電緩和時間と細胞内取り込み量は負の相関性が見られた ($R=0.946$)。

DOTAP からなるリポソームやそのリポプレックスの水和状態は、GP 値と誘電緩和時間からも、PEG 修飾が増加すると水和する傾向がみられた。しかし、このリポプレックスでは、水和しても細胞内取り込みは高くなった。この場合は GP でも水和状態が測定できたことより、PEG のリポソーム表面での運動性が低いと考えられ、リポソームの表面にある正電荷によって細胞内に取り込まれたと推察した。

リポソームとリポプレックスの GP 値と誘電緩和時間を比較すると、どちらの測定値からもリポプレックスになると、脱水和することがわかった。GP 値は蛍光物質の分布するカチオン性脂質の極

性基近傍の水和状態を反映している。誘電緩和時間は溶液中の水分子の平均の動きを反映しており、カチオン性脂質の極性基に水和した水分子と PEG 鎖に水和した水分子も緩和時間の増加に寄与していると推察される。したがって、リポソーム全体の水和状態を反映すると考えられる。

E. 結論

(1)凍結乾燥製剤中の β -ガラクトシダーゼの失活速度は用いる添加剤によって異なり、 β -ガラクトシダーゼのカルボニル炭素の T_1 も添加剤の影響を受けた。失活速度は T_1 と関連し、 T_1 を指標とした安定性予測の可能性が示唆された。

(2) 水の誘電緩和測定によって蛍光プローブを用いた方法(GP 測定)と同様に PEG 修飾リポソームの水和状態が測定できること、PEG の表面状態がリポプレックスの細胞内取り込みに影響することが明らかとなった。リポソーム表面での PEG のマッシュルーム・ブラシ分布状態も GP 測定と水の誘電緩和測定によって、推定できることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshie Maitania, Ayako Nakamura, Takumi Tanaka, Yukio Aso: Hydration of surfactant-modified and PEGylated cationic cholesterol-based liposomes and corresponding lipoplexes by monitoring a fluorescent probe and the dielectric relaxation time. *Int. J. Pharm.* **427**, 372-378 (2012).
- 2) S. Yoshioka, K.M. Forney, Y. Aso, M.J. Pikal: Effect of sugars on the molecular motion of freeze-dried protein formulations reflected by NMR relaxation times. *Pharm. Res.* **28**, 3237-3247 (2011).
- 3) 宮崎玉樹、阿曾幸男：熱分析による非晶質医薬品の結晶化の評価。 *熱測定*, **38**, 125-131 (2011).
- 4) Tamaki Miyazaki, Yukio Aso, Toru

- Kawanishi: Feasibility of atomic force microscopy for determining crystal growth rates of nifedipine at the surface of amorphous solids with and without polymers. *J. Pharm. Sci.*, **100**, 4413-4420 (2011).
- 5) 阿曾幸男, 太田鋼, 宮崎玉樹, 川西 徹: 医薬品添加剤の結晶化度測定法に関する研究. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **42**, 540-545 (2011).
 - 6) Y. Iwase, Y. Maitani, Dual functional octreotide-modified liposomal irinotecan leads to high therapeutic efficacy for medullary thyroid carcinoma xenografts. *Cancer Sci.* **103**(2), 310-6 (2012).
 - 7) Shiraishi K, Harada Y, Kawano K, Maitani Y, Hori K, Yanagihara K, Takigahira M, Yokoyama M. Tumor Environment Changed by Combretastatin Derivative (Cderiv) Pretreatment That Leads to Effective Tumor Targeting, MRI Studies, and Antitumor Activity of Polymeric Micelle Carrier Systems. *Pharm Res.* **29**(1), 178-86 (2012).
 - 8) FT Fatema, Y. MAITANI, T. AKAIKE, mRNA delivery through fibronectin associated liposome-apatite particles: a new approach for enhanced mRNA transfection to mammalian cell, *Biol. Pharm. Bull.* **35**(1), 111-5 (2012).
 - 9) Y. Hattori, Y. Nagaoka, M. Kubo, H. Yamasaku, Y. Ishii, H. Okita, H. Nakano, S. Uesato, Y. Maitani, Antitumor effect of liposomal histone deacetylase inhibitor-lipid conjugates in vitro, *Chem. Pharm. Bull.* **59**(11), 1386-1392 (2011).
 - 10) A. Wakasugi, M. Asakawa, M. Kogiso, T. Shimizu, M. Sato, Y. Maitani, Organic nanotubes for drug loading and cellular delivery. *Int J Pharm.* **413**(1-2), 271-278 (2011).
 - 11) Y. Iwase, Y. Maitani, Octreotide-targeted liposomes loaded with CPT-11 enhanced cytotoxicity for the treatment of medullary thyroid carcinoma in vitro, *Molecular Pharmaceutics*, **8**(2), 330-337 (2011).
 - 12) Y. Maitani, PEGylated lipidic systems with prolonged circulation longevity for drug delivery in cancer therapeutics, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **21**, 27-34 (2011).
 - 13) K. Kawano, Y. Maitani, Effects of polyethylene glycol spacer length and ligand density on folate receptor targeting of liposomal doxorubicin in vitro, *J Drug Delivery*, **160**, 967 (2011).
 - 14) Y. Harada, T. Yamamoto, M. Sakai, T. Saiki, K. Kawano, Y. Maitani and M. Yokoyama, Effects of organic solvents on drug incorporation into polymeric carriers and morphological analyses of drug-incorporated polymeric micelles. *Int J Pharm.* **404**(1-2), 271-280 (2011).
 - 15) T. Izumisawa, Y. Hattori, M. Date, K. Toma, Y. Maitani, Cell line-dependent internalization pathways determine DNA transfection efficiency of decaarginine-PEG-lipid, *Int J Pharm.* **404**, 264-270 (2011).
- ## 2. 学会発表
- 1) Yukio Aso*, Tamaki Miyazaki, and Toru Kawanishi: Crystallinity of ground lactose hydrate determined by ¹³C-NMR. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting and Exposition (2011.10).
 - 2) 阿曾幸男, 宮崎玉樹, 川西徹: 等温マイクロ熱量計による非晶質ニフェジピン粉砕物の物理的安定性の評価. 日本薬剤学会第 26 年会 (2011.5).
 - 3) 阿曾幸男, 宮崎玉樹, 奥田晴宏: ¹³C-固体高分解能 NMR による市販製剤中のジヒドロピリジン系医薬品の存在状態の検討. 日本薬学会第 132 年会(2012.3).
 - 4) 田中拓海, 服部喜之, 米谷芳枝 アンギオテンシン II 昇圧下におけるリポプレックスの腫瘍内分布 日本薬学会 第 131 年会(2011.3)
 - 5) 加藤真子, 服部喜之, 米谷芳枝 コラゲナーゼ処理による静脈内投与したリポプレックスの腫瘍集積性及び遺伝子発現への影響 日本薬学会 第 131 年会(2011.3)
 - 6) 玉井理大, 川野久美, 米谷芳枝 Sunitinib 封入正電荷リポソームの調整と抗腫瘍効果の評価 日本薬学会 第 131 年会(2011.3)
 - 7) 山作晴香, 服部喜之, 米谷芳枝 がん遺伝子導入用負電荷ポリマー被覆リポプレックス製剤

