

2020年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	マイクロフルイディクスを用いた赤血球膜成分融合 ナノ粒子の創製
キーワード	①ドラッグデリバリーシステム、②マイクロフルイディクス、 ③ナノ粒子製剤

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	イタクラ ショウコ 板倉 祥子
配付時の所属先・職位等 (令和2年4月1日現在)	城西大学 薬学部 助教
現在の所属先・職位等 (令和4年7月1日現在)	城西大学 薬学部 助教
プロフィール	2015年京都薬科大学大学院薬学研究科薬科学専攻博士後期課程修了。博士(薬科学)。日本学術振興会特別研究員DC2、PD後、複数機関での博士研究員を経て、2019年4月より現職。専門は薬物送達学で、生体膜を利用したナノ粒子製剤の開発に取り組んでいます。

1. 研究の概要

本研究では、がん治療のドラッグデリバリーシステム(DDS)として、マイクロフルイディクスを用いた自己血由来の赤血球膜成分からなる生体適合性ナノ粒子の構築を目指した。赤血球膜成分を単離し、マイクロフルイディクスの微細流路に送液する流速条件を実験計画に基づいた応答局面法を用いることにより探索し、ナノサイズの赤血球膜からなる抗癌剤を封入したナノ粒子が調製できた。本研究により、マイクロ流体デバイスを用いた新しい調製方法を構築し、生体由来の成分のナノ粒子化が可能となった。赤血球膜に限らず応用可能であり、近年の医薬品開発は生体成分を利用した製剤開発も盛んに行われている中、その製剤設計および調製方法の開発に貢献することが期待できる。

2. 研究の動機、目的

脂質からなるナノ粒子製剤は、癌治療をはじめ様々な疾患を標的としたDDSとして期待されているが、高い血中滞留性と生体適合性を有する製剤開発が課題である。赤血球は、脂質二重膜からなる血液成分であることから生体適合性、血中安定性、滞留性が期待でき、患者由来の赤血球の利用によって免疫応答も回避することが可能である。しかし、赤血球のサイズは直径約7 μm と、そのままでは製剤にはならないこと、薬物を効率よく内封する新たな方法の開発が必要とされる課題が残されている。そこで、近年、人工脂質を用いたナノ粒子製剤にも利用されているマイクロフルイディクスに着目した。マイクロフルイディクスは、微小な流路内で流体を取り扱う技術で、スケールの効果により化学反応や分析の高速化、高効率化が可能となる。この技術を生体成分ナノ粒子の作製に利用するため、赤血球膜成分を単離し、薬物を封入したナノ粒子を構築することを目的とした。

3. 研究の結果

マイクロ流体デバイスによる赤血球膜を利用したナノ粒子を調製するため、調製方法を検討した。マウスより全血を採取し、遠心分離(4 $^{\circ}\text{C}$ 、800 $\times\text{g}$ 、5分)後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)

で洗浄し、赤血球画分を得た。低張 PBS 溶液 (0.25×PBS) で溶血させ、洗浄後、赤血球膜を得た。得られた膜成分を BCA 法によりタンパク質濃度を測定した。単離した赤血球膜を PBS に懸濁し、超音波処理をした。使用したマイクロ流体デバイス (Blacktrace Holdings Ltd) とポンプを図 1 に示す。マイクロ流体デバイスの流路 X より薬物として抗癌剤のドキシソルビシン塩

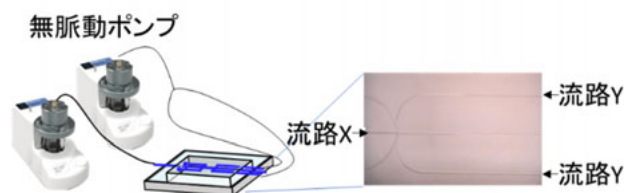


図1. マイクロ流体デバイス

酸塩 (DXR) の PBS 溶液、流路 Y よりタンパク質濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように溶解させた赤血球膜を送液した。流速は予備検討により、流路 X は 30~350 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、流路 Y は 30~550 $\mu\text{L}/\text{min}$ の範囲を設定し、検討した。流速条件について、中心複合実験計画に基づく応答局面解析を行った。流路 X、流路 Y の 2 因子の流速条件を実験計画により設定し、平均粒子径、多分散指数 (Pdl)、DXR の封入量を測定した。得られたデータを非線形応答局面法により解析した結果を図 2 に示す。平均粒子径は、検討範囲の流速の中で、赤血球膜溶液の流速が速く、DXR 溶液の流速が中程度以下で小さくなった。また、いずれの流速も速いほど Pdl が小さく、DXR 封入量が高い結果が得られた。これらのデータから、平均粒子径および Pdl が最小かつ DXR 量が最大になる条件を解析した結果、流路 X が 285 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、流路 Y が 380 $\mu\text{L}/\text{min}$ となった。この条件で得られた粒子の粒子径は 678 nm、Pdl は 0.79 であった。

