

ナノメディシン ナノサイズの医薬品のための包括的な測定

今日においてナノテクノロジー特にナノメディシンは癌の解決策を提供する最先端の学問分野として期待されている分野のひとつです。ナノメディシンは、カプセル化、分散、吸着、または結合された薬物やイメージング剤を含む、ナノメートルサイズの範囲のデリバリーシステムの一つであり、その送達戦略の発達は薬物の治療と応用を大きく促進しました。

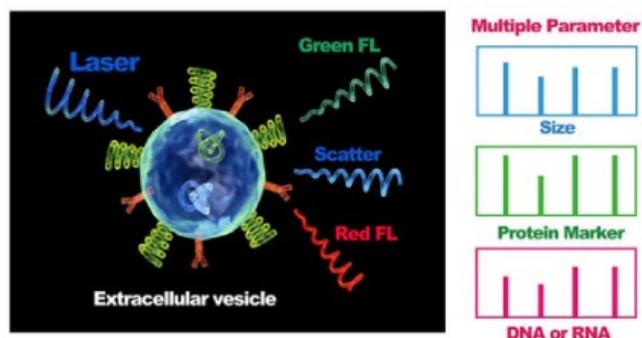
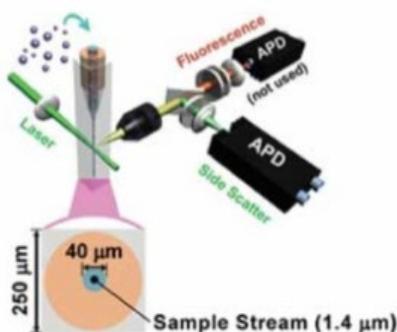
現在ナノメディシンは脂質ナノ粒子 (LNP)、高分子ナノ粒子、無機ナノ粒子、ウイルスナノ粒子に分類されています。その中でも、リポソーム、固体脂質ナノ粒子、脂質ミセル、細胞外ベシクルなどの脂質ベースのナノメディシンは高い生体適合性と実質的な薬物負荷能力という利点を示し、最も成功した薬物送達システムとして考えられています。

ナノ粒子を媒介とする遺伝子治療は過去20年間にかなりの注目を集め、siRNAをカプセル化したLNPは臨床的に広く検証されています。加えて核酸送達に関してはCOVID-19の流行で出現したmRNAワクチンに加えて、核酸医薬品も腫瘍、慢性疾患、希少疾患の領域でも有望視がされていますが、これらの正確な粒子数および担持粒子の割合を決定することは困難です。

ナノメディシンの効果は、キャリア材料の組成と特性、粒子径と分布、構造と形態、親和性/疎水性、粒子濃度、薬物負荷、薬物負荷比、表面リガンドの種類と密度など、その物理・化学的特性に影響されます。そのため様々な物理的・化学的特性を正確に把握することはナノメディシンの設計・開発・品質管理に貢献します。

これまでの研究において、クライオTEM画像で粒子を計測する手法では電子顕微鏡グリッド上のガラス化試料におけるLNPの分布が不均一であるため正確な粒子数を得ることが困難とされ、さらに空のLNPとsiRNAを担持したLNPのサイズ、形状、電子密度は同等であるため、クライオTEMはsiRNA担持率を決定することには適していないとされます。

NanoFCM フローナノアナライザーの優れた分解能や、高感度、高速検出、マルチパラメーター分析機能は、ナノメディシンの粒子径、薬剤含有量、薬剤封入効率、粒子濃度、表面リガンド密度を単一粒子レベルで決定できる、ナノメディシンの包括的な特性評価プラットフォームとしてご活用いただけます。



NanoFCMの解析イメージ図

NanoFCMではシース液の流れに集まったサンプル粒子にレーザー光を照射し、

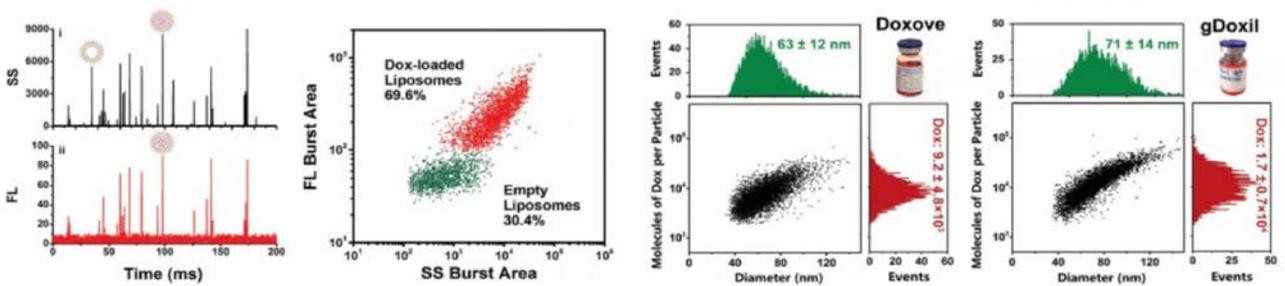
これにより生じる側方散乱光と蛍光を単一光子検出器 (SPCM) で検出し粒子の測定を行う。