- の開発 日本薬剤学会 第 26 年会(2011.5)
- 8) 岩瀬由布子, 米谷芳枝 イリノテカン封入オクトレオチド修飾ナノ粒子製剤による甲状腺髄様がん治療効果 日本薬剤学会 第 26 年会(2011.5)
- 9) 山口美智子, 内藤陽子, 青枝大貴, 石井健, 白石貢一, 横山昌幸, 米谷芳枝 Rhodamine 標識 PEG 修飾リポソームによる ABC 現象誘導の解明第 27 回日本 DDS 学会学術集会(2011.6)
- 10) 中村由梨, 昆真生, 眞田絵実, 浅川真澄, 小木曾真樹, 清水敏美, 米谷芳枝 イリノテカン封入オーガニックナノチューブを用いた非球形キャリアーの体内分布の評価 27 回日本 DDS 学会学術集会(2011.6)
- 11) Haruka Yamasaku, Yoshiyuki Hattori, Yoshie Maitani Enhanced tumor transfection after systemic injection of lipoplex coated with anionic polymers 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society(2011.7)
- 12) 服部喜之, 加藤真子, 久保愛美, 米谷芳枝 コラゲナーゼ処理した担がんマウスにおけるリポプレックスの腫瘍集積性及び遺伝子発現 アンチセンス・遺伝子・デリバリー シンポジウム 2011(2011.9)
- 13) 中村司, 服部喜之, 大野浩章, 藤井信孝, 米谷芳枝 新規正電荷コレステロール誘導体を用いたナノ粒子製剤の前立腺がんに対する遺伝子導入効率の評価 アンチセンス・遺伝子・デリバリー シンポジウム 2011(2011.9)
- 14) Y. Maitani Functional nanoparticles for cancer therapy 18th International Symposium on Microcapsulation(2011.9)
3. その他
なし

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

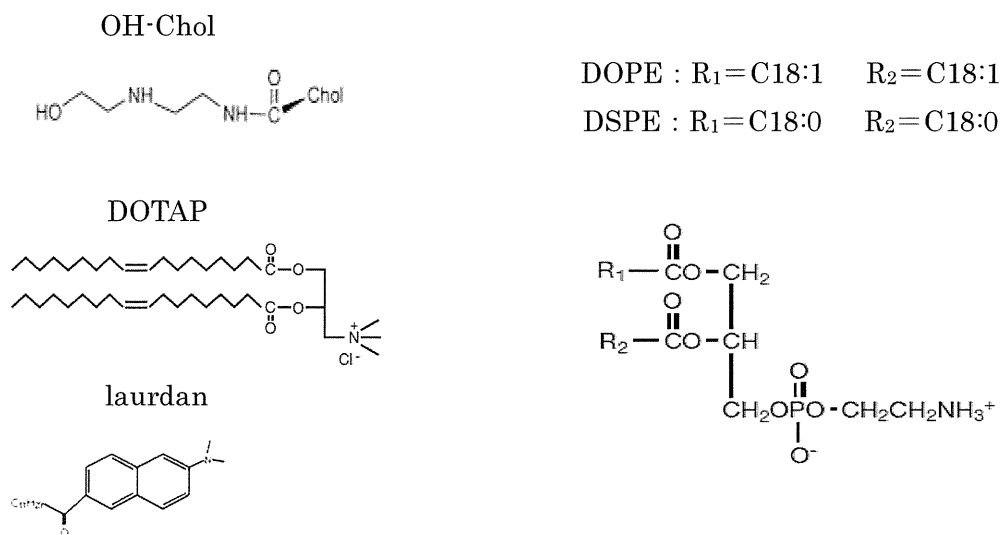


Fig. 1. Chemical structures of lipids and laurdan.

