18112

PLGA ナノ粒子の精密制御と DDS への応用

Production of PLGA Nanoparticles and Its Application to Drug Delivery Systems

研究代表者 Research leader: 真栄城 正寿 Masatoshi MAEKI

北海道大学大学院工学研究院 助教

Faculty of Engineering, Hokkaido University, Assistant Professor

E-mail: m.maeaki@eng.hokudai.ac.jp

抄 録

本研究では、我々が脂質ナノ粒子の粒径の精密制御を目的として開発したマイクロ流体デバイスである「iLiNP[®] デバイス」を用いて、Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) ナノ粒子の粒径の精密制御に取り組んだ。iLiNP デバイスを用いることで、原料溶液の流量依存的に約 30 ~ 120 nm の範囲で PLGA ナノ粒子の粒径を制御することが可能であった。また、ナノ粒子の血中滞留性を向上させるために不可欠な PEG 化 PLGA を用いたナノ粒子や抗がん剤であるパクリタキセル (PTX) を搭載した PLGA ナノ粒子作製への応用を検証した。その結果、作製した PLGA ナノ粒子の粒径や PTX の搭載率が、細胞やマウスでの粒子活性の評価試験に使用できる性能であることを示した。

ABSTRACT

In this study, we demonstrated the precise size control of Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles using our microfluidic device named iLiNP[®]. The size of PLGA nanoparticles was able to control ranged from 30 to 120 nm by the flow conditions using the iLiNP device. The iLiNP device was also applied to produce the PEG-PLGA nanoparticles and paclitaxel (PTX)-loaded PLGA nanoparticles. We confirmed the physical properties including average-size, size distribution, and encapsulation efficiency of PTX were enough to evaluate for in vivo and in vitro assays.

研究背景と目的

近年、粒径が 100 nm 以下に制御されたナノ粒子製剤が注目されている。2020 年に世界的に大流行している新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のワクチン開発においても、mRNA を搭載した脂質ナノ粒子が米国において緊急使用

許可された (Krammer F., 2020)。その他にも、2018 年には世界初の siRNA 医薬品として Onpattro (米国 Alnylam 社) が承認された。Onpattro は、siRNA を脂質ナノ粒子に搭載した製剤であり、世界初の RNA 干渉治療薬である。核酸医薬は、抗体医薬よりも、安価で特異的な治療が可能になることから、次世代医薬品とし

て世界中で研究開発が進んでいる。

一方で、ポリマーを材料とした薬剤・核酸送達技術の開発も進んでいる (Kim B.S. et al., 2019). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) は、生分解性のポリマーであり、薬物送達システム (Drug Delivery System: DDS) への応用が進んでいる。PLGA ナノ粒子は、生体内で加水分解されることで、乳酸とグリコール酸を経て、最終的には水と炭酸ガスに分解される。また、PLGA は疎水性であるため、Polyethylene glycol (PEG) を共重合した PEG-PLGA ナノ粒子によって、血中滞留性を改善することができる。

脂質ナノ粒子や PLGA ナノ粒子などのポリマーミセルを用いた DDS において、粒径の制御は体内動態や薬効を制御するために重要な技術である。粒径の調整方法として、超音波処理やエクストルーダー処理が用いられている。単純水和法や有機溶媒注入法などで粒子を作製後に、これらのサイズ調整が行われており、粒径を制御した DDS ナノ粒子作製には多段階のプロセスが必要であった。近年、数百 μm の流路幅を有するマイクロ流体デバイスを用いた脂質ナノ粒子作製法が注目されている (Maeki M. et al., 2018)。前述した Onpattro は、マイクロ流体デバイス (商品名: NanoAssemblr) を用いて作製されている。NanoAssemblr[®] は、カオティックミキサーと呼ばれるマイクロミキサー構造が流路内に構築されている。一方で、我々は独自に開発したマイクロ流路である iLiNP[®] (アイリンプ) デバイスを用いた脂質ナノ粒子の粒径精密制御技術を開発した (Kimura N. et al., 2018)。これまでに、iLiNP デバイスを用いて、粒径を精密に制御した siRNA, mRNA, CRISPR-Cas9 などを搭載した脂質ナノ粒子の作製に成功している (Suzuki Y. et al., 2021; Hashiba A. et al., 2020)。そこで本研究では、iLiNP デバイスを用いて PLGA ナノ粒子の粒径の精密制御に取り組み、DDS 用ポリマーミセル作製への応用可能性を検証した。

研 究 方 法

1. PLGA 溶液の調製

PLGA ナノ粒子の作製には、分子量が 24000 ~ 38000 の PLGA, および, PEG-PLGA ($Mn_{\text{PEG}} = 2000$, $Mn_{\text{PLGA}} = 11500$) を用いた。溶媒にはアセトニトリルを用い、5 mg/mL PLGA, および, PEG-PLGA 溶液を調製した。

