

## ナノバイオテクノロジーとドラッグデリバリーシステム

大庭 誠<sup>1</sup> 片岡 一則<sup>2,3</sup>

**要 旨：** バイオロジーの目覚ましい進歩により，疾患のメカニズムが分子レベルで明らかにされている。しかしながら，これらの知見を医療応用へと展開するためには，既存の手法では限界があり，近年成長著しいナノテクノロジーに期待が寄せられている。その中で，わが国が誇るナノテク技術の一つである高分子ミセル型ドラッグデリバリーシステムは，ナノスケールで緻密に設計され巧妙に機能を付与することができ，21世紀の先端医療を担う革新的な技術としての可能性を秘めている。(J Jpn Coll Angiol, 2008, 48: 371-377)

**Key words:** nanobiotechnology, drug delivery system, polymeric micelle

### はじめに

ナノテクノロジーとバイオテクノロジーの融合技術であるナノバイオテクノロジーは，新しい産業の創出や広範な分野への応用が考えられることからさまざまな研究開発が多岐にわたって行われている。その技術は，原子・分子をナノレベルで制御した機能性材料・ナノデバイスの創製，生きた細胞のナノレベルでの操作・イメージングなどを可能にし，病気の早期診断や低侵襲医療の実現へ向けた有望な技術として期待されている。このナノバイオテクノロジーの応用分野の一つが，ナノスケールで設計されたドラッグデリバリーシステム(DDS)である。本稿では，ナノバイオテクノロジーにおけるDDSについて概説するとともに，著者らがこれまで研究を行ってきた高分子ミセル型DDSについて併せて紹介する。

### ドラッグデリバリーシステム

体内に投与された薬物は，吸収され血中を循環して体内に分布し，肝臓による代謝，尿中などへの排泄の過程を経て体内から消失する。これらの過程の中で作用部位

に到達する薬物は投与された量のごく一部であり，到達できなかった薬物は治療効果を発揮できないばかりか正常組織に対する毒性・副作用の原因となってしまう。また薬物が薬効を発揮するためには，治療期間にわたって作用部位における薬物濃度を有効濃度領域内にとどめておく必要がある。このような問題点の改善策として，「必要なときに，必要な場所で，必要な量だけ薬物を作用させる」ことを目的としたDDSは，薬物の体内分布を時間的・空間的に制御する方法論として研究が行われ発展してきた。薬効成分が徐々に溶出して薬物を適切な血中濃度で保つ設計が施された徐放性製剤や，標的部位に到達してから代謝されて薬効を発揮するプロドラッグなどは，DDSが可能にする代表的な技術の一つである。

先端医療の分野において，薬物の体内分布を正確に制御して副作用を最低限に抑制する，高精度なピンポイント治療に関心が高まっているが，この目的を達成するためには，ナノスケールで精密設計された薬物運搬体(キャリア)，すなわちナノDDS技術の開発が最重要課題となる。日本におけるナノDDS研究のレベルは欧米と比べて非常に高く，古くから世界をリードしてきた。DDSの開発において材料は非常に重要であり，高分子材料をはじめとする材料開発に強い日本は，この点において高い優位性を有している。近年では，総合科学技術会議に

<sup>1</sup>東京大学医学部附属病院血管再生医療寄附講座

<sup>2</sup>東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻

<sup>3</sup>東京大学大学院工学系研究科附属疾患生命工学センター臨床医工学部門

2008年6月18日受理

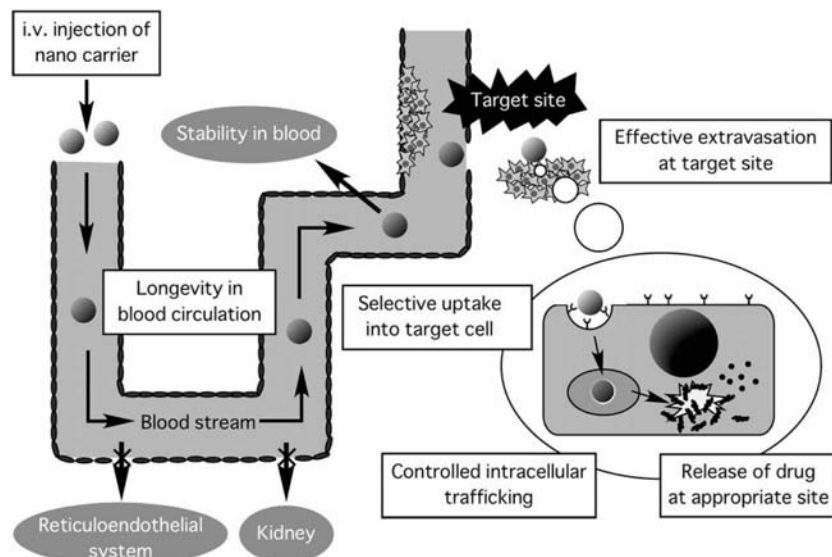


Figure 1 Drug delivery system by systemic administration and its issues.

