

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11329

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性に対する新規リポソーム点眼薬の開発

研究課題名(英文) Development of new eye drop treatment using liposomal delivery system for age-related macular degeneration.

研究代表者

本田 美樹 (Honda, Miki)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30348990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は標的化リポソームを応用したドラッグデリバリーシステムにより、脈絡膜新生血管(CNV)に対する新しい点眼治療薬の開発を目標とする。点眼・結膜下注射によって脈絡膜に到達可能なリポソームを選定し、Rho-キナーゼ阻害剤(ファスジル)を内封した。コントロール眼・ラットCNVモデルにファスジルリポソームを投与後、質量分析法を用いて、眼各組織のファスジルとその代謝物である水酸化ファスジルを測定した結果、後眼部で薬剤が定量された。さらに、CNVの蛍光染色、HE染色を行いCNVの抑制効果を検討した。

本研究の結果、ファスジルリポソームは加齢黄斑変性に対する新しい点眼治療薬となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、加齢黄斑変性に対する第一選択薬は、抗脈絡膜新生血管作用を示す抗体の硝子体内に注入であるが、その薬価が非常に高いことや複数回の治療を要することが、この治療を受けている患者への負担となっている。有効な治療効果を得るためには頻回投与が必要であるが、それに伴う合併症のみならず高額な医療費の負担に起因する治療の中断や、そのための再発などが大きな問題となる。投与経路の改善を目的とする薬物送達システム(DDS)を用いて薬物を脈絡膜に、より効率的に作用させることが実現すれば、加齢黄斑変性に対する新しい治療として点眼治療薬が開発されれば、副作用・侵襲性の低減、さらには医療経費の削減が直截的に可能になる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed the development of new drug delivery system using targeted liposomes

For the treatment of choroidal neovascularization. Different vascular targeted liposomes were administrated via eye drops or subconjunctival injection in the laser-induced CNV rat model, and the one that reached the choroid membrane was selected. Rho-kinase inhibitor, fasudil, was encapsulated in the selected liposomes using the limote loading methods (liposomal fasudil). After the suspension of liposomal fasudil was dropped into eyes of the model animal, the amount of fasudil and fasudil-OH in the ocular tissue was measured using mass spectrometry. We could confirm the signal of fasudil in the retina, choroid and sclera. Furthermore, eye drop administration of liposomal fasudil inhibited CNV creation in the model. These results suggested that liposome fasudil may be a potential therapeutic agent for the age-related macular degeneration.

研究分野：網膜硝子体

キーワード：加齢黄斑変性 薬物送達学 リポソーム Rho-キナーゼ阻害剤 ファスジル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

黄斑部は眼底の中央部にある直径約 5.5mm の領域で、ヒトはこの黄斑部でもものの形や色を認識している。加齢黄斑変性とは黄斑部に脈絡膜由来の新生血管を生じ、欧米における成人法的失明の主因である深刻な疾患であり、日本でも患者数が増加している。

眼球には薬物透過を制限する隔壁があるため、最も一般的な投与方法である点眼で薬物を脈絡膜に到達させることは困難とされている。近年、分子生物学・血管研究の進歩に伴いさまざまな新生血管阻害薬が開発され、抗新生血管薬の硝子体内投与を目的とした新薬の開発が行われた。

現在治療の第一選択されているのが血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) を標的分子とした治療であり、抗新生血管薬硝子体内注入である。これらの薬剤は、ヒトにおいて抗脈絡膜新生血管作用を示すが、その薬価が非常に高いことがこの治療法普及に対する障壁となっている。有効な治療効果を得るためには頻回投与が必要であるが、それに伴う合併症のみならず高額な医療費の負担に起因する治療の中断や、そのための再発などが大きな問題となる。近年は iPS 細胞を用いて分化誘導された色素上皮移植が注目されているが、安全性の確保以外にも外科的手術による高侵襲性や上皮への分化にも長い時間を要することが問題である。さらに現時点で、その費用が数千万円を要し一般的な治療法として定着するにはまだ多くの未解決な課題を包含している。従って、現状の薬剤投与方法や iPS 細胞を用いた治療法の問題を現実的に解決するためには、低コストの薬剤や、投与経路の改善を目的とする薬物送達システム (DDS) の探索が極めて重要な意義を持つと考えられる。薬物を脈絡膜に、より効率的に作用させることが実現すれば、副作用・侵襲性の低減、さらには医療経費の削減が直截的に可能になる。

