研究成果報告書

1．研究課題名：吸入粉末ナノ粒子製剤を基盤とした肺感染症に対する非抗菌薬治療法の開発

2．研究代表者氏名：小川　昂輝（名古屋市立大学　大学院薬学研究科　薬物送達学分野　講師）

3．研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

Koki Ogawa, Ayumi Nishi, Naoki Umezawa, Tsunehiko Higuchi, Tetsuya Ozeki. Staphylococcus aureus-directed liposome for targeted chemotherapy against infection—evaluation of affinity and antibacterial activity. Journal of Nanoparticle Research, 27(9), 2025.

4．研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

【背景】

肺を含む下気道感染症による死亡は年間約 250 万人と推計され、適切な抗菌薬治療の重要性は依然として高い。原因菌のうち黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）は、細胞毒素による肺組織障害を引き起こすうえ、肺内でバイオフィルムを形成して慢性感染に移行しやすい。バイオフィルムは宿主免疫と抗菌薬の双方からの逃避を可能にするため、感染は難治化する。加えて薬剤耐性菌の拡大が将来的な脅威として危惧されており、抗菌薬に依存しない治療戦略の確立が急務となっている。我々は、抗菌タンパク質をコードする mRNA を肺の感染部位に送達し、宿主細胞に抗菌タンパク質を産生させる治療法を構想した。しかし、この構想を実現するためには、その前提として「キャリアを感染部位に選択的に届ける」技術が不可欠である。既存の吸入リポソーム製剤（アミカシン封入製剤など）は肺局所濃度の向上と徐放、バイオフィルム透過性に優れる一方、感染部位以外にも非特異的に分布し正常細胞に取り込まれる。非特異的分布は治療効率を下げるだけでなく、耐性菌の出現や気道刺激などの副作用の懸念につながる。すなわち、感染部位選択性の欠如が未解決のボトルネックである。細菌への標的化リガンドとしては、ファージディスプレイ法により同定された *S. aureus* 感染部位選択性ペプチド（CARG ペプチド）が報告されている。しかし、このペプチドをリポソーム表面に提示して標的化キャリアとして機能させた例はなかった。さらに、バイオフィルム内の細菌に到達するには「バイオフィルムを透過する性質」と「細菌に結合する性質」を同一粒子上で両立させる必要があり、この点の検証も行われていなかった。そこで本助成では、mRNA 治療への展開を見据えた基盤技術として、脂質ナノ粒子（リポソーム）に細菌標的性を付与する方法論の確立と、その有効性の実証を行った。

【方法】

N 末端にシステインを導入した環状 CARG ペプチド、C-cyclic(CARGGLKSC)を Fmoc 固相合成法により合成し、Tl(III)による環化と N 末端へのヘキサン酸・Cys 付加を経て得た。これを DSPE-PEG2000-Mal とチオール−マレイミド反応により結合させ、PEG 末端に CARG を提示したリガンド脂質 CARG-PEG-DSPE を合成した。分子量は MALDI-TOF MS により確認した。リポソームは薄膜水和法により調製した。DSPC とコレステロール（モル比 2:1）を基本組成とし、蛍光標識として DiI を加えた。CARG-PEG-DSPE または対照として mPEG-DSPE を脂質溶液中に 3 mol%で添加する syn-insertion 法によりリガンドを膜に組み込み、PBS（pH 7.4）で 65℃にて水和した後、超音波照射と 0.45 μm フィルターろ過により整粒した。粒子径・ゼータ電位は動的光散乱法、形態は透過型電子顕微鏡により評価した。細菌親和性は二つの培養形態で評価した。浮遊培養系では、*S. aureus* または対照菌として *Pseudomonas aeruginosa* の菌液とリポソームを 37℃で 1 時間インキュベートし、洗浄後に細菌画分へ結合した DiI を抽出・定量するとともに、蛍光顕微鏡で結合を観察した。バイオフィルム系では、ガラスベースディッシュ上で *S. aureus* を 5 日間培養してバイオフィルムを形成させ、リポソームを 1 時間作用させた後、DAPI 染色・固定を経て共焦点レーザー走査顕微鏡（CLSM）により三次元的な分布を観察した。

【結果・考察】

CARG-PEG-DSPE のピーク分子量は約 4100 であり、C-CARG（1107）と DSPE-PEG-Mal（約 3000）の和とよく一致したことから、目的のリガンド脂質が得られたと判断した。調製したリポソームはいずれも球形を呈し（図１）、ペプチド修飾による形態およびゼータ電位の変化は認められなかった。粒子径は CARG 修飾により約 144 nm となり PEG リポソーム（約 99 nm）より大きかったが、これは表面に提示されたペプチドが膜外へ伸展し粒子径を増大させたためと考えられる。