において「ナノDDS」を府省連携プロジェクトとして位置づけ、各省によるナノDDSのプロジェクトが進行している。

固形癌などの標的部位へ選択的に薬物を送り届けるターゲティング型のDDSにとって、さまざまな機能を装着してシステムの問題点を一つずつ解決していくためには、ナノテクノロジーは必須である。Fig. 1 は、血中に投与された薬物が、標的部位に到達し、薬効を発揮するまでのターゲティング型DDSの問題点を示している。まず重要なのは血中におけるキャリアの安定性である。薬物はキャリアに安定に保持される必要があり、標的に到達するまで薬物の漏れや血中に存在する酵素による代謝を回避しなければいけない。また血中を長期循環するためには、肝臓や脾臓などの細網内皮系における処理、腎糸球体からの濾過を回避する必要がある。生体に異物として認識されるようなものは、肝臓のクッパー細胞などに貪食され血中から速やかに除去されてしまう。また、糸球体からの濾過の閾値は4 ナノメートル前後と言われており、キャリアにはそれ以上のサイズでの設計が求められる。糸球体から排泄されるような低分子量の薬や、異物として認識される抗原性のあるタンパク質でも、適切なキャリアさえあれば長時間血中を滞留することができる。標的部位に到達したキャリアは、血管から漏出して目的となる細胞へ取り込まれる必要がある。固形癌や炎症部位の血管壁では、血管内皮細胞の間に数

十ナノメートルの間隙が存在し、物質の透過性が高まっている。従ってこのような部位を標的とした場合、数十ナノメートルのキャリアは受動的に標的へと集積することができる。また受動的な集積に対して、標的部位を特異的に認識する分子をキャリア表面に装着することで、能動的な集積も可能になる。最終的に標的細胞へ取り込まれたキャリアは、薬物を放出し、またその薬物は細胞内の適切な場所へ送り届けられなければならない。以上の問題点を改善していくためには各種インテリジェント機能をキャリアに修飾する必要がある、ナノスケールでの精密設計を可能にするナノテクノロジーの活躍の場である。

### 高分子ミセル型DDS

ポリエチレングリコール[poly(ethylene glycol): PEG]のような親水性連鎖と疎水性連鎖から構成される両親媒性のブロック共重合体は、水中で疎水性相互作用を駆動力に高分子ミセルと呼ばれる会合体を自発的に形成する(Fig. 2)<sup>1, 2)</sup>。この高分子ミセルは、ウイルスとほぼ同等の数十ナノメートルのサイズを有しており、疎水性の内核が親水性の外殻に覆われた明確なコア-シェル構造をとっている。PEGのような親水性連鎖で覆われた外殻は、ミセルの水に対する溶解性を高めるとともに、血中などの生理条件下では、血清タンパクや細胞表面との非