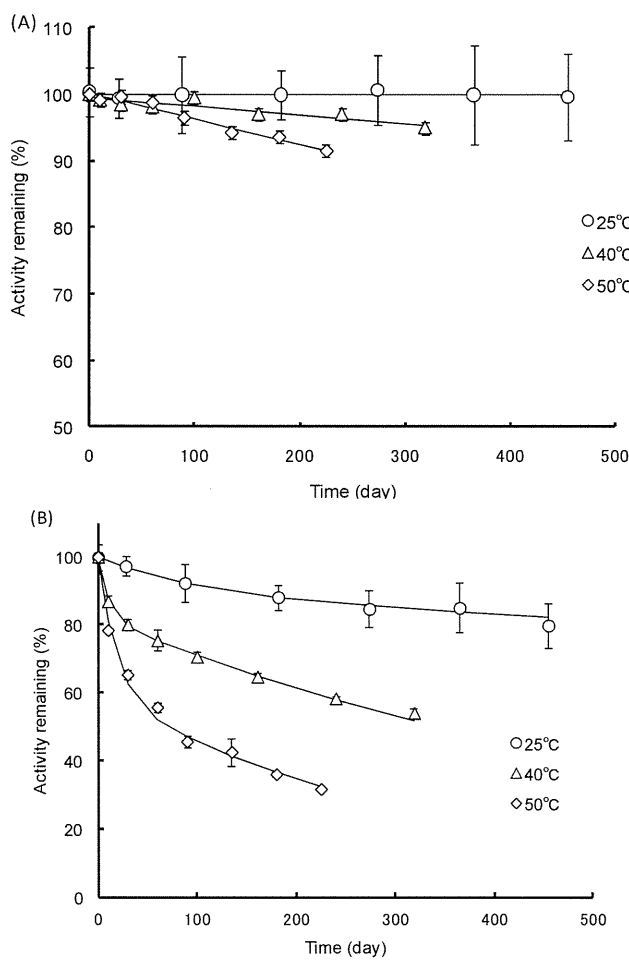


Fig.2. Typical time-courses of inactivation of β -galactosidase in lyophilized formulations with sucrose (A) and dextran (B) at 25, 40 and 50°C.

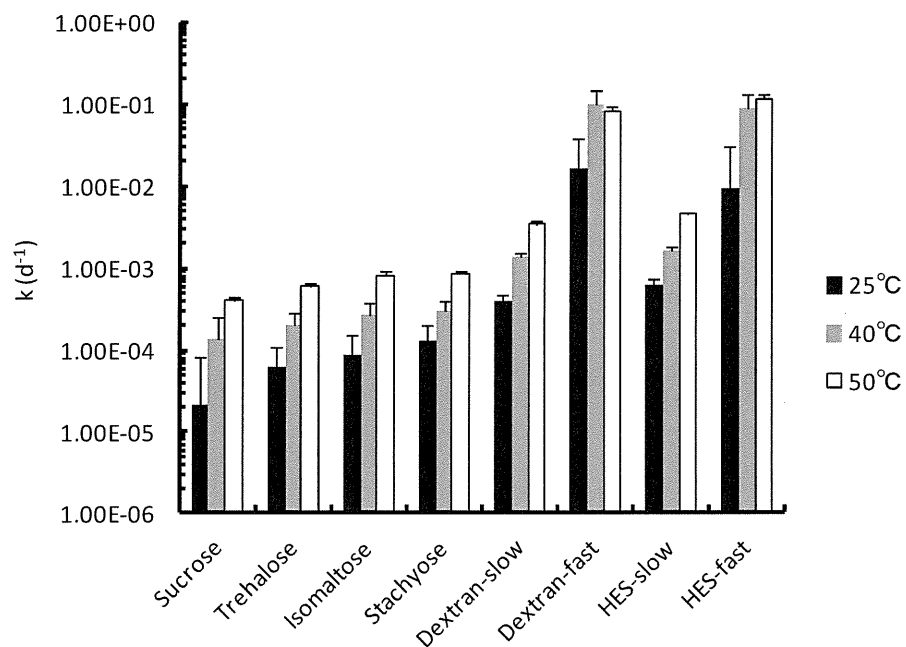


Fig.3. Inactivation rate constant of β -galactosidase in lyophilized formulations with various excipients at 25, 40 and 50°C.