申請者らはこれまで基礎実験として、SU5416 (VEGF 受容体チロシンキナーゼ阻害剤) を新生血管標的化ペプチド (Ala-Pro-Arg-Pro-Gly : APRPG) 修飾リポソームに内封し、脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization : CNV) 実験モデルにおいて、リポソームの CNV 標的化が可能かどうか、さらに CNV に対する治療効果を検討した。実験モデルの硝子体内に注入後、その治療効果を検討した。その結果、硝子体内注入 4 日後に、APRPG 修飾 SU5416 内封リポソーム (APRPG-Lip-SU5416) は、APRPG 修飾を行わなかったリポソームと比べ、著明に CNV に集積していることが確認された。さらに APRPG-Lip-SU5416 を硝子体内に注入し、注入後 1 週間と 2 週間後に蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて CNV の面積を測定した。その結果、硝子体内注入 1 週間後ではリポソーム内封 SU5416 (APRPG-Lip-SU5416) はコントロール群と比べ治療効果に有意差は認められなかったが、2 週間後に治療群では CNV の形成が有意に抑制された (Honda et al, Arch Ophthalmol. 129(3):317-21, 2011)。これらの結果から、薬剤内封 APRPG 修飾リポソームは CNV に対して標的化と徐放効果があることが示され、加齢黄斑変性に対する有用な治療薬となる可能性が示唆された。

リポソームは 1) 水溶性薬剤、脂溶性薬剤いずれも封入することが可能で、2) 毒性がほとんどなく、3) 抗原性が低いこと、4) 生体内で代謝されうること、5) 膜透過性などをある程度制御できる、という特徴がある。これらの結果は、抗新生血管薬のリポソーム化製剤が眼内 DDS に有用である可能性を強く示唆するものと考えられる。

2. 研究の目的

これまで申請者らは、抗新生血管薬をリポソーム化することによって、薬剤の投与回数を減少させることに成功した。血管標的化ペプチド (APRPG; Ala-Pro-Arg-Pro-Gly) 修飾リポソームに内封した血管新生阻害剤を、ラット CNV 実験モデルの硝子体内に注入し、その治療効果を解析した。その結果、治療群では CNV の形成が劇的に抑制された (Honda et al, Arch Ophthalmol, 2011)。この実験から抗新生血管薬のリポソーム製剤が眼内 DDS として有用であることが実証された。さらに申請者らは、種々のリポソームを調製し、点眼後に CNV に標的化できるかどうかを検討した。この研究では標的化候補リポソーム (DPPC/cholesterol/DPPG/APRPG-PEG-DSPE/Dil) が CNV 周囲に限局集積していることを見出した。ラットを用いてこのリポソームに、新生血管抑制効果が報告されている Rho-キナーゼ阻害剤 (Fasudil) を内封後点眼し、高速液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC-MS) 法を用いて薬物動態を解析した結果、脈絡膜に Fasudil が到達していることを明らかにした。(第 119 回日本眼科学会発表)。

加齢黄斑変性に対する新規点眼 DDS 製剤の開発により、患者への侵襲は著しく軽減かつ大幅な医療費の削減が可能となる。さらに現在の治療法に比べ、病早期に直ちに開始可能であり、長期間の治療継続が期待される。その結果、加齢黄斑変性患者の社会的失明予防に多大な貢献できる。本研究では新生血管標的化リポソームをキャリアとして、新規 DDS 製剤の開発のための基礎データを集積する。すなわち治療効果を実証し、さらに薬物動態の解明、安全性を明らかにする。最終ゴールとしては、これらの解析結果を基に臨床応用可能な製剤を開発することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) リポソームの調整

