NFkB Decoy Oligodeoxynucleotide 担持型 PLGA (乳酸・グリコール酸共重合体) ナノスフェアの粒子設計とその調製法

New Particle Design and Its Preparation of NFkB Decoy Oligodeoxynucleotide (NDON) Loaded PLGA Nanospheres for Gene Delivery

辻本 広行,^a 塚田 雄亮,^a 原 香織,^a 川島 嘉明^b

Hiroyuki Tsujimoto, Yusuke Tsukada, Kaori Hara, Yoshiaki Kawashima

Received 12 December 2006 ; Accepted 28 March 2007

New preparation techniques of PLGA nanospheres as delivery carrier for water-soluble and anionic NFkB Decoy Oligodeoxynucleotide (NDON) were studied. It was found that the cationic Chitosan (CS) coated PLGA nanospheres prepared by standard emulsion solvent diffusion method can support anionic NDON not only inside themselves but also on their outer layers by the electrostatic interaction between CS and NDON, by adding NDON to the CS coated PLGA nanosphere suspension.

By optimizing concentration of CS and NDON in the method, three types of PLGA nanospheres which are 1) NDON encapsulated type, 2) Encapsulated/surface-supported type and 3) Surface-supported type can be prepared as NDON delivery particles.

Keywords : PLGA nanosphere, Gene delivery, Emulsion solvent diffusion method, Particle design, NFkB Decoy Oligodeoxynucleotide (NDON), Drug delivery system (DDS)

1. 緒 言

対処療法の困難な難治性疾患に対する新たな治療戦略として、遺伝子や核酸医薬を標的細胞核内へ送達させ根治療法を目指す遺伝子治療が研究されている。しかし、薬剤の体内および細胞内動態を制御し、核内への高い導入効率を実現することが容易ではなく、有効な治療成績を挙げるには至っていない。遺伝子の送達技術の改善は、遺伝子治療の実用化にとって必要不可欠である。遺伝子の送達に微粒子キャリアに用いる例としては、リポソーム^{1,2)}やポリマー微粒子^{3~5)}の利用が知られており、乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)ナノスフェア^{6~8)}を用いた先駆的な研究は川島らにより行われている。この粒子調製では水中エ

マルション溶媒拡散法(ESD法)を發展させ、従来アニオン性のPLGAへの封入が困難であった水溶性でかつアニオン性のプラスミドpDNAやsiRNAを、カチオン性脂質とイオンコンプレックスにしてPLGA溶液への相溶性を高めることで、遺伝子のPLGAナノスフェア内部への封入率を向上⁸⁾させている。さらに、PLGAの貧溶媒中にカチオン性高分子のキトサン(CS)を溶存させることで、析出するPLGAナノスフェアの表面をCSで修飾してPLGAの内包成分の漏洩を抑制するとともに、アニオン性である細胞への相互作用を高め細胞内導入率も向上⁸⁾させた。しかし、一般に遺伝子や核酸薬剤のPLGAナノスフェアへの封入量は少なく、製剤設計の観点からは多量の薬剤への適用を考えた場合、PLGAナノスフェアへの担持量をさらに高めうる粒子調製法の改良が必要である。この例の核酸薬剤としては、アニオン性でかつ水溶性のNFkB Decoy Oligodeoxynucleotide (NDON)がある。これは多面的抗炎症作用を有し^{9~11)}、難治性のアトピー性皮膚炎に臨床応用され、2% NDON含有軟膏による治療効果¹²⁾が報告されている用量の多い核酸医薬である。本研究では、これを

a 株式会社 ホソカワ粉体技術研究所
(〒573-1132 大阪府枚方市招提田近1-9) TEL 072-855-2231
Hosokawa Powder Technology Research Institute
(9-1-chome, Shoudai, Tajika, Hirakata, Osaka 573-1132, Japan)

b 愛知学院大学 薬学部
(〒464-8650 名古屋市千種区楠元町1-100) TEL 052-751-2561
Faculty of Pharmacy, Aichi Gakuin University
(1-100, Kusumoto, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan)