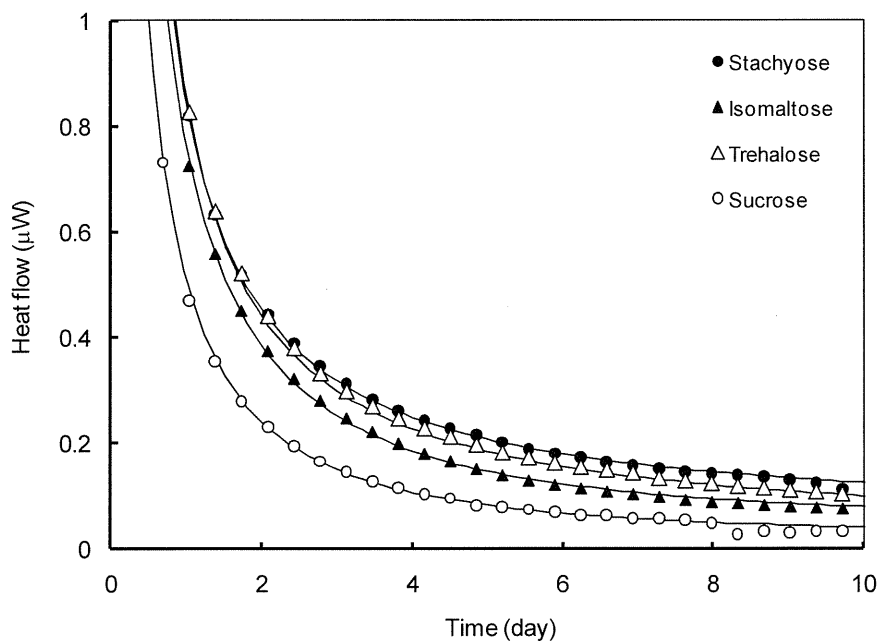


Fig.4. Typical heat flow-time curves for lyophilized formulations of β -galactosidase at 40°C.

Table 1 T_g , change in the heat capacity at T_g (ΔC_p), relaxation time (τ_D^β), P_k and water content of lyophilized β -galactosidase containing various excipients

Excipient	T_g ($^{\circ}\text{C}$)	ΔC_p ($\text{Jg}^{-1}\text{K}^{-1}$)	τ_D^β (hr) at 40°C	P_k (μW) at 40°C	Water content (%)
Sucrose	46.3 ± 0.2^a	0.41 ± 0.02^a	20, 25	0.024, 0.021	2.8 ± 0.2^a
Trehalose	60.7 ± 0.7^a	0.34 ± 0.01^a	49, 50	0.038, 0.038	3.0 ± 0.3^a
Stachyose	69.5 ± 1.2^a	0.30 ± 0.01^a	59, 46	0.054, 0.055	3.1 ± 0.3^a
Isomaltose	54.2 ± 0.9^a	0.33 ± 0.12^a	33, 24	0.051, 0.050	2.8 ± 0.3^a
HES	185	0.18	ND	ND	3.2 ± 0.4^a
デキストラン	189	0.21	ND	ND	3.7 ± 0.4^a

^a): average \pm standard deviation (n=3).

ND: not determined.

Water content of samples were adjusted by storing at 25°C and 12%RH for 1d.

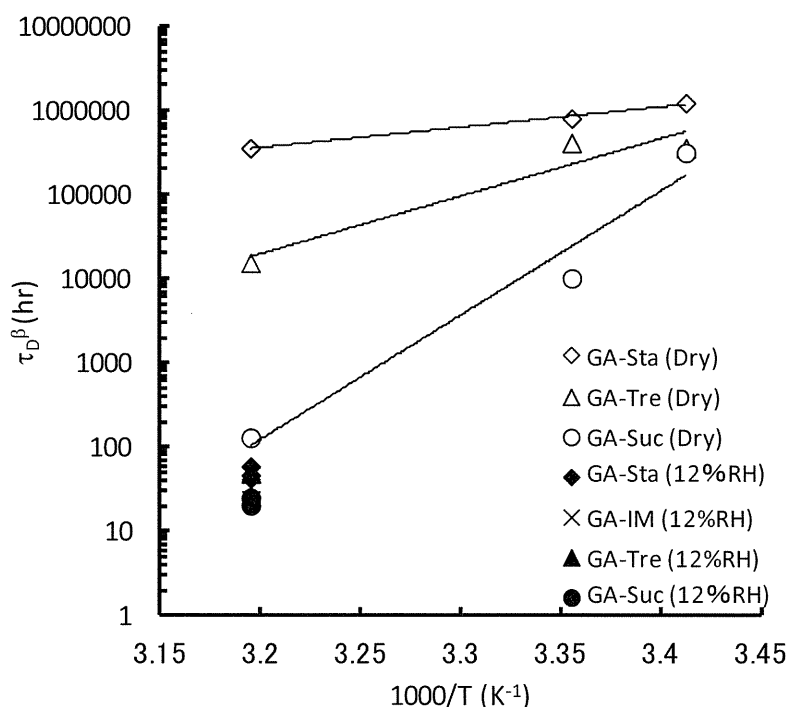


Fig.5. Enthalpy relaxation time estimated from heat flow-time curve for lyophilized formulations of β -galactosidase

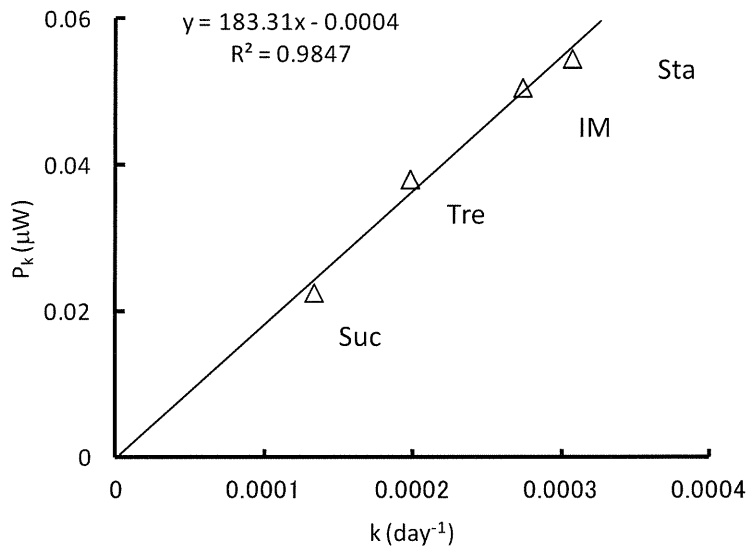


Fig.6. Correlation between P_k determined from heat flow-time curve and inactivation rate constant of β -galactosidase in lyophilized formulations with various excipients at 40°C.