リポソームは電荷修飾を行っていないもの、正電荷修飾あるいは負電荷修飾を行った以下の 3 種を調整した。

1) DPPC/cholesterol/APRPG-PEG-DSPE/Dil=20/10/2/1

2) DPPC/cholesterol/SA/APRPG-PEG-DSPE/Dil=20/10/2/2/1

3) DPPC/cholesterol/DPPG/APRPG-PEG-DSPE/Dil=20/10/2/2/1

DPPC：ジパルミトイルホスファチジルコリン

DPPG：ジパルミトイルホスファチジルグリセロール

DSPE：ジステロイルホスファチジルエタノールアミン

SA：Stearylamine

PEG：ポリエチレングリコール

Ala-Pro-Arg-Pro-Gly(APRPG)：新生血管標的化短鎖ペプチド

1.上記脂質をナスフラスコに添加 2.Tert-butanol を適量加え、減圧下クロロホルムを除去 3.凍結乾燥(overnight)4.20 mM HEPES 5 mLを加え、ハイドレーション(60度) 5.凍結融解(×3) 6.エクストレーション(100 nm×5) 7.粒子径とゼータ電位を測定。正電荷修飾にはSAを負電荷修飾にはDPPGを用いた。脂質層内に蛍光色素(DiIC18)を内封した。

(2) リポソームへの薬剤封入

選定したリポソームに抗新生血管作用を有すると報告されているRho-キナーゼ阻害剤(Fasudil)の内封を行った：APRPG修飾Fasudil内封リポソームの調製した。

まず、クロロホルムに溶解したDPPC、cholesterol、DPPG、およびDSPE-PEG2000-APRPG溶液を調製した。組成比DPPC/cholesterol/DPPG/APRPG-PEG2000-DSPE = 10/5/1/1(モル比)となるように各脂質溶液をナスフラスコに分取後、エバポレーターで減圧下クロロホルムを留去し、脂質薄膜を形成させた。デシケーター内で1時間以上真空乾燥した後、250 mM硫酸アンモニウム水溶液(pH=3.0)を用いてDPPC濃度が30 mMとなるように水和した。液体窒素を用いて凍結融解を3回行い、65、10分間バス型ソニケーターで超音波処理した。その後、エクストルーターを用いて孔径100 nmのポリカーボネートメンブレンフィルターを5回通過させ、リポソームの粒子径を調整した。リポソームの粒子径と電位を用いて測定した。その後、溶媒を置換するため、遠心チューブにリポソーム溶液を移し、453,000 × gで30分間超遠心した。上清を除去した後、超純水にて再懸濁し、さらに15分間の超遠心を2回繰り返した。計3回の超遠心後に上清を除去し、PBS(-)(pH=7.4)で再懸濁した。そして、PBSに溶解したFasudil溶液を750 g/mLとなるように加え、65、30分間振とうインキュベーター(600 rpm)することで、Fasudilをリポソームの内水相に封入した。インキュベーター後、内封されなかった遊離のFasudilを除去し、粒子径および電位を測定した。なお、リポソームへのFasudil内封量は吸光度(λ=320 nm)から算出した。

(3) 動物モデル

CNVモデル脈絡膜フラットマウント

実験的CNVモデルを作成するため、ラットの網膜にレーザー照射(照射条件：100 μm、90 μW、照射時間 0.1秒)を行った。CNVモデルラットにリポソームを硝子体内注入・結膜下注射・点眼を行った後、蛍光デキストラン(分子量10×26)を用いて灌流染色を行った後、脈絡膜フラットマウントを作成し、二重染色及びCNVの面積測定を行うことにより、薬物到達と治療効果を判定した。