PLGA ナノスフェアに高含量に担持する粒子設計として、ESD 法により PLGA ナノスフェア内部に NDON を封入しておき、さらに引き続き、CS 修飾した PLGA ナノスフェア表面へ NDON を静電的作用によって担持させる新規な方法を提案する。以下に本法の検討結果を記す。

2. 実験方法

2.1 材 料

PLGA ナノスフェアの基材（和光純薬工業製）は分子量が 20,000 で、乳酸とグリコール酸の比率は 75 : 25 である。NDON（アンジェス MG 製）の分子量は約 14,000 である。PLGA ナノスフェアの晶析用の分散安定剤はポリビニルアルコール（クラレ製、ポバール 403、重合度 = 300、けん化度 = 78.5 ~ 81.5、以下 PVA と略す）であり、PLGA ナノスフェアのコーティング基材はカチオン化キトサン（片倉チッカリン製、ヒドロキシプロピルトリモニウムキトサン、以下 CS と略す）を用いた。

2.2 ESD 法による CS 修飾 PLGA ナノスフェアの調製手順

PLGA 1g をアセトン 43ml 中に溶解し、これを精製水 6ml と混合し PLGA 溶液とした。つぎに、PLGA の貧溶媒となる 2wt % PVA 水溶液 25ml を 40℃ で攪拌しつつ、その中へ PLGA 溶液を 4ml / min の速度で滴下した。そうすると既報⁷⁾の通り、良溶媒の貧溶媒への急速な拡散に伴い PLGA ナノスフェアが析出した懸濁液が得られた。この懸濁液の攪拌は PLGA 溶液の添加後も 5 分間継続した。その後、さらに攪拌を継続しつつアセトンを 40 分かけて留去した。こうして得られた PLGA ナノスフェア懸濁液は、凍結乾燥法で粉末化した。本実験では貧溶媒中の CS 濃度が生成粒子に及ぼす影響を調べるために、PVA 濃度は固定し CS 濃度を 0 から 1.2wt % まで変えつつ粒子を調製した。

2.3 NDON 内包型 PLGA ナノスフェアの調製手順

2.3.1 CS 修飾をしない NDON 内包型 PLGA ナノスフェア (Sample - 1) の調製

Sample - 1 は 2.2 の CS 修飾 PLGA ナノスフェアの調製と同じく、50mg の NDON を PLGA 溶液中に溶解させたが、貧溶媒には CS を加えずに懸濁液を調製した。この懸濁液は遠心分離操作で PLGA ナノスフェアに吸着しない余剰分の PVA を除去後、凍結乾燥で粉末化された。

2.3.2 CS 修飾した NDON 内包型 PLGA ナノスフェア (Sample - 2) の調製

2.2 の調製における最適な CS 濃度は、後記の実験結果の考察から 0.4wt % と決定した。したがって、以下の CS 修飾した NDON 担持型 PLGA ナノスフェア調製時は CS 濃度を全て 0.4wt % とした。Sample - 2 は Sample - 1 と同じ手順であるが、貧溶媒中には CS を添加し、NDON を 50mg 内包した CS 修飾型 PLGA ナノスフェアとした。

2.4 NDON 内包/表面担持型および表面担持型 PLGA ナノスフェアの調製手順

CS 修飾した NDON 内包型 PLGA ナノスフェア表面に NDON を担持させる内包/表面担持型の Sample - 3、Sample - 4 および Sample - 5 の調製法は、いずれもアセトン留去後の PLGA ナノスフェア懸濁液中に NDON 水溶液 (0.17wt %) を添加し、その後、遠心分離せずに凍結乾燥し NDON を粒子表面に固定化させる。これを NDON の後添加法と呼ぶ。この後添加している NDON 固形分は Sample - 3 では 10 mg、Sample - 4 は 20mg、Sample - 5 は 30mg であり、NDON 量の違いが及ぼす影響を見た。