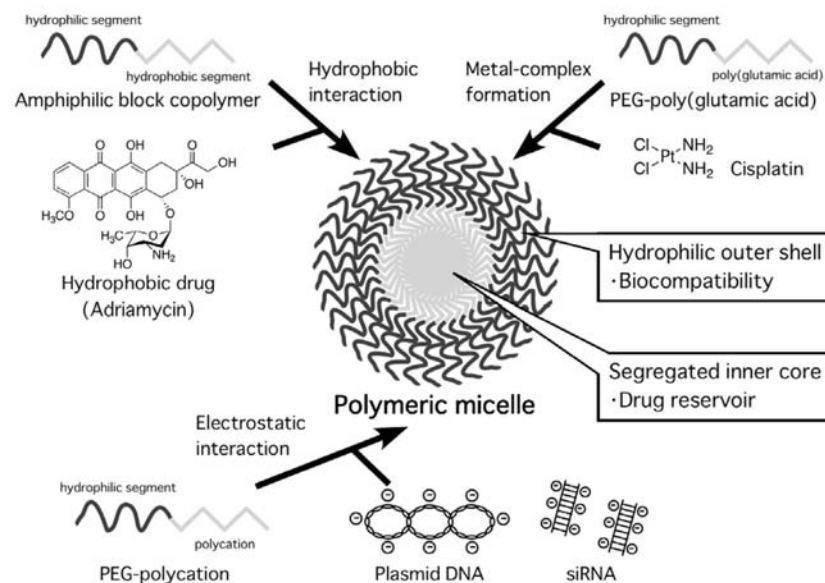


Figure 2 Formation of polymeric micelles.

特異的な相互作用を抑制し血中での長期循環を可能にする。一方で、内核は高い凝集力によってミセルの安定化に寄与し、さまざまな疎水性薬物を内包することが可能である。この高分子ミセルは数十ナノメートルのサイズに制御された粒子であり、また外殻は生体適合性のPEGで覆われていることから、前述の腎糸球体からの濾過や細網内皮系による処理を回避することが可能である。さらに、血管透過性が昂進しリンパ系が未発達な癌に受動的に集積する性質を有している。疎水性の制癌剤であるアドリアマイシンは、血中に単独投与した場合、早々に血管から薬物が正常組織にも到達してしまい、投与直後でも血中にはわずか数%しか残らず強い副作用を発揮してしまう。このアドリアマイシンを高分子ミセルに内包させ、高分子ミセル製剤として投与した場合、血中滞留性が著しく向上し、癌に集積する薬物の量が単独投与と比べて10～20倍高くなる。実際に制癌剤アドリアマイシンおよびパクリタキセルを内包した高分子ミセル製剤(NK911<sup>3)</sup>およびNK105<sup>4)</sup>は、現在国立がんセンターで第二相臨床試験が行われている。

高分子ミセル形成の駆動力としては、前述の疎水性相互作用のみならず金属錯体形成でも可能であり(Fig. 2)、金属錯体型制癌剤であるシスプラチンを内包した高分子ミセル製剤の開発も行われている<sup>5)</sup>。シスプラチン

は腎毒性や嘔吐など重篤な副作用を有しているが、高分子ミセル製剤とすることで副作用が軽減され、制癌活性が増強されることが確認されている。実際にこのシスプラチン内包高分子ミセル製剤(NC-6004<sup>6)</sup>)は、現在イギリスで第一相臨床試験が実施されている。

さらに高分子ミセルは、反対電荷を有する高分子同士の静電相互作用からも形成され、その会合体はポリイオンコンプレックス(polyion complex: PIC)ミセルと呼ばれる(Fig. 2)<sup>7)</sup>。PEGとカチオン性連鎖から構成されるブロック共重合体を使用することで、ポリアニオンであるDNAおよびRNAや、アニオン性のタンパク質および合成高分子などをミセル内核に内包することが可能である。近年、アンチセンスDNA、プラスミドDNA(pDNA)、siRNAを用いた遺伝子治療が脚光を集めているが、遺伝子治療を成功させるためには核酸医薬を効率よく患部へ送り届けるキャリアが非常に重要となってくる。これまで遺伝子キャリアの中心的な役割を演じてきたアデノウイルス、レトロウイルスに代表されるウイルス性のキャリアは、相次ぐ事故により安全性の問題が指摘されており、それに代わる安全で高効率な非ウイルス性キャリアの創製への期待が高まっている。このような背景のもと、われわれは遺伝子をデリバリーするPICミセルの研究を行ってきた。PICミセル表層を覆うPEG外殻はミセル

の表面電位をほぼ中性で抑え、非特異的な相互作用を抑制するとともに、市販の遺伝子導入試薬が示すようなカチオン性表面に由来する細胞毒性や遺伝子導入効率の低下を示さない<sup>8)</sup>。また裸のpDNAを血中に投与した場合、5分後にはそのほとんどが血中から消失してしまうのに対して、PICミセルとして投与した場合、3時間後でも本来の状態を保ったまま滞留できることを確認している<sup>9)</sup>。このようにPIC型の高分子ミセルは、遺伝子をデリバリーするキャリアとしての可能性が示唆されている。