薬剤到量定量のための眼組織作成

実験的CNVモデル作成眼・コントロール眼の眼球を摘出し、角膜・虹彩毛様体・水晶体・網膜・脈絡膜・強膜を顕微鏡下で分離した。

動物実験については実験に先立ち動物実験計画書を順天堂大学医学部実験動物委員会に提出、申請が承認された上で実行した(2007年7月11日承認済み)。実際の実験にあたって、「動物愛護および管理に関する法律」、「動物実験の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」及び「順天堂大学動物実験ガイドライン」を遵守した。

(4) 生体組織におけるファスジル・水酸化ファスジルの抽出・定量

摘出眼を角膜・虹彩毛様体・水晶体・網膜・脈絡膜・強膜に分離後、各組織に組織に+ 100 mM NH₄HCO₃, 500 mLを加え、内部標準物質として、1-[(5-イソキノリニル)スルホニル]ピペラジンを添加しジルコニアビーズで破砕(Mag NA Lazer)し、懸濁液400mLに2Mアンモニア水400mLを加え超音波処理(30 sec×5)を行った後、凍結誘拐処理(-30℃, 1h)、上清750mLを採取した。得られた上清を珪藻土(Isolute SLE+)で液液抽出、酢酸エチルで溶出後に窒素固定を行い、

1000 mLの80% methanol, 0.1% formic acidに再溶解、0.1% formic acid, 10% methanol溶液となるように希釈し、MS測定試料とした。得られたMS測定試料に、内部標準物質としてRanitidineを添加してMRM法により測定を行った

(5) ファスジル抽出操作における水酸化体への変換

未点眼の眼組織にliposome-Fasudilおよび内部標準物質を添加し、薬剤を抽出し、試料をLC-MRM-MS測定し、抽出操作中にFasudilから水酸化体が生じる可能性を検証した。Fasudilとhydroxy fasudil量は検量線から定量した。本グラフは定量値についてFasudil検出量を100%として示したものの。なお、測定は2回行い、平均値をとった。抽出処理無：各薬剤を80%メタノール, 0.1%ギ酸に添加した後に8倍希釈して測定した。

病理標本切片の作成

CNV モデル眼にファスジル・ファスジルリポソームを作成後に眼球を摘出し、脈絡膜フラットマウントを作成した。CNV が作成された部位で、組織を 5 μ m の組織切片を作成し、HE 染色を行い、ブルッフ膜上から網膜側の CVN の大きさを測定し、薬剤の治療効果を検討した。

4. 研究成果

(1) ラット実験的 CNV に対するファスジルリポソーム CNV 抑制効果の検討

ラット眼に以下のファスジル内封新生血管標的化リポソームを点眼 (1 日 4 回) 行った後の CNV 抑制効果を示す。リポソーム組成: DPPC/Cholesterol/DPPG/APRPG-PEG2000-DSPE=10/5/1/1 (コントロール群は PBS・Empty リポソーム)。ファスジルリポソーム点眼後の CNV 面積はコントロール眼 (PBS:100% Empty リポソーム 99.6%) に対し、ファスジルリポソーム点眼群は 71.5% (Tukey's Multiple Comparison Test * $P<0.05$, ** $P<0.01$ Mean \pm S.E.M.) であった。

(2) ファスジルリポソーム点眼後の眼各組織におけるファスジルの定量

コントロール (PBS)・ファスジル溶液・ファスジルリポソーム (リポソーム組成: DPPC/Cholesterol/DPPG/APRPG-PEG2000-DSPE=10/5/1/1) をラットの右眼 1 日 4 回・3 日間及び 14 日間点眼した後に眼球を摘出し、眼各組織の角膜・虹彩毛様体・水晶体・網膜・脈絡膜・強膜に分離し、三連四重極型質量分析装置を用いて組織ごとのファスジル及びファスジルの代謝産物である水酸化ファスジルの薬剤到達量を定量・数値化することに成功した。虹彩毛様体では後部組織の 10 倍以上検出され、後眼部では強膜 > 脈絡膜 > 網膜 でされた。前眼部である虹彩にはファスジルが、後眼部である強膜・脈絡膜・網膜には水酸化ファスジルが多く検出された。同個体の左眼 (非点眼) ではファスジルは脈絡膜 > 虹彩・毛様体 > 強膜 で検出され、角膜・水晶体では検出されなかった。点眼眼とはファスジルの分布傾向が異なり、すべての組織で水酸化ファスジルが多く虹彩と脈絡膜の検出量に大きな差を認めなかった。