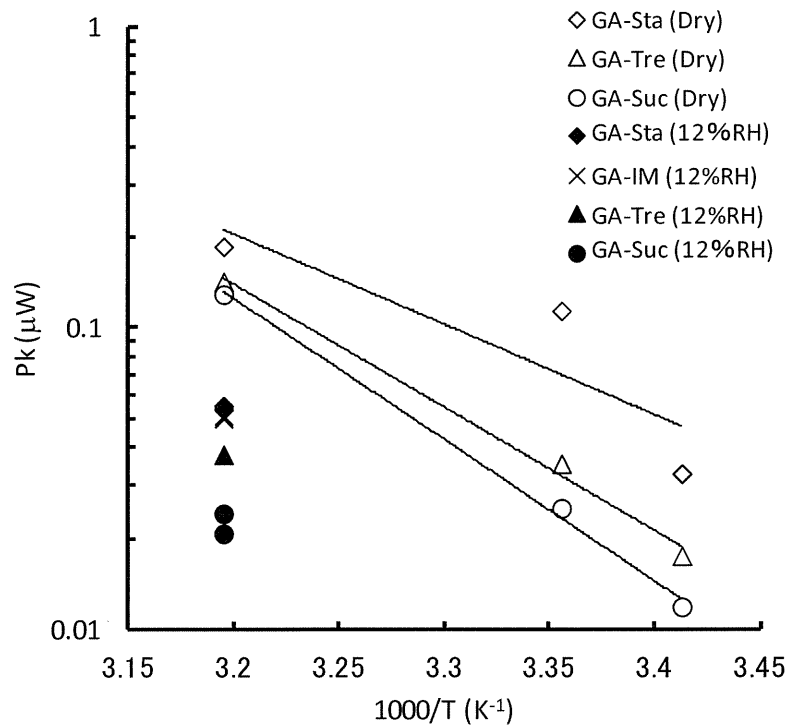


Fig.7. P_k determined from heat flow-time curve for lyophilized formulations of β -galactosidase containing various excipients.

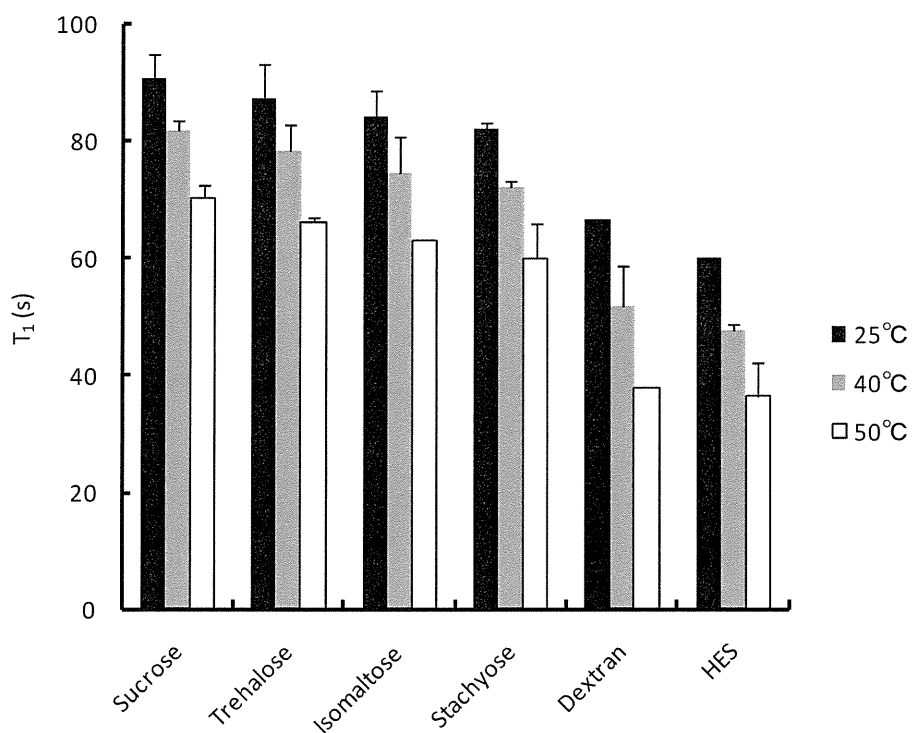


Fig.8. T_1 of carbonyl carbons of β -galactosidase in lyophilized formulations with various excipients at 25, 40 and 50°C.

