ステロイド封入ステルス型ナノ粒子の性状と薬効

特集 ホルモン製剤のDDSの基礎と臨床

檜 垣 恵*

Characteristics of stealth-type polymeric nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate

The observed strong therapeutic benefit obtained with the stealth nanosteroid in experimental arthritis may have been due to prolonged blood circulation and targeting to the inflamed joint in addition to its sustained release *in situ*.

臨床的に有用な薬剤であるステロイドをコンプライアンス・薬効の向上、および副作用の軽減のため高分子ナノキャリアーに封入した。ナノサイズにより EPR 効果による炎症局所への標的化、PEG 付与により網内系への取り込み抑制による血中滞留性の増加(ステルス性)、生体分解性・生体適合性のポリ乳酸ポリマーを用いることで局所での薬剤徐放性が可能となった。PLA(2.6 kD)と PEG(5 kD)-PLA(3 kD)ブレンドによる 10% PEG 含量の 115 nm サイズベタメタゾン封入ナノ粒子が関節炎モデル動物で高い薬効を示した。

Megumu Higaki*

key words : nanoparticles, betamethasone, experimental arthritis models, PEG, PLA/PLGA polymers

近年、ナノ技術の進歩はめざましいものがあり、薬剤の伝達技術である DDS においてもリポゾーム、高分子ミセル、高分子ナノ粒子などのコロイドナノキャリアーが抗がん剤治療を主な目標に開発されている(図 1)。これらナノ粒子には安全性とともに高い封入率、血中滞留性の向上、病変部位への集積が必要とされる¹⁻⁷⁾。ポリエチレングリコール(PEG)リポゾーム製剤であるドキシルやアムビゾームがすでに臨床応用されており、高分子ミセルにおいてもドキシソルビン含有 PEG-ポリアスパラギン酸の開発が報告されている。高分子粒子はリポソームと比較すると安価で大量合成も容易で、血中でも安定に薬剤放出を制御できるという特徴があるが、有機溶媒の使用が問題となる。生体分解性・生体適合性のポリ乳酸(PLA)・ポリグリコール酸(PLGA)をベースとした粒子に関しては多くの研究がなされており、素材もすでにリユープリンとして臨床応用されている⁸⁾。

一方、高分子のブレンドにより種々の特性の粒子作成が可能で、血中滞留性や薬剤放出を制御することも周知である^{9,10)}。これらのナノ粒子の特性と

しては受動ターゲティングとしても知られるように血管透過性が亢進した腫瘍や炎症組織では 200 nm 以下のナノ粒子は血管外に流出して、これらの組織ではリンパ管が未発達であるためにナノ粒子が組織に留まる性質を持つ。この受動ターゲティングは EPR 効果ともよばれる¹¹⁾。また、静脈注射したコロイド粒子は肝臓クッパー細胞や脾臓マクロファージの網内系により容易に血中から排除されてしまうが、非電荷水溶性素材である PEG の付加によりナノ粒子の網内系への取り込みを抑制することができ血中滞留性が延長する。さらに、生体分解性素材の PLA/PLGA を用いることで局所での薬剤徐放が可能となっている。

今回用いた高分子ブレンドナノ粒子では PLA および PEG-PLA のブレンド比などを調整することにより血中動態および薬物放出速度を制御することも明らかになった。炎症局所ではナノ粒子は PEG が除去もしくはオブソニン化されたのちにクラスリンを介して取り込まれる機構も検討されている(図 2)。

* Research Center for Medical Sciences, The Jikei University School of Medicine 東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター

図1 ナノマテリアル

図2 ナノ粒子の細胞内取り込み

図3
ステロイドの作用機構
(Rhen T et al., 2005¹²⁾を改変)

ステロイド

副腎皮質束状層から産生されるコルチゾン(コルチゾール)が分離精製され臨床応用されたのち、電解質作用を減らした合成糖質コルチコイド(ステロイド)が現在では広く炎症免疫疾患に使用されている。膠原病・関節リウマチ(RA)などの自己免疫疾患ではその病態形成に免疫異常による炎症が関与しているため、劇的な抗炎症作用を有する糖質コルチコイドが治療の重要な役割を占めている。1950年にはHenchらが、RAの画期的なステロイド療法

