

称号及び氏名 博士（工学） 吉野 敬亮

学位授与の日付 平成 24 年 9 月 30 日

論文名 「Design and Evaluation of Functional Liposomes for  
Efficient Drug Delivery

（高効率な薬物送達のための機能性リポソームの設計と評価）」

論文審査委員 主査 教授 河野 健司

副査 教授 久本 秀明

副査 教授 坂東 博

## 論文要旨

1900 年初頭、エールリッヒにより「人体に悪影響を与えず病原体のみを攻撃する魔法の弾丸 (Magic bullet)」と表現されたことを始まりとする Drug Delivery System (DDS) の概念は、その後 100 年の月日を経て様々な形態で実用化され、DDS 製剤として市場に登場している。近年、新規医薬品の開発難度が増すとともに、既存医薬品に付加価値を与えることが出来る DDS 技術の革新に期待が高まっている。「必要なとき」「必要な場所で」「必要な量だけ」作用部位に送り込むという DDS の概念は、様々な微粒子キャリアを中心に研究が進められてきた。中でもリポソームは、細胞膜と同じ構成成分であるリン脂質から成る閉鎖小胞であり、その膜中および内水相にそれぞれ疎水性薬物および水溶性薬物を保持することができ、しかも生体適合性に優れているため、多様な薬物を運ぶことができる DDS 素材として特に優れた特性を有している。したがって、リポソームについて基礎から臨床まで幅広く数多くの研究が行われ、DDS としての有用性が明らかにされている。

リポソームを標的部位に送達する方法としてはいくつか挙げられるが、中でも血管透過性の違いを利用した薬物送達がよく知られており、DDS 製剤の設計において広く活用されている。一般に、癌組織や炎症部位では血管新生が活発であり、しかもその血管壁の透過性が亢進している。したがって、正常組織においては血管壁を通過することが困難な数 10 nm~200 nm 程度の粒子が、このような癌組織や炎症部位においては血管壁を透過するため、それらの組織、部位に集積しやすいことが知られており、EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention) と呼ばれている。そのため、リポソームの粒子径を 200 nm 以下に制御することで、EPR 効果によって標的部位への集積を促進することが可能となる。しかしながら、的確に粒子径制御されたリポソームを血液中に投与した場合においても、血清タンパク質や細網内皮系との相互作用により、リポソームが血中から速やかに排除されてしまうため、EPR 効果による標的組織への効果的な集積化が困難であった。

この課題を解決する方法として、近年、ポリエチレングリコール (PEG) でリポソームの表面を被

覆する技術（PEGylation）が開発された。この技術を用いることでリポソームの表面を PEG 鎖で覆い隠すことができるため、血清タンパク質や細網内皮系との物理的相互作用を抑制するが可能になる。その結果として、リポソームが細網内皮系に補足されることなく血中に長く存在し、血中滞留性が飛躍的に向上した。このような PEGylation と粒子径制御を行うことで、リポソームによる血中から標的組織細胞近傍への薬物送達の効率が飛躍的に高められて以来、DDS としてのリポソームの有用性は益々高まっている。

しかし、リポソームによる高効率な薬物送達を実現するためには、まだいくつかの課題が残されている。特に、内封した薬物を標的細胞に直接作用させるための薬物放出制御技術についてはこれまでに確立されていない。実際、高い血中滞留性の実現を目指し設計されたりポソーム製剤である Doxil は、薬物を放出することなく末梢系に蓄積してハンド・フット・シンドロームとよばれる新たな副作用を引き起こすことが問題視されている。このため、薬物の血中滞留性を高めるだけでなく、適したタイミングで内封した薬物を放出する放出制御技術がリポソーム製剤の有効性を高めるうえで重要となっている。このように、「必要なとき」「必要な場所で」「必要な量だけ」薬物を送達するという DDS の概念をより高い次元で具現化するためには、リポソームの新たな機能設計および機能を評価する分析法を含む技術革新が不可欠である。

本論文では、高効率な薬物送達を実現するための機能性リポソームの構築法の確立を目指し、機能性高分子を用いた新規なりポソーム機能化法の開拓とその特性評価のための新規リポソーム分析法の開発について研究を行った。

第 1 章では、本論文の緒言として、研究の背景と目的および本論文の概要について述べた。

第 2 章では、PEG 修飾リポソームの表面状態を分析する新しい分析法の検討を行った。弱イオン交換カラムとリニアイオングラジエント法を組み合わせることにより、リポソーム表面を覆っている PEG 鎖の量に応じて PEG 修飾リポソームを分離することができる新しいリポソーム分析法を確立した。今までの分析法は、PEG 修飾リポソームを有機溶媒に溶解した溶液の成分分析に基づくものであり、リポソームサンプル中の PEG 修飾量の分布や不均一性を評価することが不可能であり、このことがリポソームの品質管理の観点から大きな問題であった。本研究で確立されたりポソーム分析法は、PEG 修飾リポソームを溶解することなく、そのままの状態を分析することを可能とするものであり、リポソームの品質管理をするうえで有用性が極めて高い。また、本分析法を用いたりポソームの PEG 修飾過程の解析により、均質な PEG 修飾リポソームを製造するためのリポソーム調製条件を明らかにした。

第 3 章では、リポソームの PEG 修飾法がリポソーム DDS の性能に及ぼす影響について検討した。リポソーム膜の外側の表面だけ PEG 修飾したりポソームと、リポソーム膜の両面を PEG 修飾したりポソームの特性について比較検討した。その結果、外側の表面だけ PEG 修飾したりポソームは、両面を PEG 修飾したりポソームに比べて、PEG 脂質の分解の抑制およびリポソームの血中滞留性の向上が認められた。さらに、前者の PEG 修飾リポソームは、後者のリポソームに比べて約半分量の PEG 脂質の使用によって、同程度の遮蔽効果を有する PEG 修飾リポソームを得ることができる。これらの結果より、製剤安定性および血中滞留性に優れた PEG リポソームの調製法を開拓した。