2. マイクロ流体デバイスの作製

iLiNP デバイスは、流路構造を転写したシリコンゴム (ポリジメチルシロキサン) をガラス基板に接合することで作製した。原料溶液を流路に導入するために、2 箇所の溶液導入口、および、出口に PEEK チューブを接続し、デバイスとした (図 1)。

3. PLGA 粒子の作製と抗がん剤の封入

iLiNP デバイスの 2 箇所の溶液導入口から、PLGA/アセトニトリル溶液、および、超純水を導入し、流路中で生成した PLGA ナノ粒子懸濁液を出口から回収した。原料溶液の総流量、および、流量比 (超純水: PLGA 溶液) を変えて、粒子を作製した。回収した PLGA ナノ粒子懸濁液は、4°C で一晩、外液を超純水として透析し、溶媒を除去した。透析後、動的光散乱法によって、PLGA ナノ粒子の粒径を測定した。

DDS 用 PLGA ナノ粒子作製の検証実験として、抗がん剤であるパクリタキセル (PTX) の封入を試みた。所定の量の PTX を PLGA とともにアセトニトリルに溶解した PLGA/PTX/アセトニトリル溶液を用いた。また、水相には超

Fig. 1 Schematic illustration of the iLiNP device.

Fig. 2 Relationship between the three-types of PLGA nanoparticles and the flow conditions.
(a) PLGA nanoparticles, (b) PEG-PLGA nanoparticles, (c) PLGA and PEG-PLGA blend nanoparticles.

純水を用いた。その他の粒子作製、測定は、PTXを搭載していないPLGA粒子と同様に行った。PLGAナノ粒子へのPTXの搭載量は、HPLCを用いて定量した。

研究成果

1. PLGA ナノ粒子の粒子形成挙動

本研究に用いた iLiNP デバイスの概略を図 1 に示す。脂質ナノ粒子やポリマーミセルは、脂質やポリマーの溶媒である有機溶媒がマイクロ流路中で緩衝液などの水溶液によって希釈されることで形成する。脂質ナノ粒子の場合には、溶媒の希釈速度によって粒径が変化し、希釈速度が速いほど粒径が小さくなる。また、iLiNP デバイスは、高流量、および、高流量比条件ほど溶媒の希釈速度が速く、粒径が小さくなるということが分かっている。そこで、流量条件を変えて PLGA ナノ粒子を作製し、脂質ナノ粒子系と同様のナノ粒子形成挙動になるのかを検証した。図 2(a) に iLiNP デバイスで作製した PLGA ナノ粒子の粒径と流量条件の関係を示す。脂質ナノ粒子の場合と同様に、総流量依存的に PLGA ナノ粒子の粒径が小さくなった。生成した PLGA ナノ粒子の粒径は、約 40 nm ~ 100 nm の範囲で制御可能であった。一方で、原料溶液の流量比（超純水：PLGA 溶液）は、粒径に大きく影響しないことが明らかとなった。図 3 に総流量 500 μL/min の条件で作製した PLGA ナ

Fig. 3 Size distribution of the PLGA nanoparticle.

ノ粒子の粒径分布を示す。生成した PLGA ナノ粒子は単分散であり、粒径分布は極めて狭いことが確認された。

図 2(b), (c) に PEG-PLGA ナノ粒子、および、PLGA と PEG-PLGA の混合系での平均粒径と流量条件の関係を示す。どちらの系でも PLGA 系と同様に、流量依存的に粒径を制御することができた。PEG-PLGA ナノ粒子の場合は、PLGA ナノ粒子よりも生成する粒径が小さくなり、約 30 nm ~ 80 nm の粒子が作製可能であった。一方で、PLGA と PEG-PLGA の混合系（混合比 1:1）では、それぞれ単独系よりも粒径が大きくなることが分かった。これらの結果から、iLiNP デバイスを用いることで、PLGA ナノ粒子の粒径を流量依存的に精密に制御できることが明らかになった。また、DDS への応用に向けて、PEG-PLGA との混合系においても精密な粒径制御が可能であることを確認できた。

Fig. 4 Encapsulation efficiency of PTX in PLGA nanoparticles.

