

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16916

研究課題名（和文）抗VEGF薬眼内徐放を目的とした低濃度インジェクタブルハイドロゲルの開発

研究課題名（英文）Development of low-concentration injectable hydrogel for sustained release of anti-VEGF drugs in the eye

研究代表者

星 崇仁（Hoshi, Sujin）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10757892

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：1.5%、5%、10%の低濃度ハイドロゲルに抗VEGF薬を分散させ徐放性能を2つの方法で評価した。いずれの評価方法でも、1.5%ゲルと比較して5%と10%ゲルで徐放がより緩徐であり、徐放効果が認められた。一方、実験によっては全ての薬剤が放出されず、ゲル内に残存する現象が見られた。抗VEGF薬（Bevacizumab）とハイドロゲルの結合性を検討したところ、ゲルのマレイミド基に結合する可能性が示唆され、薬剤のゲル内残存の原因となりうると推測された。実験結果の再現性を確認した上で非臨床試験へ移行する必要があるため、今後も検討を重ねていくこととした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢性黄斑変性は、成人の中途失明原因の主要疾患で、抗VEGF薬の眼内注射が行われている。しかしその薬効持続期間は約1ヶ月であり反復投与が必要であるため、侵襲性・経済的負担が問題となっている。抗VEGF薬眼内徐放システムとして、ハイドロゲルに薬剤を分散させ眼内で徐放させる方法が広く研究されているが、臨床応用に至っていない。本研究では眼内に注入可能な低濃度ハイドロゲルを用いることで、抗VEGF薬の徐放が可能であることが示唆された。今後、徐放効果の再現性を確認し、適切な徐放性能を達成できれば、眼内薬剤徐放プラットフォーム有望の候補となりうる。

研究成果の概要（英文）：The sustained release of anti-VEGF drugs dispersed in 1.5%, 5%, and 10% low-concentration hydrogels was evaluated in two ways. In both evaluation methods, the sustained release was more gradual with 5% and 10% gels compared to 1.5% gels, indicating a sustained release effect. On the other hand, in some experiments, not all drugs were released and remained in the gel. The binding of the anti-VEGF drug (bevacizumab) to the hydrogel was investigated, and the possibility of binding to the maleimide group of the gel was suggested, which could be the cause of the drug remaining in the gel. We decided to continue the study to confirm the reproducibility of the experimental results before moving on to nonclinical studies.

研究分野：眼科学

キーワード：加齢黄斑変性 硝子体注射 抗VEGF薬 ドラッグデリバリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 加齢性黄斑変性、糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症に伴う黄斑浮腫は、成人の中途失明原因の主要疾患である。その病態には血管内皮増殖因子(VEGF)が深く関与しており、近年では主要な治療の一つとして抗 VEGF 薬の眼内注射が行われている。しかしその薬効持続期間は約 1 ヶ月であり反復投与が必要であるため、侵襲性・経済的負担が問題となっている。

(2) 抗 VEGF 薬眼内徐放システムとして、眼内注入後にゲル化するハイドロゲルに薬剤を分散させ眼内で徐放させる方法が広く研究されており、現在行われている眼内注射と同様の手技で行うことができる点で実現性が高く、有望視されている。これまで多糖ゲル、温度応答性ゲル、ヒアルロン酸ゲルなどを用いて研究が行われているが、透明性の不足や易分解性などの課題があり臨床応用に至っていない。安全性、透明性、分解制御、適切な薬剤徐放性といった、臨床応用に必要な要件を満たす眼内インジェクタブルハイドロゲルの開発が望まれている。

2. 研究の目的

(1) 我々は 2014 年に非膨潤性ハイドロゲル (Kamata H, et al. Science. 2014) の硝子体代用物質としての応用を模索する共同研究を通じて、網膜毒性のない、炎症をほとんど惹起しない新たな低濃度インジェクタブルハイドロゲル (Hayashi K, et al. Nature Biomed Eng. 2017) を開発した。このハイドロゲルは、ゲル化反応を二段階に分けることで、低濃度かつ眼内注入後、数分でゲル化する。すなわち第一段階では、ゲル化の直前まで反応を進めた臨界クラスター溶液 2 種類を眼外で作成し、眼内注入後に第二段階の反応として 2 種類の臨界クラスター溶液が混合してハイドロゲルが合成される。第二段階の反応は数分で終了するため、インジェクタブルゲルに適したハイドロゲルとなる。

(2) 本研究では、上述の低濃度インジェクタブルハイドロゲル (Tetra-PEG ゲル) に、抗 VEGF 薬 (Bevacizumab) を分散させて薬物の拡散を制御する、モノリシック型のドラッグデリバリーシステムを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 低濃度ハイドロゲルの抗 VEGF 薬徐放性能評価 (ELISA 法)

Bevacizumab (25mg/mL) 20 μ L を Tetra-PEG ゲル内に封入し、Tetra-PEG 濃度が 1.5%、5%、10% の Bevacizumab 封入ゲル (100 μ L) を作成した。ゲルを静置したチューブ内に 3 mL の 0.5% bovine serum albumin (BSA) /PBS を添加し、37 $^{\circ}$ C 設定でインキュベートした。インキュベーション開始後、30、90、270 分、1、2、3、4、5、7、9、11、14 日に溶液を回収し、その度にチューブに 3 mL の 0.5% BSA/PBS を添加した。ELISA 法を用いて、回収した溶液の Bevacizumab の濃度測定を実施した。