さらに、Sample - 6 は同様に NDON の内包量を 60mg にしておき、後添加法で NDON を 20mg 添加した。Sample - 7 では 30mg の NDON を後添加法で PLGA ナノスフェア表面に担持させたが、PLGA 内部への封入は行わなかった。

2.5 PLGA ナノスフェアの物性評価

PLGA ナノスフェアの体積基準の平均粒子径は、動的光散乱法 (UPA, MICROTRAC 製) で測定した。ゼータ電位は電気泳動法 (ZETASIZER Nano-ZS, シスメックス製) で求めた。

NDON の定量は分光光度計 (V-530, 日本分光製) で NDON の吸収極大波長 260nm の吸光度を測定し、これを事前に既知濃度から作成した検量線を参照することで算出した。吸光度測定用の試料の調製条件をつぎに記す。

1) NDON を内包/表面担持させた、あるいは内包ないし表面担持させた PLGA ナノスフェア 40mg を 50 ml メスフラスコで秤量し 3.3 mol/l NaCl 水溶液 (pH 12, 10 mol/l NaOH) 1 ml を加え分散させた。

2) そこへアセトニトリル 9 ml を加え、PLGA ナノスフェアを溶解させた。

3) つぎに 3.3 mol/l NaCl 水溶液 35 ml を加え、PLGA を析出させつつ NDON を溶解させ、5 分間放置後、50 ml にメスアップ (アセトニトリル : 3.3

mol/l NaCl 水溶液 = 1 : 4) し、メンブレンフィルター (孔径: 0.2 μm , フィルター材質: 親水性 PTFE) でろ過し、ろ液を測定試料とした。

2. 6 PLGA ナノスフェアからの NDON の溶出試験

前記の NDON の定量法では NDON 内包/表面担持型 PLGA ナノスフェアについては、NDON の内包分と表面担持分を同時に測定しており、NDON が PLGA ナノスフェアに内包されているのか、表面担持されているかの区別については評価できない。その区別の考察を目的として、本実験で得られた内包型 PLGA ナノスフェア (Sample-2) と表面担持型 PLGA ナノスフェア (Sample-7) については、生理食塩水 (大塚製薬製) 中での NDON の溶出率を以下の手順で評価した。

1) それぞれの PLGA ナノスフェアについて、500 mg をガラス瓶に秤量し生理食塩水 50 ml を加えて密栓後、ホットスターラー上の温水浴中に浸し 32 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で攪拌させた。

2) 所定時間に 5 ml をサンプリングし、10 mol/l NaOH 100 μl を添加後、0.2 μm のメンブレンフィルターでろ過した。

3) 得られたろ液 1 ml を 10 mol/l NaOH により pH12 に調製した 3.3 mol/l NaCl 水溶液で 10 倍希釈後、前節と同様に分光光度計で定量し、NDON の溶出率を求めた。

3. 実験結果及び考察

3. 1 溶出試験による NDON の PLGA ナノスフェアへの修飾状態の考察

生理食塩水中の内包型 PLGA ナノスフェアからの NDON の溶出量は、10 時間後で 3wt % 以下であった。その後、100 時間で 37wt %, 350 時間で 70wt %, 700 時間後には約 85wt % の NDON が溶出しており、PLGA の加水分解に伴う徐放性の放出パターンが示された。一方、表面担持型の場合、10 時間までに 75wt % の NDON が即効的に溶出後、100 時間で 85wt %, 350 時間では 90wt % と緩やかな溶出となった。すなわち、内包処理と表面担持処理では、PLGA ナノスフェアに対する NDON の存在場所や相互作用が異なり、放出挙動が大きく違っている。これらのことから、NDON を PLGA ナノスフェアへ一旦内包後、後添加で表面担持している本実験条件の範囲では、内包および後添加時にそれぞれ仕込んだ NDON のほぼ全量近くが、PLGA ナノスフェアへ内包およ

Fig. 1 Effect of cationic-chitosan concentration on mean particle size and zeta potential of PLGA nanosphere prepared by ESD method

