

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12652

研究課題名(和文) 後眼部指向型ナノ粒子点眼剤の設計に向けた粒子構造及び眼内移行性解析と至適処方構築

研究課題名(英文) Construction of optimum composition of the posterior segment-directed nanoparticle eyedrop via particle characterization and intraocular migration

研究代表者

高島 由季 (Takashima, Yuuki)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70236214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：網膜疾患に対する低侵襲的治療及び予防を可能とするナノ粒子点眼剤の設計に向け、粒子構造特性(表面電位、組成等)の評価ならびにラット点眼後の眼内移行性等の検討に基づく調製プロセス及び製剤処方の最適化を目的とした。網膜に高発現するCD44受容体を指向するヒアルロン酸を修飾した核酸(siRNA)搭載ナノ粒子(リボソーム、高分子ナノミセル)として適切な調製プロセスを確立した。また、多機能性ペプチドを修飾したナノ粒子において、粒子表面とペプチド鎖の双方にsiRNAが搭載される構造と予測される粒子組成とすることで、点眼後の網膜移行性向上及びsiRNAによる有意な標的タンパク質阻害効果を発揮することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、完治に至る薬物療法がない網膜疾患に対し、薬物送達の妨げとなる血液網膜関門等の高度なバリア機能を回避し、網膜まで到達し得るナノ粒子担体を再現性良く提供する核酸搭載ナノ粒子点眼剤の調製プロセスと処方、粒子構造・物性評価、眼内組織移行性と粒子素材との関連性に基づき設定した。本研究での知見は、従来の硝子体内注射による薬物療法に比べ、患者による自己管理・自己投与が可能でQOL及びアドヒアランスを向上する低侵襲的薬物点眼剤創出のための基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim was to optimize the preparation process and formulation of nanoparticle eye drops that enable noninvasive treatment and prevention of retinal diseases based on evaluation of particle structural characteristics (surface potential, particle structure, composition, etc.) and intraocular migration after instillation in rats. Nucleic acid (siRNA)-loaded nanoparticles modified with hyaluronic acid (HA), which targets CD44 receptors highly expressed in the retina, or with multifunctional peptide were prepared. An appropriate preparation process of HA-modified nanoparticles exhibiting efficient intracellular and intraocular behavior as eye drops was established. By designing a particle composition which is predicted to retain siRNA on both the particle surface and peptide moiety, the nanoparticles showed that the efficient intraocular migration to the retina after instillation to rat and significant silencing effect.