でノーベル賞を受賞し、これ以降、膠原病・リウマチ性疾患に対して使用されるようになったが、必要量を超えた投与により重篤な副作用も出現することが知られた。膠原病・リウマチ性疾患で重要なステロイド薬の作用機序は、転写因子NF- κ BやAP-1の活性化を阻害して発揮する免疫抑制作用と抗炎症作用である。

グルココルチコイド作用機序の分子機構の解明が進み、細胞膜を通過したステロイドは受容体蛋白GRと結合し、活性型GRは核内に移行して種々の遺伝子発現を誘導あるいは抑制する(図3)¹²⁾。抗炎

表1 ステロイド薬の主な副作用

重篤な副作用	軽微な副作用
・消化性潰瘍 ・感染症の誘発, 悪化 ・耐糖能異常, 糖尿病 ・精神障害 ・骨粗鬆症, 骨折 ・高血圧 ・血栓・塞栓 ・高脂血症, 動脈硬化 ・血管炎 ・副腎機能不全 ・白内障 ・緑内障 ・骨壊死 ・ステロイド筋症 ・睪炎	・瘰癧 ・食欲亢進, 体重増加 ・満月様顔貌 ・野牛肩 ・中心性肥満 ・浮腫 ・多毛症 ・出血傾向 (皮下出血, 紫斑) ・顔面紅潮 ・多尿 ・多汗 ・月経異常 ・低カリウム血症 ・不眠 ・白血球增多

症にはプロスタグランジン(PG)/ロイコトリエン(LT)の合成抑制, 免疫抑制には炎症細胞の遊走抑制, 炎症性サイトカイン分泌抑制, リンパ球・好酸球の減少, 抗アレルギー作用にはLT抑制が必要とされている. 抗炎症作用にはおもに炎症性サイトカインやCox-2の発現の転写抑制作用(transrepression)が重要であることが明らかになってきた.

一方, 緑内障や糖尿病, 骨粗鬆症, 皮膚萎縮, 成長遅延, クッシング症候群などの副作用発症には, タンパク異化, 脂肪分解, グルコース利用抑制, 肝臓での糖新生の転写活性能(transactivation)が関与すると考えられている. 表1に示すようにステロイド薬による副作用には多様なものがあるが, 関節リウマチ(RA)などの治療に用いられる少量ステロイド療法でも, その投与が長期になる場合には, 骨粗鬆症, 動脈硬化, 糖尿病, 白内障, 緑内障などを合併することが多い.

ナノステロイド

このようにステロイドは非常に有効な薬剤であるが重篤な副作用のために使用が限られている. ナノ粒子の活用により炎症局所への標的化および徐放性を付与できれば, 投与量および回数を減らすことで, コンプライアンスの向上とともに薬効の向上, 副作用の軽減が計れると考えられた. 標的臓器への標的化および局所での徐放性を有するナノサイズの

リポゾーム封入ステロイドの関節炎動物モデルでの有用性もすでに報告されている¹³⁻¹⁵⁾.

薬物としてデキサメタゾンパルミテートを大豆オイル中に溶解し表面を脂質で覆った粒径200 nmの球状微粒子(リメタゾン)が, 抗炎症薬として臨床利用されている. この製剤は静脈注射により血管中から炎症部位や血管障害部位に集積し薬効が増強されることが知られているが, 薬物をオイル中に溶解しているために薬物の徐放機能がなく持続的な薬効を発揮できない.

われわれは生体内で安定・安全で, 薬物徐放機能とターゲティング機能を兼ね備えた静脈注射用ナノ粒子製剤として, 生分解性/生体適合性ポリマーであるPLA/PLGAに, 水溶性リン酸ベタメサゾンと亜鉛を内封した第一世代のナノ粒子はすでに報告している¹⁶⁻¹⁹⁾. 関節炎炎症モデルの動物実験から, このナノ粒子が炎症部位に集積し抗炎症効果が増強されることやリン酸ベタメサゾンの徐放による薬効の持続効果を認めた. しかし, 血中滞留性に問題があるために, さらに, 第二世代としてPLA/PLGAとPEG-PLA/PLGAのブレンドナノ粒子の活用により種々の放出パターン・血中滞留性を保持するベタメタゾン封入粒子の作成を行った²⁰⁻²²⁾.