び表面担持されているものと推察した。

3. 2 CS 濃度が PLGA ナノスフェアの物性に及ぼす影響

Fig. 1 は、貧溶媒中の CS 濃度を変えて調製した PLGA ナノスフェアの、凍結乾燥の前後における平均粒子径とゼータ電位を示す。CS 濃度を高めていくと、平均粒子径は増大し、ゼータ電位はマイナスからプラスへ転じる。ゼータ電位による粒子分散の観点からは、その値が 0 近傍で粒子間の静電的斥力が減少し粒子凝集による粒子径の増大が見られると考えたが、凍結乾燥前の平均粒子径は CS 濃度の増加に伴い増大しており、その影響をより強く受けていると推定された。これに関連し Fig. 2 は、CS 濃度が 0, 0.4 および 1.2wt % の凍結乾燥前の PLGA ナノスフェアの粒度分布を示す。それらの幾何学的標準偏差はそれぞれ 1.26, 1.61, 1.37 と小さく、粒度分布にも粗大粒子側のピークは出ておらず、1 次粒子同士の凝集の少ない粒子が調製された。これらの粒度分布は、CS 濃度を高めて調製するに従い粗大粒子側にシフトしてい

Fig. 2 Particle size distribution of cationic-chitosan coated PLGA nanosphere measured by dynamic light scattering method

Table 1 The characteristics of NDON loaded PLGA nanosphere prepared by ESD method and its preparation conditions

Sample	Preparation conditions			Mean particle size (nm)	Zeta potential (mV)	Loading efficiency of NDON (%)	Type of NS	Notional NS's structure
	Polymer solvent (NDON (mg) / PLGA (g))	Poor solvent	Additional NDON before freeze dry (mg)					
1	50/1	2.0 % PVA / 25 ml	0	223	- 46.3	9 (0.42)*	Encapsulated	
2	50/1	2.0 % PVA and 0.4 % CS/25 ml	0	360	+ 4.9	94 (4.5)		
3	50/1	Same as above	10	348	+ 50.1	89 (3.2)	Encapsulated / surface-supported	
4	50/1	Same as above	20	355	+ 46.8	83 (3.5)		
5	50/1	Same as above	30	533	+ 27.1	88 (4.2)		
6	60/1	Same as above	20	474	+ 43.1	98 (4.7)		
7	0/1	Same as above	30	413	+ 55.8	95 (1.2)	Surface-supported	

* The value in parentheses indicates content of NDON of PLGA nanosphere (wt %)

PLGA PVA Chitosan NDON

る。このシフト分は、主に PLGA ナノスフェア表面の CS 層の厚みの他、晶析時の液滴サイズは CS 濃度を高めるに従い貧溶媒へのアセトンの拡散速度が低下するので、PLGA ナノスフェアの 1 次粒子自体が大きくなっていくためではないかと推定する。また、この CS 濃度の範囲内では、CS の高分子鎖を介した粒子間の架橋現象は、PLGA ナノスフェア表面で水和層を形成しうる PVA 分子層による立体障害効果¹³⁾によって抑制されていると考える。

つぎに、凍結乾燥後の結果を見る。Fig. 1 によると平均粒子径はゼータ電位がプラスへ転じる CS 濃度 0.2wt % を超えると急増し、それ以降ではほぼ一定値を示した。Fig. 2 に CS 濃度 0.4wt % の結果も示しているが、この幾何学的標準偏差は 2.06 と凍結乾燥前のものに比べて大きく、マイクロサイズ領域には主に凍結乾燥に伴う 1 次粒子同士の凝集により形成された再分散の困難な粒子群の分布が認められた。

本研究の粒子設計において、アニオン性 NDON の PLGA ナノスフェア表面への高含量担持には、PLGA ナノスフェアのゼータ電位を CS 修飾によりプラス側へより高めておく必要があるが、キャリア粒子として

は粒子の凝集を極力避けねばならない。また、後記する NDON の内包率の点も考慮して、ゼータ電位の上昇が平衡をたどり始める 0.4wt % の CS 濃度を最適条件と考え、以降の NDON 担持型 PLGA ナノスフェアの調製はこの濃度で行った。