研究分野：製剤設計学、薬物送達学

キーワード：siRNA delivery 網膜 ナノ粒子 リボソーム 点眼

1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化社会を背景に、加齢黄斑変性症(AMD)や糖尿病網膜症などの網膜疾患の罹患率は増加傾向にあり、中途失明の原因上位となっている。AMDは、加齢に伴う網膜機能の低下により後眼部の老廃物等の処理能力が衰え、主として脈絡膜新生血管の発生・伸展によって網膜機能が破綻することで、中途失明や視力低下を引き起こす。癌疾患等のように生命の危機に直接的に関わる疾患ではないものの、不自由な生活を余儀なくされる大きな障害となる。目の最内層に位置する網膜は、明暗を感じ、物の形や色等の様々な情報を認識するための重要な組織であるため、脈絡膜血管からの物質移行を厳しく制限する高度なバリア機能で保護されている。このバリア機能は、血管内皮の密着結合による血液網膜関門、血液房水関門、角膜バリアから成り、網膜や硝子体内への親水性かつ分子量約 500 以上の薬物の移行を制限する。このため、点眼や経口投与等による全身血流を介した網膜への薬物送達は困難であり、網膜疾患に対しては、発症原因である新生血管を抑制する核酸薬(アンチセンス)や抗体医薬をクスリとして、眼球(硝子体内)に直接注射する極めて侵襲的な薬物療法が有効とされる。硝子体内への直接注射による頻回投与は、網膜剥離や感染症などのリスクを高めるとともに、患者への精神的・身体的負担を伴うことから、安全かつ低侵襲的投与が可能な点眼剤を最終投与形態にすることが望ましい。しかし点眼投与の場合、薬物は涙液とともに速やかに鼻腔へ排出されるため、前眼部から後眼部への眼内を介した薬物送達率は極めて低い。結膜は、比較的高分子量の物質を透過し易いことが知られるものの、網膜を覆う脈絡膜層の豊富な血管からの網膜内部への薬物移行は血液網膜関門である網膜色素上皮(RPE)によって制限される。これまでの検討で、RPEにトランスフェリン(Trf)受容体が高度に発現していること、脈絡膜の毛細血管板に有窓構造(孔径 85 nm 以下)が存在することから、有窓構造を通過し得る粒子径に制御した Trf 修飾リポソームが、点眼投与によって後眼部への滞留性を向上可能であることを明らかにした(科研費基盤(C)22500429_H22-24年度)。さらに、網膜への指向性を高めるため、RPEに特異的に結合するモノクローナル抗体を探索・作製し、これを粒子表面に修飾することで選択的に網膜内部にまで移行することを見出した(科研費基盤(C)16K01397_H28-30年度)。いずれも、pH感受性脂質からなるナノ粒子担体で、一般に困難とされる親水性かつ高分子量の核酸を搭載可能であり、網膜疾患の原因となる新生血管因子等の抑制による発症予防・治療効果が期待される。点眼剤は、一度に適用できる点眼量が数十 μL と微量であるため、薬物搭載量やナノ粒子の分散安定性確保等についても課題が残る。点眼後の後眼部への粒子の移行経路やリガンド付与による指向性向上機構等は明らかではなく、安定な薬物及び核酸送達のための至適な製剤化条件の確立が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、新生血管形成因子(VEGF)に起因する網膜疾患の治療・予防効果を発揮し得る網膜標的核酸搭載ナノ粒子を再現性良く設計するため、粒子物性評価や *in silico* 解析、分子動力学的計算、粒子構造の予測等による至適調製プロセスの確立、顕微鏡観察等による粒子素材の役割予測や物性解析、点眼後の眼内移行性との関連性検討等に基づく製剤処方最適化を目的とした。

3. 研究の方法

令和2年度は、網膜標的化 siRNA 搭載リポソームの調製を行った。これまでに、網膜が破綻していない健常ラットに対する点眼では、粒子径制御に依らず、体内動態の安定化に寄与するポリエチレングリコール(PEG)の付加により後眼部への集積性が低下することを確認している。このことから網膜標的化因子としてヒアルロン酸(HA)を用いた。HAは眼球内部の構成成分で生体適合性が高く、網膜細胞に HA 受容体(CD44R)が高度に発現していることから網膜指向性リガンドとなり得る。HAは DSPE 脂質を化学的に修飾した DSPE-HA を用いた(ヘルシンキ大学 Tatu Lajunen, Ph.D.より合成提供)。また、粒子に核酸を搭載するためこれまでに核酸保持及び細胞内導入に有用であることを報告している塩基性の多機能性ペプチド(アミノ酸配列: CH2R4H2C)を用いた。【方法】 HA 修飾リポソームの調製: DOPE/CHEMS からなる脂質薄膜を DSPE-HA もしくは HEPES で水和し、small lamellar vesicle (SUV)を調製し HA 修飾ナノ粒子を得た。続いて siRNA と機能性ペプチドとの複合体ナノ粒子を HA ナノ粒子に滴下混合した。HA の添加量や添加工程を変え、ゼータサイザーを用いて粒子径及び表面電位を測定した。HA 修飾リポソームの RPE 細胞への取り込み特性および CD44R 結合能の評価: 蛍光標識した各 HA 修飾リポソームの RPE 細胞への取り込み特性ならびに過量の HA 溶液で前処理した RPE 細胞および通常培養細胞の CD44R への結合能をフローサイトメトリーにて評価した。

サイレンシング効果: RPE 細胞における VEGF-siRNA 搭載リポソームによる VEGF 産生を ELISA、RT-qPCR にて測定した。表面電荷による影響検討: カチオン性脂質(DOTAP)、中性脂質(DOPC)等を用いて表面電荷の異なるリポソームを調製し、粒子物性及び細胞内導入能を比

