

論文の内容の要旨

論文題目 薬剤搭載高分子ナノミセルによる胎盤通過性を制御した新規早産治療薬の開発
氏名 鈴木 研資

早産は新生児死亡の原因の 35%、5歳以下の乳幼児死亡の原因の 16%を占め、新生児の罹病率や死亡率の主要な原因となっている。早産の治療法に関してはこれまでも研究が重ねられてきたが、早産率は年々増加傾向にあり、より良い治療方法の確立は産科領域における重要な課題と言える。早産の主要な原因として、膣からの細菌性感染と炎症の上行性の波及が知られており、このプロセスには炎症性細胞であるマクロファージが関与している。マクロファージによる炎症性サイトカインの分泌はアラキドン酸カスケードにおけるシクロオキシゲナーゼを介したプロスタグランジンの産生が亢進させ、子宮収縮の促進と子宮頸管の熟化といった早産の主症状を引き起こされる。このシクロオキシゲナーゼを阻害し、プロスタグランジンの産生を抑制するインドメタシン (IND) は、強力な子宮収縮抑制効果を有し、早産の治療薬としての有効性が知られている。しかしながら IND は胎盤通過性を有し、胎児動脈管狭窄をはじめとする胎児毒性をきたすため、本邦においては禁忌、諸外国においては妊娠 32 週未満、48 時間以内の投与と使用が制限されている。

本研究では、ナノテクノロジーによる薬物送達システムに着目し、高分子ナノミセルに IND を搭載することで胎盤通過性を制御したインドメタシン搭載高分子ナノミセル

(IND/m) の開発を行った。高分子ナノミセルは、ポリエチレングリコール (PEG) 鎖を主成分とする親水基とポリアミノ酸鎖を主成分とする疎水基によって構成されるポリマーが自己会合することによって形成される。ポリマーへの IND の結合は、ポリアミノ酸のヒドロキシル基と IND のヒドロキシル基を置換することで行った。自己会合によってミセルの外側が親水性、内側が疎水性で IND を含む IND/m が完成した。ミセル全体は水溶性の性質を示し、ポリマーを構成する PEG 鎖の伸長によって大きさを自由に設計することが可能である。IND の胎盤通過性は、分子のサイズが小さいことと、脂溶性であることに起因することが考えられるため、IND のミセル化はこれらの性質を同時に改善し、胎盤通過性を制御する可能性がある。

分娩後のヒト胎盤を用いて、胎児循環と母体循環を模倣し、薬剤の胎盤通過性を検証するヒト胎盤灌流モデルを用いて、IND/m に構造が類似した PEG でコーティングされた金ナノ粒子を用いて、高分子ナノミセルのサイズの違いによる胎盤通過性について検証した。10 nm-30 nm の金ナノ粒子はサイズ依存性に胎盤通過率が低下し、30 nm の金ナノ粒子はほとんど胎盤を通過しなかった。この結果に基づき、我々は 44 nm の IND/m を生成した。ミセルには臨界ミセル濃度と呼ばれる、ミセル形成に関わる濃度が存在し、ポリマーの濃度が臨界ミセル濃度以上になると、ポリマーは自己会合によってミセルを形成するが、希釈によって溶液中のポリマーの濃度がこの濃度以下になるとミセル構造は破綻

し、ミセルは分解する。血液中に投与された IND/m が希釈によって容易に分解しない安定した構造にすることを企図し、Diels-Alder 反応を用いてポリマー間を架橋結合し、架橋インドメタシンミセル (CL-IND/m) を生成した。生成したミセルは Dynamic Light Scattering で多分散性指数が 0.057 (<0.1) の単分散分布で、均一な構造であることを示した。また、CL-IND/m にミセルを不安定化させる界面活性剤である 20%ドデシル硫酸ナトリウムを付加しても粒子の濃度は変化せず、安定した構造であることを示した。次にミセルが生体内で分解し、IND を放出する機序として「エンドソーム内の pH 変化により、CL-IND/m が分解し、IND が放出される」、「マクロファージ内のエラスターゼによって CL-IND/m が分解し、IND が放出される」という 2 つの仮説を立て、仮説に基づいた検証を行った。生理的環境を pH7.3、エンドソーム内環境を pH5.3 として、pH を調整した MQW 水に対して CL-IND/m を透析し、透析液中の IND 含有量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で検証した。IND は pH7.3、pH5.3 いずれの透析液中からも検出されなかった。この結果は、CL-IND が分解し、IND を放出する機序として pH の変化だけでは不十分であるが、周囲環境の pH 変化によらず CL-IND/m が分解を受けない、安定性の高い構造であることを示唆した。一方、マウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞を用いて IND、CL-IND/m を共培養したところ、RAW264.7 細胞内から同程度の IND が検出され、IND/m が RAW264.7 細胞内で分解されたことが示唆された。