3. 3 NDON 担持型 PLGA ナノスフェアの粒子物性評価

Table 1 に、測定した粒子物性値を示す。PLGA ナノスフェアの水中再分散時の平均粒子径は 223～533nm であった。ゼータ電位は Sample-1 の PLGA ナノスフェアはマイナスである。カチオン性の CS を修飾した Sample-2～Sample-7 ではプラスである。ここで、Sample-2 は遠心分離操作により余剰の CS を除去して作製したものであり、遠心分離していない Sample-3～7 に比べてゼータ電位は低い。

CS 修飾していない NDON 内包型の Sample-1 の NDON 含有率は 0.42 % であり、NDON の仕込み量から計算した含有率の 4.8 % に比べ低値であった。同じく内包型の Sample-2 は CS 修飾をしたものであるが、こちらは 4.5 % 仕込んだ NDON がほぼ全量封入されていた。なお、ここでは表に示さないが、CS

修飾を0.2%で行ったPLGAナノスフェアにも同様に封入したが、NDONの含有量は3.1%に留まった。これらの違いは、水溶性でかつアニオン性のNDONは、同じくアニオン性のPLGAの内層には留まり難く、また、晶析時は外水相へと漏洩しやすい。しかし、CSを貧溶媒に溶存させていると、PLGAの液滴形成時に漏出したNDONは液滴界面でCSと不溶性のイオンコンプレックスとなり、その結果、ほぼ全量のNDONがPLGAナノスフェアに留まるのではないかと推定する。

つぎに、NDONのPLGAナノスフェアへの内包量を50mgに統一し、後添加量を変えたSample-3、Sample-4およびSample-5の比較では、NDONの添加量の増大によりゼータ電位は減少し、NDONのPLGAナノスフェアへの担持量は増大した。すなわち、後添加のNDONはPLGAナノスフェア表面のCS層との間に生じる静電的引力を駆動力としてCS層表面に吸着し、不溶性イオンコンプレックスとなり、PLGAナノスフェア表面に固定化されるので、粒子表面電荷はCSとNDONの割合により制御されているといえる。NDONの後添加量を30mgまで上げたSample-5では平均粒子径が急激に大きくなり、ここでは示さないが粒度分布は500nmと3 μ mにピークを有する双峰性を示した。すなわち、NDONの担持層がある量を超えてくると凍結乾燥で固定化されたNDONの高分子鎖同士の絡み合いが生じ、再分散時のPVA層での水和が不十分となり、再分散できない程度のPLGAナノスフェア同士の強い凝集粒子が生成されるためと考える。

つぎに、Sample-6は、Sample-5と同一のNDON担持量であるが、内包量を60mgへと高め表面担持分を20mgに減じている。平均粒子径は減小し、ゼータ電位は増大していた。これらの結果を、同

じ表面担持量で内包量を50mgに減じたSample-4と比べると、平均粒子径は増大し、ゼータ電位はわずかであるが減小した。さらに、NDONを内包せず表面担持分のみ30mgとしたSample-7は、同じ表面担持量で内包量を50mgにしたSample-5と比べ、粒子径は小さくなり、ゼータ電位は増大していた。

このようなNDONの担持量と内包および表面担持への割合が粒子径に及ぼす影響は、PLGAナノスフェア表面に吸着したNDON高分子鎖の絡み合いに起因する凝集作用と、PVAの水和による分散安定化作用との競合関係に因るものと考ええる。本実験からは、一定量のNDONをPLGAナノスフェアに担持する場合、NDONの内包量を増す方が、表面担持分を増すよりもPLGAナノスフェアの平均粒子径の増大を抑制できることが分った。これらの知見に基づいて、粒子径とゼータ電位を制御したNDON内包型、内包/表面担持型、および表面担持型のPLGAナノスフェアの粒子調製の指針が得られた。