浮遊培養系において、CARG 修飾は *S. aureus* への結合を 1.6 倍に増加させた一方、*P. aeruginosa* への結合は増加しなかった（図２）。蛍光顕微鏡観察でも、CARG 修飾により蛍光リポソームの菌体への結合が増加する傾向が確認された。すなわち、CARG ペプチドはリポソーム表面に提示された状態でも菌種選択的な親和性を保持しており、標的化キャリアのリガンドとして利用可能であることが示された。また、*S. aureus* は通性細胞内寄生菌であり細胞内の菌には抗菌薬が届きにくいが、CLSM 観察により CARG リポソームが *S. aureus* 感染 RAW 細胞に取り込まれることを確認しており、細胞内寄生菌への作用の可能性も示唆された。

バイオフィルム形成系では、無修飾リポソームでは菌体部位に蛍光シグナルを検出できなかったのに対し、PEG 修飾によりバイオフィルム内への集積が向上し、CARG リポソームで最も高い結合が得られた（図３）。PEG 化はリポソームとバイオフィルム構成成分との非特異的相互作用を低減して透過性を高めることが報告されており、本結果はこれと整合する。すなわち CARG リポソームは、PEG の水和層によってバイオフィルムを透過し、到達した先で CARG–*S. aureus* 間の親和性を介して菌体に結合するという二段階の機構で機能していると解釈できる。リガンド提示に PEG をスペーサーとして用いる設計が、バイオフィルム形成菌の標的化に適していることを示す成果である。

リファンピシンの封入率はいずれのリポソームでも 74～76%であり、封入による粒子径およびゼータ電位の大きな変化はなかった。リファンピシン封入リポソームにおいても CARG 修飾により *S. aureus* への結合は有意に向上し、*P. aeruginosa* では向上しなかった。MIC は CARG 修飾により低下する傾向を示したが有意差には至らなかった。その要因として、本研究で用いた飽和脂質 DSPC は製剤の安定性に優れる一方、リポソームと菌体膜との膜融合を起こしにくいことが考えられる。リポソーム型抗菌薬の効力には膜融合が重要であり、相転移温度の低い脂質の導入により膜融合が促進され MIC が低下することが報告されている。したがって、結合の向上を薬効へ確実に変換するには、脂質組成の最適化による膜融合性の付与が必要であると考えられる。

以上より本助成期間においては、CARG ペプチドを PEG スペーサーを介してリポソーム表面に提示することで、脂質ナノキャリアに *S. aureus* 選択的な標的性とバイオフィルム透過性を同時に付与できることを明らかにし、その有効性を浮遊培養系とバイオフィルム形成系の双方で実証した。これは、当初構想した mRNA による抗菌タンパク質治療を実現するうえで前提となるキャリア設計の方法論を確立したものである。今後は、本成果で得られたリガンド提示設計を抗菌タンパク質コード mRNA 封入 LNP へ適用し、感染部位選択的な抗菌タンパク質発現と抗菌効果の検証を進める。あわせて、申請者が既に確立しているスプレーフリーズドライによる粉末吸入製剤化技術と統合し、肺感染症に対する実用的な投与形態としての展開を図る。

未筆に、本研究の遂行にあたり多大なご支援を賜りました杜の都医学振興財団に深く感謝申し上げます。

図１
リポソームのTEM画像

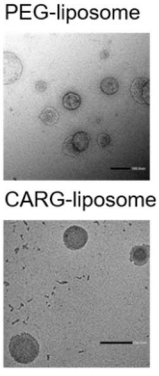


図2
各細菌に対するリポソームの結合性

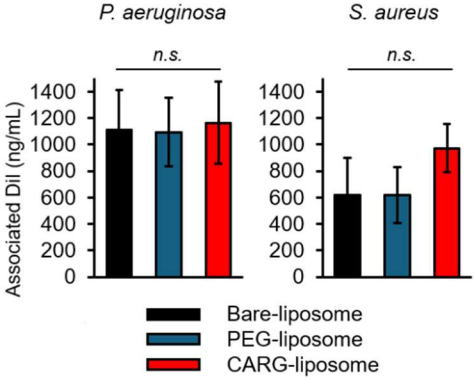
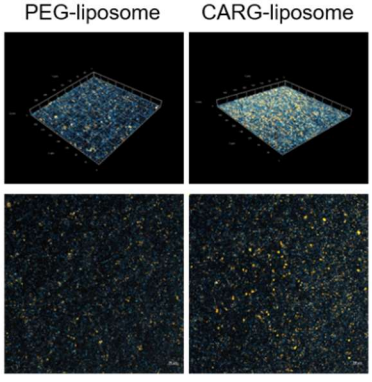


図3 *S. aureus*バイオフィルムに対する
リポソームの親和性



※以降コピーして頁数を記載のうえ使用ください