第 4 章では、抗癌剤イリノテカンを内封した PEG 修飾リポソームの特性に及ぼす PEG 修飾法の影響を検討した。リポソーム膜の外側の表面を PEG 修飾したりポソームとリポソーム膜の両面を PEG

修飾したリポソームを作製し、イリノテカンを封入した。第3章の結果と同様に、イリノテカン封入したリポソームにおいても、外側の表面を PEG 修飾したリポソームは、両面を PEG 修飾したリポソームに比べて PEG 脂質の分解の抑制、リポソームの薬物保持性能の向上、およびリポソームの血中滞留性の向上が認められた。また更に動物実験の結果から、外側の表面を PEG 修飾したリポソームがより高い抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。これらの結果は、優れた性能を有する PEG 修飾リポソームの製造法の開拓につながるものである。

第5章では、薬物放出性能を評価するための新しい解析方法の開発を行った。リポソーム DDS の品質管理の観点から、リポソームの薬物放出性能を解析する方法を確立することが必要とされている。リポソームの内部に薬物を封入する方法として、リポソーム内水相と外水相との pH 勾配を利用する pH 勾配法が広く用いられている。そこで、pH 勾配法で薬物封入されたリポソームの薬物放出性能を評価する分析法の開発を行った。リポソーム外水相の pH を調節してリポソーム内外に形成された pH 勾配を解消させることで、薬物の放出を促進できることを見出し、このことを利用することによって、リポソームの薬物放出特性を迅速に測定できることを明らかにした。この分析法は、薬物放出特性の観点からのリポソーム品質管理のための評価法として有用である。

第6章では、リポソームの薬物放出制御の観点から、温度刺激に応答するリポソームの設計について検討した。体温付近（約 40°C）に相転移温度を有する温度感受性高分子として N-イソプロピルアミド (NIPAM) 共重合体を合成した。この温度感受性共重合体を複合化したリポソームは、体温においては内包物を安定に保持するが、共重合体の相転移温度以上において急激に内包物の放出を引き起こすことがわかった。このリポソームの温度応答特性は血清存在下で顕著に低下したが、短鎖の PEG をもつ脂質をリポソームに含有させることで、血清存在下における温度応答特性の低下を防止できることを見出した。しかも、短鎖 PEG 脂質の含有により、リポソームの内包物保持性能はさらに向上したことから、微小な温度変化で放出量を高度に制御することができる高感度温度応答性リポソームの構築を実現した。

第7章では、リポソームに鋭敏な温度応答性を与えるための温度応答性高分子の構造設計を行った。40°C 付近に相転移し、転移エンタルピーの異なる 3 種類の NIPAM 共重合体を合成した。大きな転移エンタルピーを示す NIPAM 共重合体を複合化したリポソームは、共重合体の転移温度以上において顕著な内包物放出を示した。一方、小さな転移エンタルピーを示す NIPAM 共重合体を複合化したリポソームは、共重合体の転移温度以上において顕著な粒径の増大を引き起こした。適切な温度感受性高分子でリポソームを修飾することで、多様な機能発現を温度制御できる温度応答性リポソームを構築できることを明らかにした。

第8章では、本論文で得られた結論の総括を行った。

## 審査結果の要旨

本論文では、高効率な薬物送達を実現するための機能性リポソームの設計と評価に関する研究成果をまとめたものであり、次のような成果を得ている。

- (1) 弱イオン交換カラムとリニアイオングラジエント法を組み合わせることにより、リポソーム表面上のポリエチレングリコール (PEG) 修飾量に応じて PEG 修飾リポソームを分離することができる新しい分析法を確立した。本分析法は、実用的な観点から有用な PEG 修飾リポソームの品質管理をするうえで有用性が極めて高い。
- (2) リポソーム膜の外側のみを PEG 修飾したリポソームとリポソーム膜の両面を PEG 修飾したリポソームの薬物送達システムとしての性能と特性を比較検討し、リポソーム中における PEG 脂質の分解の抑制、薬物保持性能の向上、血中滞留性の向上によって抗腫瘍効果の高いリポソームの製造法を確立した。
- (3) リポソーム内外に形成された pH 勾配を解消して、リポソームに内包された薬物の放出を誘導することを明らかにすることで、リポソーム製剤の薬物放出特性の迅速に調べるための新しい分製法を確立した。本分析法は、リポソームの薬物放出性能の観点からの品質管理をするうえで極めて有用である。
- (4) 約 40°C 付近で相転移する温度応答性共重合体をリポソームに複合化することによって、加温によって放出を誘起できる温度応答性リポソームを開発した。また、このリポソームに、短鎖の PEG 脂質を含有させることで、血清安定性に優れしかも微小な温度変化に応答して内包薬物を放出する、新しいタイプの高感度型温度応答性リポソームの構築に成功した。
- (5) 40°C 付近で相転移し、転移エンタルピーの異なる 3 種類の温度応答性共重合体を合成し、それらの共重合体で修飾したリポソームの温度応答機能との関連性を明らかにすることで、表面特性の温度制御や内包薬物放出特性の温度制御など多様な温度応答性リポソームの構築に成功した。

以上の諸成果は、高効率な薬物送達システムとしてのリポソームの開発と実用化のための基盤となるものであり、癌をはじめとする様々な難治疾患に対する薬物医療技術の向上に貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。本委員会は、本論文の審査ならびに最終試験の結果から、博士（工学）の学位を授与することを適当と認める。