(2) 低濃度ハイドロゲルと Bevacizumab の結合性の検討

前述の検討で、ハイドロゲルに封入した Bevacizumab が全量放出されず、ゲル内に残存している可能性が示唆されたため、低濃度ハイドロゲルと Bevacizumab との結合性について高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) および電気泳動法 (SDS-PAGE) での検討を行なった。Tetra-PEG ゲルの材料である、PEG-MA と PEG-SH をそれぞれ Bevacizumab と混合し、インキュベーション開始 1, 24 時間後に溶液を回収し、測定、保持時間およびピーク面積を算出した。

(3) 低濃度ハイドロゲルの抗 VEGF 薬徐放性能評価 (HPLC 法)

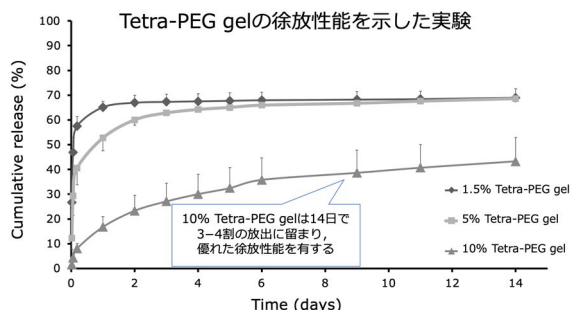
Bevacizumab を封入した 5% Tetra-PEG ゲル (100 μ L) を作成し、37 $^{\circ}$ C 設定のインキュベータ内でインキュベーションを行った。インキュベーション開始から 24 時間後及び 7 日後に上清 (溶液) を回収し、溶液中の bevacizumab 濃度を HPLC で測定することにより、溶出された bevacizumab 量を算出した。

4. 研究成果

(1) 低濃度ハイドロゲルの抗 VEGF 薬徐放性能評価 (ELISA 法)

1.5%、5%、10% ゲルの Bevacizumab 溶出率はそれぞれ、実験開始後 1 日で 85.0%、43.9%、48.1%、2 日で 94.4%、61.6%、61.0%、4 日目で 95.6%、73.5%、67.5% であり、1.5% ゲルと比較して 5% と 10% ゲルで徐放がより緩徐であった。実験開始後 14 日の溶出率はそれぞれ、95.7%、78.1%、72.0% であり、5% と 10% ゲル内に多くの Bevacizumab が残存していた。このことより、5% と 10% の Tetra-PEG ゲルは、1.5% に比べ良好な Bevacizumab の徐放効果があることが判明した。

Tetra-PEG ゲルは、1.5%に比べ良好な Bevacizumab の徐放効果があることが示された一方、5%と10%のゲル内に多くの Bevacizumab が残存していると考えられた。



(2) HPLC (220, 280 nm) での検討では、PEG-MA 溶液と Bevacizumab の混合溶液の24 時間後回収サンプルで、1 時間後回収及び他の検体と比較してピーク面積が大きく減少した。SDS-PAGE の結果はHPLC の結果と一致していた。以上より、Bevacizumab がPEG-MA と結合しやすいと考えられた。PEG-MA にはマレイミド基が含まれていることから、それとの結合の可能性が示唆された。一方で、ゲル作製時に一緒に入れた場合、ゲル化のスピードによっては、Bevacizumab とPEG-MA の結合の発生は少ない可能性もあると推察された。

(3) 24 時間後回収では、添加量のうち90.0%が、7 日後までには102.6%が徐放されていた。また、徐放された Bevacizumab モノマー体のピーク保持時間に明確なシフトは確認されなかった。以上より、ゲルに封入した bevacizumab は7 日間のインキュベーション後にほぼ100%が徐放されていると考えられた。ELISA法を用いた試験では同一の条件で最大で70~80%程度の溶出であり、HPLCでの検討結果とは相違が認められ、ゲルの固まる速さの違い、溶液回収時のゲルの状態(本試験ではチューブ中でゲルが浮遊していた)の違い、といった実験条件の違いが影響していると推察された。

(4) モノリシック型の抗体医薬徐放プラットフォームを開発する際、ゲルの調整方法、医薬品の封入方法のわずかな違いや検出方法の違いによって、in vitroでの徐放性能の結果が異なることが判明した。実験結果の再現性を確認した上で非臨床試験へ移行する必要があり、今後も検討を重ねていくこととした。

< 引用文献 >

Hiroyuki Kamata, Yuki Akagi, Yuko Kayasuga-Kariya, Ung-il Chung, Takamasa Sakai, "Nonswellable" hydrogel without mechanical hysteresis, *Science*, 343, 2014, 873-5
Kaori Hayashi, Fumiki Okamoto, Sujin Hoshi, Takuya Katashima, Denise C. Zujur, Xiang Li, Mitsuhiro Shibayama, Elliot P. Gilbert, Ung-il Chung, Shinsuke Ohba, Tetsuro Oshika Takamasa Sakai, Fast-forming hydrogel with ultralow polymeric content as an artificial vitreous body, *Nature Biomedical Engineering*, 1, 2017, 0044

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上智哉, 岡本史樹, 星崇仁, 酒井崇匡, 片島拓弥, 内藤瑞, 大鹿哲郎
2. 発表標題 Bevacizumab封入Tetra-PEGゲルの徐放性の検討
3. 学会等名 第125回 日本眼科学会総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------