これまで薬剤点眼後にどのような経路で後眼部に薬剤が到達するかは不明であったが、点眼後には前眼部である虹彩毛様体での検出量が多く、非点眼眼では後眼部組織に多く認められたことにより、ファスジルは点眼後に経強膜経路で脈絡膜に移行し組織内で水酸化され、非点眼眼では血行性に各組織に移行していることが示された。

(3) ファスジル抽出操作における眼各組織の水酸化ファスジルの分布

MS 試料抽出過程においてファスジルが水酸化されている可能性を検証した。ファスジルの検出量を 100%とした場合、すべての組織で FA-OH の検出量は未満であり、ファスジルの水酸化は個体内で行われていたことが示された。

(4) ファスジルリポソーム点眼後の網膜・脈絡膜の二重染色

赤色蛍光色素を封入したファスジルリポソームをコントロール眼と CNV 作成モデル眼に点眼後の網膜・脈絡膜の二重染色の結果を示す (図 1)。

コントロール群・点眼群ともに網膜へのリポソーム集積は認められなかった。脈絡膜ではコントロール眼で正常脈絡膜血管に少量のリポソームが、CNV 作成眼では CNV 周囲にリポソームの集積を認めた。

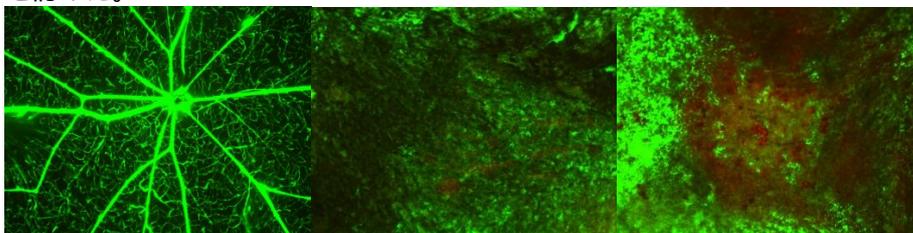


図 1 網膜 コントロール脈絡膜 CNV

(5) CNV モデル点眼後の病理染色

CNV モデル眼にファスジル・ファスジルリポソームを点眼後に HE 染色切片を作成し、CNV の大きさ比較検討を行った。今後個体数を増やし、病理学的な有用性の検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 猪俣武範 本田美樹	4. 巻 30
2. 論文標題 硝子体内注射の日米ガイドラインの比較	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 眼科手術	6. 最初と最後の頁 5-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inomata T, Honda M, Murakami A	4. 巻 5
2. 論文標題 Atypical VZV Retinitis in a Patient with Good Syndrome.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Ocul Immunol Inflamm	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09273948.2016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本田美樹
2. 発表標題 ファスジル内封リポソーム点眼後の後眼部への薬剤到達経路
3. 学会等名 第122回日本眼科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本田美樹
2. 発表標題 ファスジル内封リポソーム点眼後の後眼部への薬剤到達経路
3. 学会等名 第33回日本DDS学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 本田美樹
2. 発表標題 当院での抗VEGF抗体以外の黄斑疾患治療
3. 学会等名 新潟集談会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 本田美樹
2. 発表標題 加齢黄斑変性に対する新規DDS製剤の開発と課題
3. 学会等名 第32回日本DDS学会（招待講演）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	奥 直人 (Oku Naoto) (10167322)	静岡県立大学・薬学部・特任教授 (23803)	