1. ナノステロイドの調製

O/W型溶媒拡散法によりPLGA/PLAおよびPEG-PLA/PLGAのブレンドにベタメタゾンと亜鉛イオンを添加したナノ粒子の調製を行った. 水溶性のリン酸ベタメサゾンを酢酸亜鉛により疎水化し, 得られた沈殿物とPLGA/PLAを溶解したアセトン溶液を界面活性剤水溶液中に滴下することでリン酸ベタメサゾンと亜鉛を含有したナノステロイドを作製した. この調製法においてブレンド・点組成・混和速度など種々の条件を変えることにより, 種々の性状(粒径, 封入率, 放出速度, PEG濃度)のナノ粒子が得られた(表2).

2. ナノステロイドの性状

封入に関して, 亜鉛は, リン酸ベタメサゾンを疎水化し粒子内へ封入されやすくするのに加えた. 亜鉛はPLGA末端のカルボキシル基と相互作用して

表2 ナノステロイドの性状

Type	PLGA/PLA homopolymers (Mw)	PEG-PLGA/PLA block copolymers (Mw)	PEG content (wt. %)	Diameter (nm)	BP loading (wt. %)	Half-Life	
						<i>In vitro</i> (d)	<i>In vivo</i> (h)
A	PLA (6)	PEG (6)-PLA (9)	10	116	10.7	36	7.5
B	PLA (6)	PEG (6)-PLA (9)	40	51	4.9	10	24.2
C	PLA (6)	PEG (6)-PLGA (10)	10	115	11.2	28	2.3
D	PLGA (6)	PEG (6)-PLA (9)	10	101	11.4	3	7.5
NS	PLA (16)	-	0	178	4.8	>60	1.1

図4 *in vitro* 放出 (Ishihara T et al., 2009²¹⁾参照) 図5 血中動態 (Ishihara T et al., 2009²¹⁾参照)

粒子形成および封入を促進していた。希釈血清中でのナノ粒子からの薬物放出を検討したところ、亜鉛を含有していないナノ微粒子では10日あまりですべて放出されたのに対し、亜鉛を含むナノ微粒子ではより長期にわたる徐放を示した。

一方、PEG化による薬剤放出の促進、PLAとPLGAによる差異も確認された(図4)。マクロファージなどの網内系細胞に蛍光色素であるローダ

ミンを封入したナノ粒子を添加したところ、PEG化ステルス粒子の取り込みは非ステルス粒子と比較して低下していた。血中滞留性に関してもPEG化の程度が大きく寄与しており、50 nmサイズのL体粒子の血中半減期が長かった(図5)。臓器分布の解析ではステルス化により肝臓への集積が減少していた。

3. RA 動物モデル

関節炎動物モデルでは45~115 nmサイズのナノステロイドのうち、PLA(2.6 kD)とPEG(5 kD)-PLA(3 kD)のブレンドにより作製した、10% PEG含量の115 nmサイズのベタメタゾン封入ナノ粒子が高い薬効を示した。アジュバント関節炎(AA)モデルラットでは40 μgの単回投与で35%の炎症抑制が1日で認められて9日間持続した(図6)。これはフリーベタメタゾンの3倍量投与より高い薬効であった。コラーゲン関節炎モデル(CIA)マウスでも3 μg単回投与で、投与3~4日目で有意に強い抗炎症効果が認められ、その効果は少なくとも6日目まで持続していた(図7)。生体内イメージングシステムでも関節炎炎症局所への特異的な粒子の局在が示されている。

4. その他の疾患動物モデル

喘息モデル：可逆性の気道閉塞、気道過敏性の充進、気道炎症を特徴とする喘息は、その病態形成に、気道炎症が重要な位置を占めており、抗炎症治療の第一選択薬は吸入ステロイド薬である。武蔵野大学薬学部との共同研究で行った喘息モデルラットでは気道炎症に対する治療効果として、ナノステロイド1回の薬剤投与で、7日後の好酸球浸潤をステ

図6 AA ラット (Ishihara T et al, 2009²⁰参照)

図7 CIA マウス (Ishihara T et al, 2009²⁰参照)