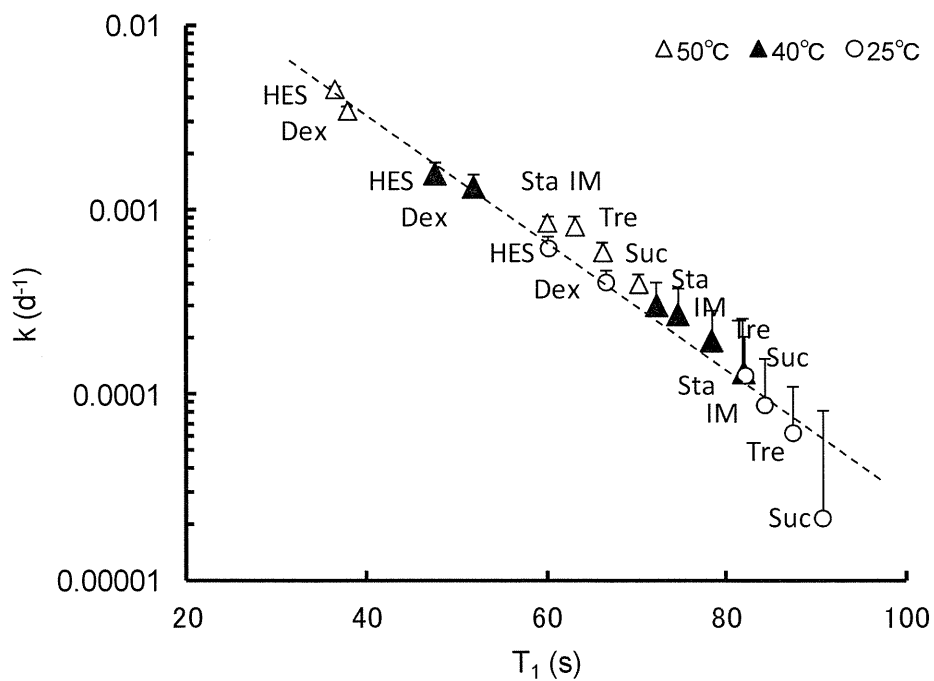


Fig.9. Correlation between T_1 carbonyl carbons and inactivation rate constant of β -galactosidase in lyophilized formulations with sucrose (A) and dextran (B) at 25, 40 and 50°C.

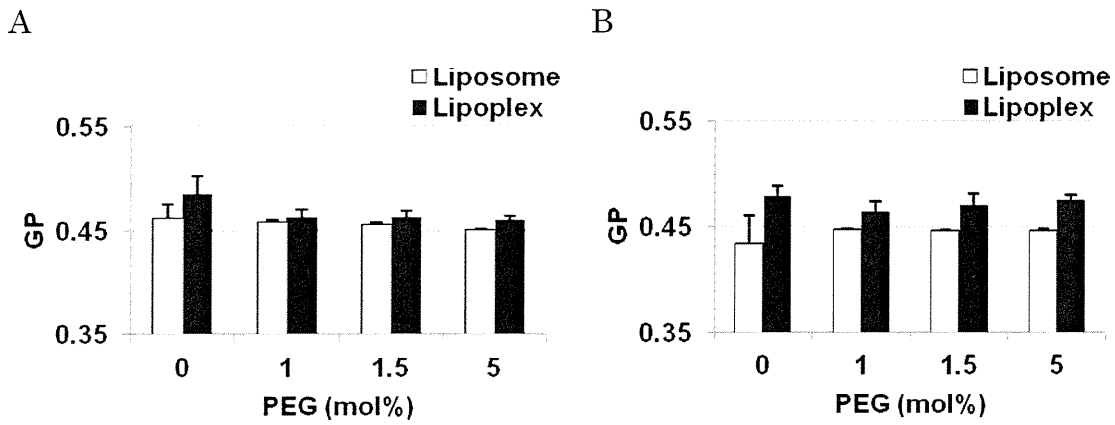


Fig. 10 The change of surface hydration of PEGylated OH-Chol/DOPE-liposome and lipoplex by PEGylation amount as monitored by laurdan generalized polarization (GP) in PBS (A) and water (B) at a charge ratio of (+/-) 3.

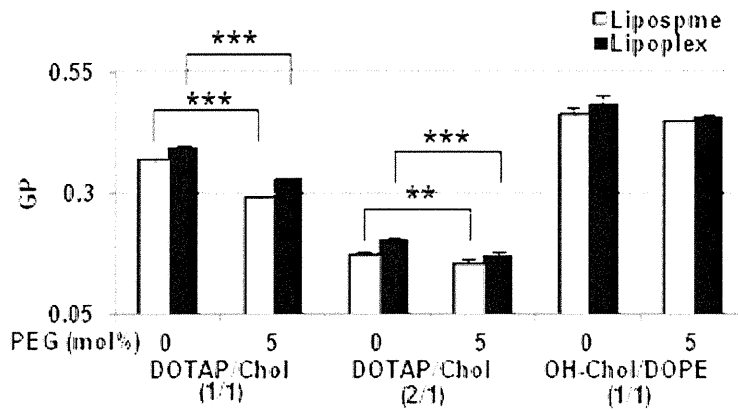


Fig. 11 The change of surface hydration of PEGylated liposome and lipoplex by PEGylation amount as monitored by laurdan generalized polarization (GP) in PBS at a charge ratio of (+/-) 3.

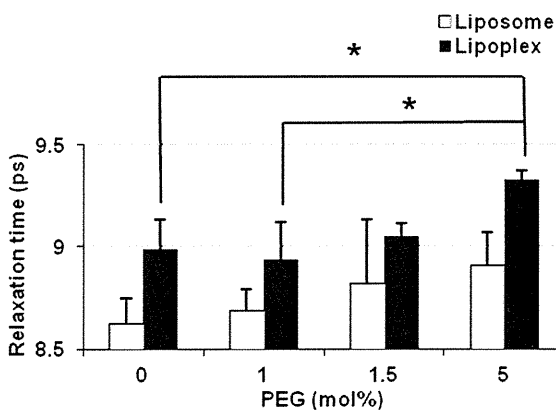


Fig. 12 Dielectric relaxation of OH-Chol/DOPE (1/1) liposomes and their lipoplexes in Milli-Q

water.