2. PTX 搭載 PLGA ナノ粒子の作製

iLiNP デバイスで作製した PLGA ナノ粒子の DDS への応用可能性を検証するために、抗がん剤である PTX を搭載したナノ粒子作製を行った。PTX は比較的疎水性度が高い分子であり、疎水性コアを有する PLGA ナノ粒子への搭載が期待できる。そこで、5 mg/mL PLGA, 0.5 mg/mL PTX となるようにアセトニトリルを用いて、PLGA-PTX 溶液を調製した。PLGA の組成は、PLGA, PEG-PLGA, PLGA と PEG-PLGA の混合系 (Blend) の 3 種類を用いた。また、原料溶液の流量比は 3 に固定して粒子を作製した。動的光散乱法での測定の結果、平均粒径は PTX 非搭載のナノ粒子とほぼ同じであった。図 4 にそれぞれの PLGA ナノ粒子への PTX の搭載率を示す。図 4 に示すとおり、PTX 搭載率は、PLGA の組成に依存することが分かった。Blend が最も PTX 搭載率が高く、PLGA, および、PEG-PLGA 単独系は、ほぼ同程度の PTX 搭載率であった。PTX の搭載率は最大で約 70% であり、*in vitro* や *in vivo* アッセイに問題なく使用できる濃度であった。図 2 に示すとおり、3 種類の組成の中で Blend が最も平均粒径が大きい。そのため、PTX を搭載できる疎水性コアも他の組成と比較して大きく、より多くの PTX を搭載できたと考えられる。

まとめ

iLiNP デバイスを用いることで、PLGA ナノ粒子の粒径を原料の流量依存的に精密に制御できることを明らかにした。また、PLGA の組成が、平均粒径や PTX 搭載率に影響を与えることが分かった。今後、がん細胞で細胞生存率試験やマウスでの抗腫瘍試験などで粒子活性の評価を行う予定である。

参考文献

- Hashiba A., Toyooka M., Sato Y., Maeki M., Tokeshi M., Harashima H., The use of design of experiments with multiple responses to determine optimal formulations for *in vivo* hepatic mRNA delivery, *Journal of Controlled Release*, 327 (2020) 467–476.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.08.031>
- Kim B.S., Chuano S., Suma T., Anraku Y., Hayashi K., Naito M., Kim H.J., Kwon I.C., Miyata K., Kishimura A., Kataoka K., Self-assembly of siRNA/PEG- b-cationer at integer molar ratio into 100 nm-sized vesicular poly-ion complexes (siRNAsomes) for RNAi and codelivery of cargo macromolecules, *Journal of the American Chemical Society*, 141 (2019) 3699–3709.
<https://doi.org/10.1021/jacs.8b13641>
- Kimura N., Maeki M., Sato Y., Note Y., Ishida A., Tani H., Harashima H., Tokeshi M., Development of the iLiNP device: fine tuning the lipid nanoparticle size within 10 nm for drug delivery, *ACS Omega*, 3 (2018) 5044–5051. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00341>
- Krammer F., SARS-CoV-2 vaccines in development, *Nature*, 586 (2020) 516–527.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>
- Maeki M., Kimura N., Sato Y., Harashima H., Tokeshi M., Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 128 (2018) 84–100. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.03.008>
- Suzuki Y., Onuma H., Sato R., Sato Y., Hashiba A., Maeki M., Tokeshi M., Kayesh M.E.H., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K., Harashima H., Lipid nanoparticles loaded with ribonucleoprotein-oligonucleotide complexes synthesized using a microfluidic device exhibit robust genome editing and hepatitis B virus inhibition, *Journal of Controlled Release*, 330 (2021) 61–71.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.013>

外部発表成果

論文発表

1. Kimura N., Maeki M., Sato Y., Ishida A., Tani H., Harashima H., Tokeshi M., Development of a microfluidic-based post-treatment process for size-controlled lipid nanoparticles and application to siRNA delivery, ACS Applied Materials & Interfaces, 12 (2020) 34011–34020.
<https://doi.org/10.1021/acsami.0c05489>
2. Kimura N., Maeki M., Sasaki K., Sato Y., Ishida A., Tani H., Harashima H., Tokeshi M., Three-dimensional, symmetrically assembled microfluidic device for lipid nanoparticle production, RSC Advances, 11 (2021) 1430–1439.
<https://doi.org/10.1039/d0ra08826a>

口頭・ポスター発表

1. Bao Y., Maeki M., Ishida A., Tani H., Tokeshi M., “Microfluidic assisted preparation of a PLGA based drug delivery system”, 第10回CSJ化学フェスタ (online, Oct. 20–22, 2020) P7-007.
2. Bao Y., Maeki M., Ishida A., Tani H., Tokeshi M., “Production of sub-20 nm polymeric particles for drug delivery enabled by a microfluidic device”, 化学とマイクロナノシステム学会第42回研究会 (online, Oct. 26–28, 2020) 1P26.
3. Bao Y., Maeki M., Kimura N., Ishida A., Tani H., Tokeshi M., “Preparation of PLGA nanoparticles by using a microfluidic platform”, The 11th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2019) (Yangling, China, May 17–20, 2019) P-077.