SPCMは高感度のセンサーであり単一光子を検出することができるため、粒子のサイズと濃度を高精度に測定することができる。また、側方散乱光と2種類の蛍光を同時に解析することで個別粒子のフェノタイピングを行うことも可能である。

1. ドキソルビシン担持リポソームの特性評価

ドキシル(ドキソルビシン担持リポソーム)はFDAが承認した最初のナノメディシンです。ナノメディシンの測定には一般的にDLS(Dynamic Light Scattering 動的光散乱法)とクライオTEMが使用されています。DLSを使用することでサンプル全体の粒径を測定することができ、クライオTEMで取得画像の三次元再構成を行うことでドキシルの粒度分布の特性評価を行うことができます。しかし、これらの測定ではドキソルビシンを装填した個々の粒子における充填効率を評価することはできませんでした。

NanoFCMは個々のリポソーム粒子の散乱光および蛍光シグナルの迅速かつ同時検出を行うことができ、サイズ分布、粒子濃度およびドキソルビシン封入効率を含むドキシル粒子の包括的な特性評価測定を2~3分で行うことが可能です。加えて、サンプル間の蛍光強度比較により粒径と各粒子に装填されたドキシルの含有量との相関関係を明らかにすることができます。



ACS Appl. Mater. Interfaces 2017, 9, 13913-13919

2. siRNA送達のための脂質ナノ粒子(核酸送達)

siRNAを封入する脂質ナノ粒子(LNP)は、RNA干渉を可能にする手段として臨床的な研究が進められています。しかし、サンプル中の粒子における正確な粒径、濃度計測とフェノタイプングを行うことは困難とされていました。

これまではクライオTEMでの粒子計測が一般に行われていましたが、分布が不均一なサンプル画像解析による正確な粒子濃度計測を困難にします。さらに、空のLNPとsiRNA搭載LNPにおいて、サイズ、形状、電子密度は同等であるため、クライオTEMによってLNP中のsiRNA存在を推定することは困難です。

NanoFCMフローナノアナライザーは粒径、濃度、蛍光シグナル同時解析によってsiRNA搭載LNPの定量的マルチパラメータ特性評価に使用することができます。膜貫通型核酸色素SYTO 82による蛍光染色によりsiRNAローディングの画分を決定することができ、脂質ナノ粒子の濃度はSPCM(単一光子検出器)による高感度検出で迅速に求めることができます。これによって脂質ナノ粒子あたりのsiRNAの濃度決定やコピー数測定を行うことが可能です。

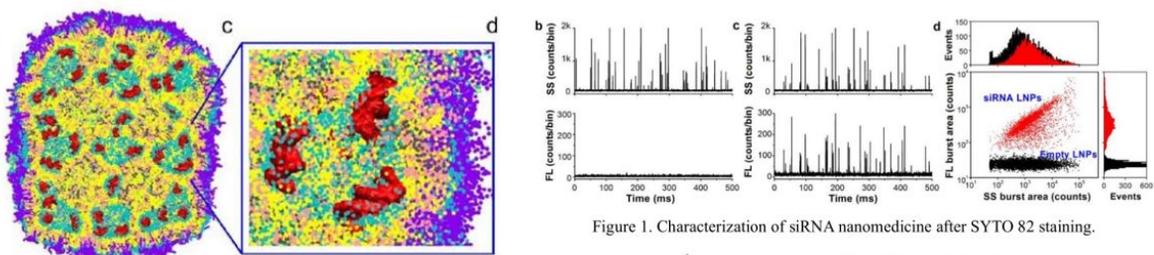
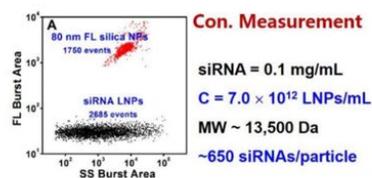


Figure 1. Characterization of siRNA nanomedicine after SYTO 82 staining.