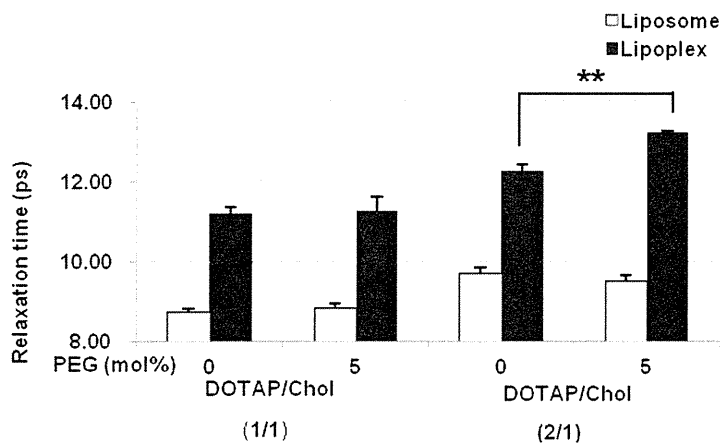


Fig. 13 Dielectric relaxation of DOTAP/Chol (1/1),(2/1) liposomes and their lipoplexes in Milli-Q water.

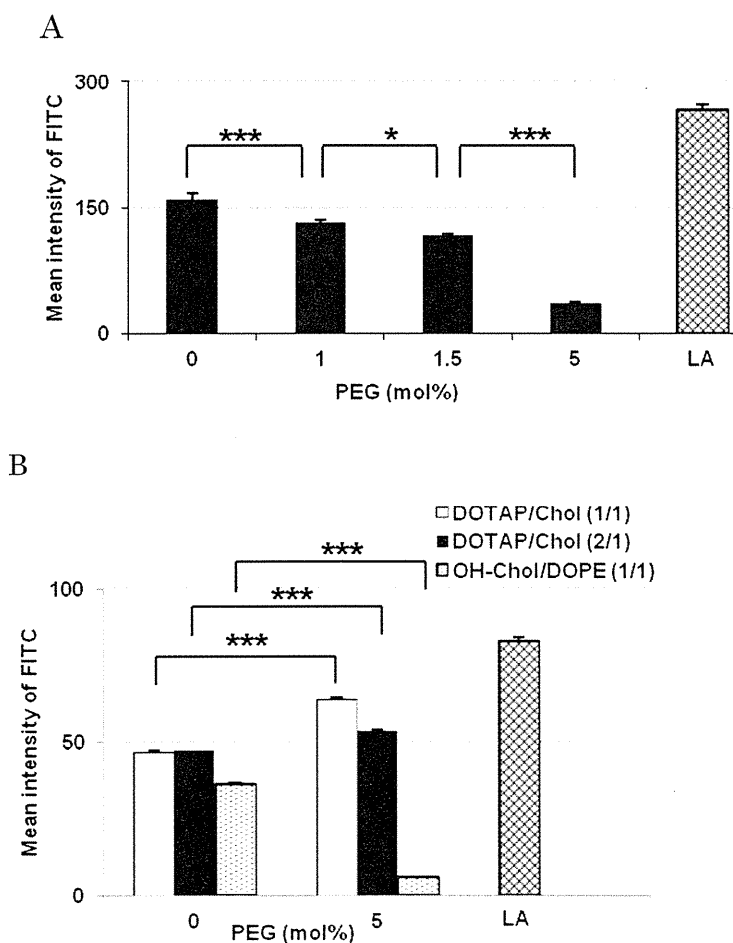


Fig. 14 Cellular association of FITC-DNA of PEGylated OH-Chol-liposomes (A) and DOTAP/Chol (1/1),(2/1) liposomes (B) at a charge ratio of (+/-) 3. Each result represents the mean±S.D. (n=3).

*** P<0.001 and * P<0.05.

別添 4

厚生科学研究費補助金（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）
分担研究報告書

PEG 修飾リポプレックスの表面水和状態による細胞内取り込み及び遺伝子発現への影響

分担研究者 米谷芳枝 星薬科大学 医薬品化学研究所 教授

現在、*in vivo* 遺伝子導入用ベクターである正電荷リポソームとプラスミド DNA の複合体(リポプレックス)は、遺伝子導入効率を上げるために、poly(ethylene glycol (PEG)脂質で修飾されることが多い。リポプレックスの粒子径とゼータ電位は測定されているが、PEG の表面水和状態の測定の報告は少ない。本研究では、PEG 修飾リポプレックスの表面水和状態を蛍光標識による GP 測定と水の誘電緩和を測定し、細胞内取り込み及び遺伝子発現への影響を調べた。その結果、水の誘電緩和測定によって PEG 修飾リポソームの水和状態が測定できることと、PEG の表面状態がリポプレックスの細胞内取り込みに影響することが明らかとなった。また、PEG 修飾リポソーム表面での PEG のマッシュルーム・ブラシ分布状態も GP 測定と水の誘電緩和測定によって、推定できることが示唆された。