ルス型ナノステロイドは有意に抑制した。気道過敏性についてもメサコリン吸入後の気道抵抗も7日目まで有効性を保持する知見が得られている。

ぶどう膜炎モデル：慈恵医大眼科との共同研究で実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)モデルを用いて、ナノステロイドで、少量でかつ長期にわたる炎症抑制効果を得ることができた。ナノスフェアは主に網脈絡膜内の炎症病巣に集積していることが確認され、その効果は2週後も持続していた。EAUでは、網膜内において活性化したミューラー細胞の網膜下浸潤やマクロファージ・T細胞の浸潤が顕著となる。ナノステロイド投与により、その浸潤は顕著に抑制された。また、視細胞の外節の破壊も軽度で、治療後の視機能を考えた場合、この治療的効果は重要な意味をもつと考えられた。

図8 ABC 現象 (Higaki 投稿中)

難聴モデル：京都大学耳鼻科教室と共同でその薬効を検討して良好な結果が得られている。

抗 PEG-IgM 抗体の産生

石田らが報告しているように PEG リポソームと同様にこのブレンドナノ粒子でも複数回投与により血中半減期が減少した(図8)²³。抗 IgM-PEG 抗体が検出され、長期投与では将来克服しなければならない問題と考えられた(投稿中)。

ステロイド療法の今後

糖質コルチコイドであるステロイド薬は免疫抑制および抗炎症作用を示す重要な薬剤として炎症・免疫性疾患をはじめとして多くの疾患に用いられている。表1に示すようにステロイド薬治療では抵抗性、依存性のほか多様な副作用が問題となる。これらの副作用を克服するために炎症局所で作用を発揮するように開発されたプロドラッグ、関節リウマチでの関節内注射、気管支喘息での吸入ステロイド(ベクロメタゾン)、クローン病でのベクロメタゾン徐放性腸溶剤カプセル、皮膚疾患での外用剤が開発されている。重要な副作用である骨粗鬆症はビスフォスフォネート投与による予防が可能となっている。また、間歇投与などの厳密な投与法や、時間放出錠として時間制御可能なステロイド製剤も工夫されている。

一方、質的に異なるステロイド製剤として、標的

臓器への標的化，および局所での徐放性を有するナノサイズのリポゾーム封入ステロイドや高分子生体分解性高分子ポリマー封入ステロイドの開発も重要であり，今回紹介した．また，内因性グルココルチコイド作用を増強させる 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase 阻害剤である Glycyrrhetic acid (グリチル酸ルチン)や抗炎症作用のある NO を徐放する NCX-1015 (NO-prednisolone)，NCX-1004 (NO-hydrocortisone) などのニトロステロイドの作用も報告されている．作用を分離した選択的グルココルチコイド受容体アゴニスト (SEGRAs ; Selective glucocorticoid-receptor agonists) としてステロイド性の RU24858 のほかに非ステロイド性の AL-438，ZK216384 などの薬剤の開発も行われている．今後，これらの製剤の臨床での評価が待たれるところであり，さらにステロイド作用を有する遺伝子を標的とする低分子や生物製剤の開発も期待されている．

一方、薬剤投与のタイミングに関しては最近、Circadian Administration of Predonisone in Rheumatoid Arthritis(CAPRA-1)Study が報告された²⁴⁾。内因性コルチゾールおよび朝のこわばりの概日リズムが早朝にあるということを考慮して、服用後4時間後でプレドニゾン放出(午後10時服用して午前2時放出)する製剤が開発された。多施設共同でRA患者における12週投与の有効性・安全性の二重盲検無作為化対照試験が行われた。放出制御プレドニゾン就寝前投与群では、従来の即効型プレドニゾンの朝投与群と比較して忍容性が良好で、朝のこわばり持続時間が有意に減少した。3ヵ月後のIL-6も有意な低下が認められた。今後さらに長期間の観察が期待されている。

今回筆者らは臨床的に有用な薬剤であるステロイドをコンプライアンス・薬効の向上、および副作用の軽減のためナノ粒子キャリアに封入した、ナノサイズによりEPR効果による炎症局所への標的

化, PEG 付与により網内系への取り込み抑制による血中滞留性の増加(ステルス性), 生体分解性・生体適合性のポリ乳酸ポリマーを用いることで局所での薬剤の徐放性が可能となった(図9). 高分子ナノキャリアーに封入することにより徐放性に加えて血中滞留性の増加, 炎症局所への標的化が示され, ステロイドの薬効の向上に貢献できることが示された. 将来的には抗体リガンドなどの搭載による能動標的化も必要となるであろう.