以上の結果より赤血球膜を単離し、マイクロ流体デバイスを用いた薬物封入ナノ粒子の調製を行い、赤血球膜を材料とした抗癌剤封入ナノ粒子の調製に成功した。今回得られた粒子は、多分散で粒子径が比較的大きかったため、血管から漏出し、腫瘍への高い集積が期待できる 100~200 nm 程度のより小さい粒子を検討する。応答局面法により探索した条件をもとに、流速以外にも赤血球膜の濃度や薬物濃度の条件も検討することが必要だと考えられる。

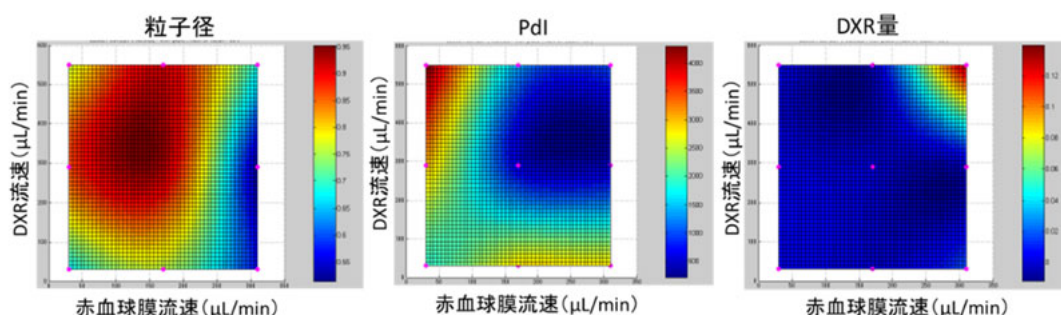


図2. 流速に対する粒子径、Pdl、DXR封入量の応答局面

4. 研究者としてのこれからの展望

本研究では、マイクロフルイディクスを用いて赤血球を再構築することで、生体適合性に優れたドラッグデリバリーシステムの開発を目指した。生体膜脂質と類似構造の人工リン脂質からなるナノ粒子製剤は、抗癌剤などの DDS として臨床応用がすでに実現しているが、コロナウイルス感染症の出現により mRNA ワクチンのデリバリーシステムとしてさらに注目を浴びている。医薬品は、化学合成でつくられる低分子の有機化合物から抗体をはじめとするタンパク質製剤、核酸医薬、遺伝子治療薬、細胞医薬など多様化が進んでいる。これらの薬物ごとに最適なシステムで、体内での挙動をコントロールすることが重要である。脂質のナノ粒子は、これらの薬物を生体内での分解から保護し、目的の部位へ効率的に送達する機能性などの工夫により実用化に大きく貢献してきた。私は、その素材として本研究で利用した赤血球などの生体膜に注目している。体内の機能性器官や、近年、細胞外小胞など既に体内に存在する生体膜を利用することで、生体適合性に優れ、生体成分の機能を最大限に発揮する DDS の開発に挑戦したい。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

この度は、研究助成金のご支援を賜り、日本私立学校振興・共済事業団、関係者各位に深謝いたします。助教として赴任して初めて採択いただいた助成金であり、これからの活動の基盤となるような研究に挑戦することができ、大変励みになりました。ナノ粒子を用いた DDS は siRNA や RNA ワクチンの実用化により、今後も様々な疾患や薬物に対して盛んに開発されていくと考えられます。生体分子を薬物送達に活用することはこれまでも研究されてきましたが、新たな調製技術により様々な生体膜のナノ粒子化と医療応用に取り組んでいきたいと考えております。医療分野の研究は日進月歩で発展し続けており、他分野との融合や新しいものを取り入れ、チャレンジしていきたいと思っております。未来の人々の命や健康に少しでも貢献できるよう、今後も精進してまいります。