### インテリジェント機能を装備した高分子ミセル

高分子ミセルを設計するうえで、内包する薬物の種類、標的となる疾患や組織により、求められる機能は大きく異なってくる。われわれが用いている高分子ミセルの材料は、ナノスケールでの修飾が可能な合成高分子であり、おのおのの理想的な設計に基づき、洗練されたインテリジェント機能を付与することも可能である。

#### (1) 血中安定性の向上

血中に投与された高分子ミセルは、内包された薬物を漏出することなく、無傷で目的地まで送り届ける必要がある。特にDNAやRNAの送達においては、血中に存在する核酸分解酵素により容易に分解されるため、血中での安定性は非常に重要である。この解決策として考案されたのが、ミセル内核に環境応答性の架橋を施すという手法である<sup>10, 11)</sup>。具体的には、細胞内外で還元物質であるグルタチオンの濃度が異なることに着目し、細胞内の還元環境に応答して開裂するジスルフィド結合を利用している。この内核架橋ミセルは、細胞に到達するまでは内包しているpDNAを安定に保持する一方で、細胞に到達して内核架橋が解離することで、速やかなpDNAの放出を可能にする。実際に培養細胞を用いた遺伝子導入実験では、培地中での安定性の向上と、内包pDNAの効果的な放出により遺伝子導入効率は著しく上昇する。またマウスへの静脈投与により、肝臓への遺伝子導入にも成功している。このシステムは賦形剤を使用することなく凍結乾燥させることも可能であり、製剤化の観点からも非常に優れたシステムである。

#### (2) 患部の標的化

制癌剤などの毒性の強い薬物にとって、正常組織への分布は副作用の原因となり、標的部位選択的に薬物を送

り届けることが理想である。そのためには、高分子ミセル自身に患部を認識して能動的に集積し、正常組織への分布を回避する機能、標的化が重要になってくる。われわれのグループでも、アドリマイシンを内包した高分子ミセル表層に、葉酸をリガンドとして導入した高分子ミセルについて報告している<sup>12, 13)</sup>。一般的に癌細胞は、その増殖に多くの栄養を必要としているために葉酸レセプターを過剰に発現しており、ミセル表層への葉酸の導入は、癌細胞を標的化するための設計である。実際に培養細胞を用いた実験では、葉酸が導入されていないミセルと比べて多くのミセルが細胞に取り込まれ、低濃度で制癌効果を発揮している。また胆癌マウスモデルに対して尾静脈投与したところ、最適リガンド密度のミセルにおいて、低用量で癌の増殖抑制効果を示している。

最近の癌治療のトレンドの一つに、癌の栄養血管を標的とした血管新生阻害療法というものがある<sup>14)</sup>。その代表的なものに、血管内皮細胞増殖因子に対する抗体、アバスタチンがあるが、他の制癌剤との併用により高い奏効率を示す。このような血管新生阻害療法の標的となるのは、癌細胞そのものではなく、癌周囲の血管である。従って、癌周囲の血管内皮細胞特異的に薬物を送り届けるシステムが有効だと考えられる。われわれは、増殖性の血管内皮細胞に $\alpha_v\beta_3$ インテグリンレセプターが過剰に発現していることに注目し、このレセプターを特異的に認識する環状型のRGDペプチドを、pDNAを内包した高分子ミセル表層に導入した<sup>15)</sup>。培養細胞を用いた実験において、環状RGDペプチドの導入によりレセプター発現細胞特異的に遺伝子導入効率が上昇することを確認している。またこのRGDペプチドの機能として、ミセルの細胞への取り込み経路を変化させる可能性も示唆された。

#### (3) 細胞内動態の制御

遺伝子内包高分子ミセルがエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた場合、エンドソームからの脱出が大きな障害となる。DNAやRNAなどがエンドソームを経由してリソソームへ到達すると、低pH環境下で核酸分解酵素により容易に代謝されてしまう。従って、いかに分解されずにエンドソームから細胞質へ移行できるかが鍵になる。ポリプレックスの中には、エンドソーム脱出機能を有するポリカチオンについていくつか報告があるが、その代表的なものがポリエチレンジアミン (polyethylenimine: PEI) である<sup>16)</sup>。PEIのような見かけの