生成した CL-IND/m はマウスを用いて早産抑制効果の評価、胎盤通過性評価、薬物動態評価、胎仔・出生仔への毒性評価を行った。膣からの上行性細菌感染と炎症の波及を模倣して Lipopolysaccharide を子宮頸管に投与し、早産マウスモデルを作成し、開発した CL-IND/m の早産抑制効果について検証した。CL-IND/m 治療群による早産率は生理食塩水 (NS) を投与したコントロール群に比べて有意に低く、IND 治療群と同等の早産率を示し (CL-IND/m : 16.7%, IND : 15.4%, NS : 85.7%, $p<0.05$)、CL-IND/m は早産と同等の早産抑制効果を有することを示した。CL-IND/m のポリマーを蛍光標識し、早産マウスモデルに投与して投与後 1 時間、4 時間、8 時間、24 時間の母獣臓器と胎仔への CL-IND/m を評価した。肝臓、腎臓、脾臓、子宮、胎盤における CL-IND/m の蓄積量は経時的に増加したが、いずれの時点においても胎仔への蓄積は認めず、CL-IND/m の早産マウスモデルにおける胎盤通過性が極めて低いことが示唆された。正常妊娠マウスへの CL-IND/m 投与においては、24 時間後における胎仔への CL-IND/m の分布量は IND に比べて低く (CL-IND/m : $0.013 \pm 0.0058\%$, IND : $0.57 \pm 0.21\%$)、胎盤、肝臓への CL-IND/m の分布量は IND に比べて高かった [胎盤 (CL-IND/m : $7.10 \pm 1.40\%$, IND : $4.03 \pm 2.24\%$)、[肝臓 (CL-IND/m : $12.3 \pm 3.20\%$, IND : $3.70 \pm 1.25\%$)]。腎臓、脾臓における CL-IND/m の分布量は IND と同等であった。胎仔への分布量の違いは IND のミセル化によって胎盤通過性が減少したことを示唆し、CL-IND/m が絨毛膜羊膜炎に代表される胎盤の炎症に効果的に作用する可能性を期待させる結果であった。肝臓への蓄積は、細網内皮系による生体内の異物除去機構によるものと考えられるが、肝臓や脾臓への蓄積量は既

報と比べて低く、ミセルが細網内皮系による生体内からの排除機構を回避した可能性が示唆された。CL-IND/m の毒性評価については、胎仔の動脈管狭窄に関する影響と出生仔の生命予後、出生仔の出生後体重増加に関する検討を行った。HE 染色を用いた組織学的評価において、IND の投与がマウスの動脈管を狭窄させることが観察された一方で、CL-IND/m の投与は NS 投与と同様にマウスの動脈管を狭窄させなかった。早産マウスモデルから出生した出生仔については、NS 投与群、IND 投与群、CL-IND/m 投与群において出生仔の生命予後、出生後の体重増加に差を認めず、IND や CL-IND/m による治療が出生仔に悪影響を及ぼさないことが示唆された。

また、ヒト胎盤における CL-IND/m の胎盤通過性の検討として、ヒト胎盤灌流モデルによる評価を行った。CL-IND/m、IND の 60 分間の灌流実験において、CL-IND/m は IND に比べて胎盤通過率が低く (CL-IND/m : 0.034 %, IND : 17.6 %)、IND はミセル化によってヒト胎盤灌流モデルにおける胎盤通過性を減少させることが示された。

以上の結果は、高分子ナノミセルを用いた IND のミセル化が、マウス胎盤、ヒト胎盤において胎盤通過性を制御したことを示唆し、マウスにおいては CL-IND/m が早産の治療標的臓器である子宮や胎盤に有効に送達され、胎仔に分布して胎児毒性を示すことなく早産を抑制することを示した。CL-IND/m は、胎盤通過性が極めて低く、胎児毒性の懸念なく使用可能な新規早産治療薬となる可能性がある。