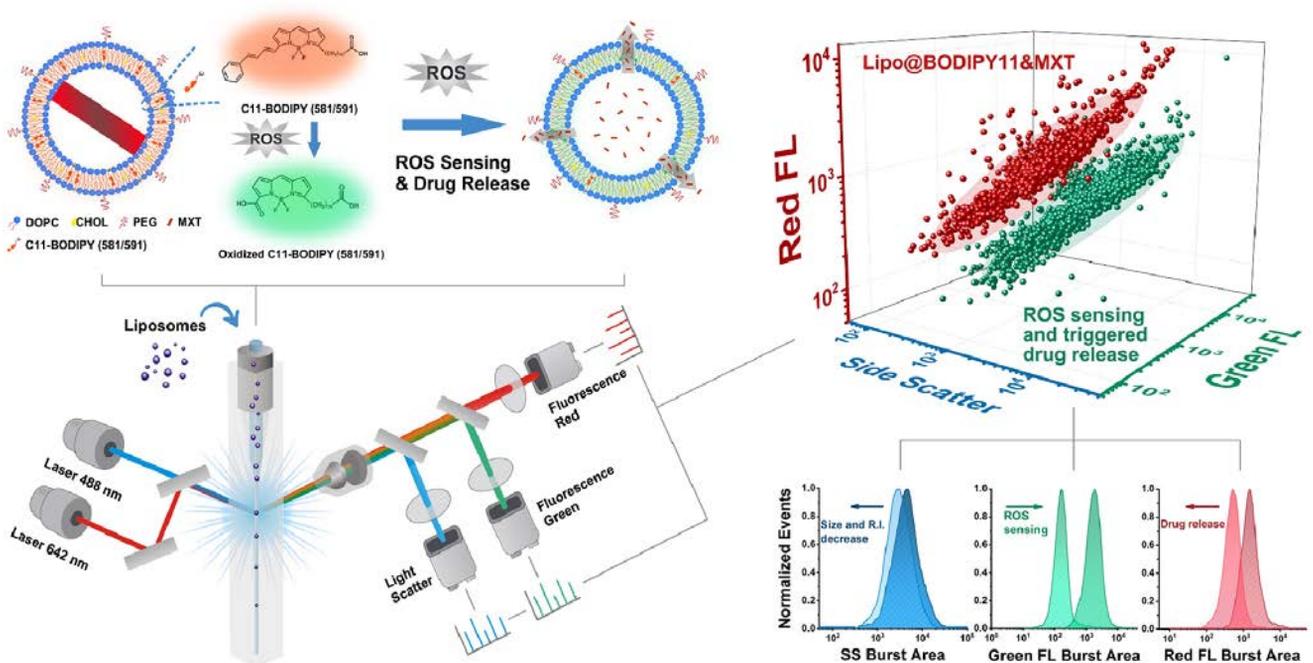


3. 刺激センシングによるセラノシスリポソーム

このデータではROS (Reactive oxygen species :脂質活性酸素種) 応答性リポソームとして、Lipo@BODIPY11を作製し、NanoFCMフローナノアナライザーによるセラノスティックナノ粒子特性評価をモデル化しました。

化学療法薬ミトキサントロンをC11-BODIPY官能化リポソームに封入し、ROS感知と薬物放出挙動の同時解析をNanoFCMによって行いました。

SSおよび赤色FLの強度の低下および緑色FLシグナルの増加は、上昇したH₂O₂濃度での持続性薬物放出プロセスを示しています。



用語解説

C11-BODIPY™(581/591) : 細胞や膜の活性酸素を検出するために使用される蛍光試薬です。色素の多価不飽和ブタジエニル部分が酸化されることで、蛍光発光ピークが約590 nmから約510 nmにシフトします。

セラノスティック : Therapeutics(治療) + Diagnostics(診断)をあわせた造語。診断と治療をあわせて行う考え方や、その手法のことを意味しています。

ミトキサントロン : 癌化学療法剤の一つで、急性白血病 (慢性骨髄性白血病の急性転化を含む)、悪性リンパ腫、乳癌、肝細胞癌への適応を持ちます。

関連文献 :

Chen C, Gao K, Lian H, Chen C, Yan X. Single-particle characterization of theranostic liposomes with stimulus sensing and controlled drug release properties. *Biosens Bioelectron.* 2019 Apr 15;131:185-192. doi: 10.1016/j.bios.2019.02.016. Epub 2019 Feb 19. PMID: 30836270.

4. 標的薬物送達のための細胞外小胞とのリポソーム融合

リポソームはDDSとして薬物を封入するために広く使用されており、これまでの研究によって高い封入比での薬物封入をおこなうことが可能となっています。また、細胞外小胞上のCD47はシグナル放出により免疫系による除去を回避することが証明されており、これらリポソームと細胞外小胞の組み合わせによって理想的な薬物送達プラットフォームを実現することができます。

ここでは、薬物を封入した感熱リポソームと遺伝子操作された細胞外小胞と融合させ、細胞外小胞-リポソームハイブリッドNP(gETLNP)を作成し、NanoFCMで解析をおこないました。このgETLNPは表面にCD47を表示しながら内部に熱感受性物質を担持し、両ベシクルと特性を有します。NanoFCMは、リポソームおよび細胞外小胞の単一粒子レベルでの分析を可能にし、融合効率も決定することができます。融合の成功を確認するためにリポソームをNBD-DSPE-PEG2000の挿入によりニトロベンゾオキサジアゾール(NBD)で標識し、細胞外小胞をCD9免疫磁気ビーズで標識しました。NBD蛍光に基づきリポソーム膜の存在をフローナノアナライザーで分析したところ、融合効率は95.7%と判定されました。また、遺伝子操作された細胞外小胞から生成したgETLNP(56.8%)のCD47の発現は、野生型細胞外小胞から生成したETL NP(5.3%)の発現よりも高い腫瘍細胞貪食の効率向上が認められました。