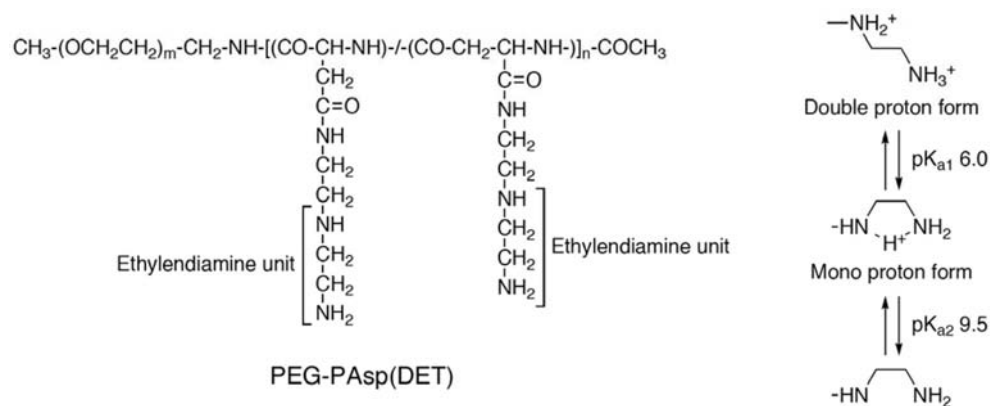


Figure 3 Structure and mechanism of PEG-PAsp (DET).

pKaが低いカチオン性高分子は、リソソーム内のpHの低下を防ぐバッファーとして働き効果的なエンドソーム脱出を可能にするため、高い遺伝子導入効率を達成する。われわれのグループでは、PEG-ポリカチオンブロック共重合体のカチオン構造のスクリーニングを行う中で、側鎖にエチレンジアミンユニットを有するPEG-PAsp(DET)ブロック共重合体が、非常に低毒性かつ高い遺伝子導入効率を示すことが明らかになった(Fig. 3)<sup>17)</sup>。このPAsp(DET)ポリカチオンの特徴は、pH 7.4付近の生理的条件下ではモノプロトン化状態をとっているのに対して、エンドソーム内の酸性条件であるpH 5.5付近まで低下するとダブルプロトン化状態に移行することである。つまり、細胞外ではモノプロトン化状態をとることで非常に低毒性を維持しているのに対して、エンドソームに移行しダブルプロトン化状態になることで、エンドソーム膜へ相互作用する力が強まりエンドソームからの脱出を可能にする。本システムは、市販の遺伝子導入試薬では困難な初代培養細胞や、*in vivo*疾患モデルに対しても効率のよい遺伝子導入を達成している<sup>18)</sup>。またPAsp(DET)は、細胞が正常に機能しているかどうかの指標となるハウスキーピング遺伝子の発現量に影響を及ぼさない<sup>19)</sup>。PEIは確かに外来性遺伝子を高効率で導入することができるが、ハウスキーピング遺伝子の発現量は低下し、細胞の生死からだけでは判断できない毒性を引き起こしてしまう。このようにPEG-PAsp(DET)は、非常に低毒性かつ高い遺伝子導入効率を達成し得る遺伝子ベクターとして現在も改良が進められている。

#### (4)薬物の放出

標的となる細胞に到達したミセルが薬効を発揮するためには、内包している薬物を放出する必要がある。前述の内核架橋ミセルは、血中滞留性向上のための設計のみならず、内包しているpDNAを細胞内で効率よく放出するための設計でもある。制癌剤においても同じような設計は、正常組織への副作用を低減させることから非常に有効である。われわれも、制癌剤が細胞内に到達した後に効果的に放出されるシステムについて報告している<sup>20)</sup>。具体的には、ブロック共重合体の側鎖に酸性条件下で開裂するシッフ塩基を介してアドリマイシンを導入した高分子ミセルである。本システムは、細胞に取り込まれるまでは安定にアドリマイシンを担持している一方で、取り込まれてエンドソーム内に到達した後に酸性条件に応答してアドリマイシンを速やかに放出する。この高分子ミセルは、培養細胞のみならず動物実験でも高い制癌活性と低毒性を示している。

#### おわりに

バイオロジーの発展とともに魅力的な薬剤候補が多数発見されている。タンパク質と病気の因果関係が明らかになり、遺伝子治療への期待が高まっている。近年その発展が著しいsiRNAもその一つである。これらのツールが実際に治療法として実用化されるためには、そのデリバリー方法、すなわちナノテクノロジーが鍵となる。本稿で報告した高分子ミセル型DDSは、日本が世界に誇るナノテク技術の一つであり、21世紀の先端医療の革新的治療法として期待される。