文 献

- Higaki M : Recent development of nanomedicine for the treatment of inflammatory diseases. *Inflammation and Regeneration* 29 : 112-117, 2009.
- Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, et al. : Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnology* 2 : 751-760, 2007.
- Peracchia MT : Stealth nanoparticles for intravenous administration. *S. T. P. Pharm Science* 13 : 155-161, 2003.
- Torchilin VP : Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 4 : 145-160, 2005.
- Torchilin VP : Micellar nanocarriers : pharmaceutical perspectives. *Pharm Res* 24 : 1-16, 2007.
- Yih TC, Al-Fandi M : Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *J Cell Biochem* 97 : 1184-1190, 2006.
- Lavasanifar A, Samuel J, Kwon GS : Poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 54 : 169-190, 2002.
- Okada H : One-and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuporelin acetate. *Adv Drug Deliv Rev* 28 : 43-70, 1997.
- Avgoustakis K : Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles : preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Curr Drug Deliv* 1 : 321-333, 2004.
- Beletsi A, Panagi Z, Avgoustakis K : Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers. *Int J Pharm* 298 : 233-241, 2005.
- Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K : Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics : a review. *J Control Release* 65 : 271-284, 2000.
- Rhen T et al. : Antiinflammatory action of glucocorticoids-New mechanisms fro old drugs. *NEJM* 353 : 1711-1723, 2005.
- Metselaar JM et al. : Complete remission of experimental arthritis by joint targeting of glucocorticoids with long-circulating liposomes. *Arthritis Rheum* 48 : 2059-2066, 2003.
- Metselaar JM, van den Berg WB, Holthuysen AE, Wauben MH, Storm G, et al. : Liposomal targeting of glucocorticoids to synovial lining cells strongly increases therapeutic benefit in collagen Type II arthritis. *Ann Rheum Dis* 63 : 348-353, 2004.
- Teshima M, Fumoto S, Nishida K, Nakamura J, Ohyama K et al. : Prolonged blood concentration of prednisolone after intravenous injection of liposomal palmitoyl prednisolone. *J Control Release* 112 : 320-328, 2006.
- Sakai T, Kohno H, Ishihara T, Higaki M, Saito S et al. : Treatment of experimental autoimmune uveoretinitis with poly (lactic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate. *Exp Eye Res* 82(4) : 657-663, 2006.
- Ishihara T, Izumo N, Higaki M, Shimda E, Hagi T et al. : Role of zinc in formation of PLGA/PLA nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate and its release profile. *J Control Release* 105(1-2) : 68-76, 2005.
- Tamura T, Kita T, Nakagawa T, Endo T, Kim T-S et al. : Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. *Laryngoscope* 115(11) : 2000-2005, 2005.
- Higaki M, Ishihara T, Izumo N, Takatsu M, Mizushima Y : Treatment of experimental arthritis with poly (D, L-lactic/glycolic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone sodium phosphate. *Ann Rheum Dis* 64(8) : 1132-1136, 2005.
- Ishihara T, Kubota T, Choi T, Higaki M : Treatment of experimental arthritis with stealth type PLA/PLGA and PEG-PLA/PLGA blended nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate. *J Pharmacol Exp Ther* 329 : 412-417, 2009.
- Ishihara T, Kubota T, Choi T, Miyuki T, Eri A et al. : Polymeric nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate with different release profiles and stealthiness. *Int J Pharm* 375 : 148-154, 2009.
- Ishihara T, Takahashi M, Higaki M, Mizushima Y : Efficient encapsulation of a water-soluble corticosteroid in biodegradable nanoparticles. *Int J Pharm* 365(1-2) : 200-205, 2009.
- Ishida T, Maeda R, Ichihara M, Irimura K, Kiwada H : Accelerated clearance of PEGylated liposomes in rats after repeated injections. *J Control Release* 88 : 35-42, 2003.
- Bijlsma J : Glucocorticoid chronotherapy in rheumatoid arthritis. *Lancet* 371 : 183-184, 2008.