A. 研究目的

現在、正電荷リポソームはプラスミド DNA と複合体（リポプレックス）を調製し、遺伝子導入ベクターとして用いられている。In vivo での遺伝子導入効率を上げるために、PEG 脂質でリポソームやリポプレックスを修飾しているが、PEG の水和状態については未だ報告されていない。本研究では、PEG 修飾リポプレックスの表面水和状態を、蛍光物質を用いた蛍光測定と誘電緩和時間測定から検討し、水和状態による細胞内取り込みと遺伝子発現効率との関係を調べた。

私たちはこれまでに、リポプレックスの表面水和状態を蛍光標識による GP (generalized polarization) 測定によって測定し、細胞内取り込みを評価してきた。そこで、本年度は PEG 脂質で修飾したリポソームおよびそのリポプレックスの表面水和状態を、GP 測定と水の誘電緩和時間測定の二つの方法から検討を行った。これらの結果は、遺伝子導入用リポソームベクターの開発の上で新しい知見を与え、誘電緩和時間測定をすることによってリポソームの最適 PEG 修飾率の予測が可能となることが期待される。

B. 研究方法

リポプレックスの調製

カチオン性脂質としては OH-Chol と DOTAP を、中性のヘルパー脂質として DOPE またはコレステロール(Chol)を、PEG 脂質として分子量 2000 を用いた(Fig. 1)。OH-Chol / DOPE / DSPE / DSPE-PEG (モル比 1:1:x:0.2 · x)、DOTAP/Chol = 1/1,または 2/1 (モル比)に PEG-DSPE 及び DSPE を同様に添加した 3 種類のリポソームを薄膜法にて調製し、超音波を照射して粒子径を約 120nm にした。プラスミド DNA としては、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 として室温で 5 分間インキュベーションをして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) (Fig. 1)を 0.2mol% 総脂質に対して添加したリポソームを用いて、超純水、または PBS

2mLで希釈し、希釈直後に、25°CでEx340nmにおけるEm440と490nmでの蛍光強度の差からGP (generalized polarization) 値を求めて評価した。

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

誘電緩和測定は、デジタイジングオシロスコープ(54120B型、アジレント製)によって、25°C水中で行った。コントロールとしてpDNA水溶液の測定を行い、リポプレックスの測定値から差し引いた。

細胞内取り込みと遺伝子発現

FITC 標識した pDNA (FITC-pDNA)を用いてリポプレックスを調製し、A549 細胞ではリポプレックス投与後 PBS 中で 2 時間、Colon26 (C26) 細胞では、血清含有培地で 3 時間インキュベーションし、フローサイトメーターで測定した。遺伝子発現は、各細胞と 24 時間インキュベーション後、遺伝子発現量を測定した。なお、コントロールとして市販品の Lipofectamine 2000 (LA)を用いた。

C. 研究結果

PEG 修飾リポプレックスの粒子径は約 200–400nm となり、ゼータ電位は約 40mV であった。

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されており、この値が高いほど脱水和状態にあるとされている。OH-Chol/DOPE (1/1)リポソーム及びリポプレックスでは、PEG 修飾率が 1–5%上昇しても、PBS や水中で GP 値の大きな変化はみられなかった(Fig. 2A, B)。一方、DOTAP/Chol (1/1),(2/1)リポソーム及びリポプレックスでは(1/1)の組成の方が GP 値は高い値を示し、Chol 量が多くなると脱水和されていることが示唆された(Fig.3)。また、どちらの DOTAP/Chol リポソーム、リポプレックスでも 5%PEG 修飾によって、有意に GP 値が低下し、水和したことが示された。

誘電緩和時間測定を行ったところ、OH-Chol/DOPE (1/1)リポソームおよびリポプレックスの PEG 修飾量が増加すると緩和時間の増加が見られ、水和する傾向が観察された(Fig.4)。DOTAP/Chol リポソームでは(1/1),(2/1)のどちらの組成でも PEG 修飾によって緩和時間に有意な差は確認されなかった。一方、リポプレックスにおいて(1/1)では PEG 修飾によって緩和時間に有意な差はみられなかったが、(2/1)では有意に緩和時間が延長し水和する傾向がみられた(Fig. 5)。これは、Fig.3 より PBS 中で測定した GP 値から、5%PEG 修飾リポプレックスは水和しているという結果と一致した。

OH-Chol/DOPE リポプレックスの A549 細胞での細胞内取り込みでは PEG 修飾率が上昇すると細胞内取り込みが有意に低下した(Fig. 6A)。また、A549 細胞での遺伝子発現では PEG 修飾率 0–1.5%では遺伝子発現に有意な差はみられなかったが、PEG 修飾率 5%では遺伝子発現が低下した(Fig. 6B)。DOTAP/Chol リポプレックスでは(1/1)、(2/1)のどちらの組成でも PEG 修飾すると C26 細胞内取り込みが上昇した。また、遺伝子発現はどの組成のリポプレックスでも 5%PEG 修飾によって低下した。

D. 考察

遺伝子導入用リポソームベクターでは、一般にカチオン性脂質が用いられている。アニオン性の pDNA 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 pDNA の(+/-)荷電比を調整してカチオン性にしている。さらに in vivo での遺伝子送達のために、リポソームの表面を PEG で修飾している。従って、リポプレックスにおいては、pDNA とリポソーム脂質膜との強い静電的相互作用により、サイズや表面状態が変化することや、PEG 脂質が 4%以下のリポソーム修飾ではマッシュルーム構造をとり、それ以上ではブラッシン状態をとることが知られている。これまではリ