4. 結 言

CS修飾PLGAナノスフェア懸濁液へNDONを後添加する操作を加えることで、NDON表面担持型PLGAナノスフェアが調製できた。CS濃度の増加に伴い、PLGAナノスフェアのゼータ電位と1次粒子径はともに増大し、粒子の再分散性は低下するので、0.4wt%のCS濃度を最適条件として、NDON担持型PLGAナノスフェアを調製した。その結果、凝集の少なくNDONの封入率も維持されるNDON内包型、内包/表面担持型、および表面担持型の担持構造の異なる3種のPLGAナノスフェアを構築できる条件が見出された。本粒子は今後、遺伝子担持型PLGAナノスフェアとしての*in vitro*, *in vivo* 評価系においての薬理評価を進めたい。

References

- 1) Ishida, T. and H. Kiwada : "Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes after repeated injection", *Drug Delivery System*, **19** (6), 495-510 (2004)
- 2) Kikuchi, H. : "Liposomal formulation technology : in the case of preparation of liposomes for gene delivery", *Drug Delivery System*, **19** (6), 530-538 (2004)
- 3) Wiethoff, C. M., J. G. Koe, G. S. Koe and A. C. Middaugh : "Compositional effects of cationic lipid/DNA delivery systems on transgene expression in cell culture", *J. Pharm. Sci.*, **93** (1), 108-123 (2004)
- 4) Godbey, W. T., K. K. Wu and A. G. Mikos : "Poly (ethylenimine) and its role in gene delivery", *J. Control. Release*, **60**, 149-160 (1999)
- 5) Ando, S., D. Putnam, D. W. Pack and R. Langer : "PLGA microspheres containing plasmid DNA : Preservation of supercoiled DNA via cryopreparation and carbohydrate stabilization", *J. Pharm. Sci.*, **88** (1), 126-130 (1998)
- 6) Kawashima, Y., H. Yamamoto, H. Takeuchi, T. Hino and T. Niwa : "Properties of a Peptide Containing DL-lactide/glycolide Copolymer Nanospheres Prepared by Novel Emulsion Solvent Diffusion Methods", *Eur. J. Pharm. Biopharma.*, **45**, 41-48 (1998)
- 7) Kawashima, Y. : "Design of Poly (Lactic-co-glycolic

- Acid) (PLGA) Nanosphere for Developing to DDS", *J. Pharm. Sci. Technol., Japan.*, **66** (4), 224-238 (2006)
- 8) Sakai, T., H. Yamamoto, H. Takeuchi and Y. Kawashima : "Particulate Design of Chitosan Coated Nanoparticle for Gene Delivery", Proc. of the 124th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, 4, 30P2 III-419, p. 109 (2004)
 - 9) Morishita, R., M. Aoki and Y. Kaneda : "Oligonucleotide-based Gene Therapy for Cardiovascular Disease : Are Oligonucleotide Therapeutics Novel Cardiovascular Drugs ? ", *Current Drug Targets*, **1**, 15-23 (2000)
 - 10) Nakamura, H., M. Aoki, K. Tamai, M. Oishi, T. Ogi-hara, Y. Kaneda and R. Morishita : "Prevention and Regression of Atopic Dermatitis by Ointment Containing NF- κ B Decoy Oligodeoxynucleotides in NC/Nga Atopic Mouse Model", *Gene Therapy*, **9**, 1221-1229 (2002)
 - 11) Morishita, R. : "Perspective in Progress of Cardiovascular Gene Therapy", *J. Pharmacol. Sci.*, **95**, 1-8 (2004)
 - 12) Tamai, K., K. Hashimoto, Y. Kaneda and R. Morishita : "Research Concerning the Developments of Novel Curative using Gene-related Drugs for Severe Atopic Dermatitis", General Report of Research with Health and Labour Sciences Research Grants (Preventive and Therapeutic Research Project concerning immune and allergic disease), pp. 1-5 (2004)
 - 13) Kamiya, H. : "Interaction between Nanoparticle", Nanoparticle Technology Handbook, Nikkan Kogyo, pp. 109-112 (2006)