## 文 献

- 1) Kataoka K, Kwon GS, Yokoyama M et al: Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery. *J Control Release*, 1993, **24**: 119–132.
- 2) Nishiyama N, Kataoka K: Nanostructured devices based on block copolymer assemblies for drug delivery: designing structures for enhanced drug function. *Adv Polym Sci*, 2006, **193**: 67–101.
- 3) Matsumura Y, Hamaguchi T, Ura T et al: Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin. *Br J Cancer*, 2004, **91**: 1775–1781.
- 4) Hamaguchi T, Matsumura Y, Suzuki M et al: NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend *in vivo* antitumor activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. *Br J Cancer*, 2005, **92**: 1240–1246.
- 5) Nishiyama N, Okazaki S, Cabral H et al: Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res*, 2003, **63**: 8977–8983.
- 6) Uchino H, Matsumura Y, Negishi T et al: Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. *Br J Cancer*, 2005, **93**: 678–687.
- 7) Kakizawa Y, Kataoka K: Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, **54**: 203–222.
- 8) Han M, Bae YS, Nishiyama N et al: Transfection study using multicellular tumor spheroids for screening non-viral polymeric gene vectors with low cytotoxicity and high transfection efficiencies. *J Control Rel*, 2007, **121**: 38–48.
- 9) Harada-Shiba M, Yamauchi K, Harada A et al: Polyion complex micelles as vectors in gene therapy—pharmacokinetics and *in vivo* gene transfer. *Gene Ther*, 2002, **9**: 407–414.
- 10) Miyata K, Kakizawa Y, Nishiyama N et al: Block cationer polyplexes with regulated densities of charge and disulfide cross-linking directed to enhance gene expression. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**: 2355–2361.
- 11) Miyata K, Kakizawa Y, Nishiyama N et al: Freeze-dried formulations for *in vivo* gene delivery of PEGylated polyplex micelles with disulfide crosslinked cores to the liver. *J Control Release*, 2005, **109**: 15–23.
- 12) Bae YS, Jang WD, Nishiyama N et al: Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Mol Biosyst*, 2005, **1**: 242–250.
- 13) Bae YS, Nishiyama N, Fukushima S et al: Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced *in vivo* antitumor efficacy. *Bioconjug Chem*, 2005, **16**: 122–130.
- 14) Quesada AR, Muñoz-Chápuli R, Medina MA: Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials. *Med Res Rev*, 2006, **26**: 483–530.
- 15) Oba M, Fukushima S, Kanayama N et al: Cyclic RGD peptide-conjugated polyplex micelles as a targetable gene delivery system directed to cells possessing  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_5\beta_1$  integrins. *Bioconjug Chem*, 2007, **18**: 1415–1423.
- 16) Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA et al: A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 7297–7301.
- 17) Kanayama N, Fukushima S, Nishiyama N et al: A PEG-based biocompatible block cationer with high buffering capacity for the construction of polyplex micelles showing efficient gene transfer toward primary cells. *ChemMedChem*, 2006, **1**: 439–444.
- 18) Akagi D, Oba M, Koyama H et al: Biocompatible micellar nanovectors achieve efficient gene transfer to vascular lesions without cytotoxicity and thrombus formation. *Gene Ther*, 2007, **14**: 1029–1038.
- 19) Masago K, Itaka K, Nishiyama N et al: Gene delivery with biocompatible cationic polymer: pharmacogenomic analysis on cell bioactivity. *Biomaterials*, 2007, **28**: 5169–5175.
- 20) Bae YS, Fukushima S, Harada A et al: Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003, **42**: 4640–4643.

## Nanobiotechnology and the Drug Delivery System

Makoto Oba<sup>1</sup> and Kazunori Kataoka<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Vascular Regeneration, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Department of Material Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

<sup>3</sup>Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

---

**Key words:** nanobiotechnology, drug delivery system, polymeric micelle

Although dramatic progress in biology has revealed the mechanisms of diseases at the molecular level, current methods are insufficient to develop them for medical application, a feat that the recent growth in nanotechnology is expected to accomplish. The polymeric micellar drug delivery system, which is one of the most attractive nanotechnologies in Japan, can be easily modified with intelligent functions designed at nano scale and is a promising system for advanced medicine in the 21<sup>st</sup> century.

(J Jpn Coll Angiol, 2008, **48**: 371–377)