較検討した。健康ラットへの点眼後の眼内分布：蛍光標識した粒子を点眼後経時的に摘出した眼球の凍結切片について、共焦点レーザー顕微鏡及び蛍光顕微鏡にて観察した。

令和3年度は、引き続き、ナノ粒子構造等の観点から安定かつ後眼部指向性を示す siRNA 搭載脂質ナノ粒子点眼剤の至適な製剤化条件を検討した。ナノ粒子素材として、ポリエチレングリコール-ポリカプロラクトン(MPEG-PCL)から成るブロックコポリマーミセルも作製し、HA 修飾による効果を検討した。【方法】 粒子調製：MPEG-PCL、機能性ペプチド、siRNA の三成分からなる HA 修飾核酸搭載 MPEG-PCL ブロックコポリマーミセルを溶媒希釈法で調製し、HA 添加量による粒子径及びゼータ電位変化を測定した。HA の修飾率は HA 定量キットで測定した。RPE 細胞における導入特性及び健康ラットへの点眼後の眼内分布：前年度と同様の方法で評価した。機能性ペプチド配列による細胞内挙動への影響：多機能性ペプチドのアミノ酸配列を変更した異なる配列のペプチドを合成し、構成アミノ酸による RPE 細胞内への取込み経路、点眼後の網膜移行性、RPE スフェロイドにおけるタイトジャンクション透過能を共焦点レーザー顕微鏡にて評価した。

令和4年度は、HA を修飾したリポソームが RPE 細胞に対し CD44R 介在的に取り込まれることを確認したことを踏まえ、健康ラット及び血管新生モデルラットへの点眼による眼内挙動ならびに網膜への移行性を評価した。【方法】 粒子特性評価：粒子径等の物性評価に加え、siRNA 搭載率、ペプチド定量キットによるペプチド修飾率測定を行い、高い網膜移行性を示したナノ粒子に対し、in silico 解析、分子動力的計算による粒子構造予測を試みた。眼内挙動評価：HA 修飾リポソーム及び HA 修飾高分子ナノミセルをラットに点眼し、摘出後に作製した凍結切片における蛍光顕微鏡観察を行った。モデルラットの作製及び新生血管形成抑制効果：ロイコトリエン B4 の硝子体内注射により血管新生モデルラットを作製した。ナノ粒子点眼後の網膜フラットマウントの血管免疫蛍光染色ならびに単離した網膜における VEGF 産生量を ELISA にて測定し治療効果を評価した。

4. 研究成果

本研究では、眼内移行性と粒子素材ならびに粒子特性との関連について検討し、核酸を搭載するナノ粒子点眼剤として網膜疾患治療や予防効果を発揮し得る製剤処方最適化を目指した。低侵襲的な点眼投与で網膜への核酸送達を可能とするナノ粒子担体として、リポソーム、高分子ナノミセルを用いた。はじめに、脂質ナノ粒子の粒子特性(表面電位、粒子組成、リガンド付与等)による網膜細胞への取込みならびに点眼後の眼内移行性への影響を検討した。その結果、生体内安定性と網膜指向性の付与が期待される HA をリガンドとした siRNA 搭載リポソームは、CD44 受容体が高発現する RPE 細胞に対し、受容体介在的に取り込まれることを確認した。また、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン等の種々の脂質や多機能性ペプチドを用い、異なる表面電荷をもつリポソームを調製し、細胞内取り込みや点眼後の眼内分布への影響を検討したところ、RPE 細胞においては、RT-qPCR により、網膜疾患原因である VEGF の mRNA を阻害する siRNA (VEGF-siRNA) を搭載することで VEGF 産生が抑制されることを確認した。さらに、リポソーム表面に、塩基性が高く細胞透過性ならびに細胞内でのエンドソーム回避能を持つ多機能性ペプチドを付加した正電荷リポソーム(DOTAP/DOPC/CHOL)は、負電荷および中性のリポソームに比べ、RPE 細胞への siRNA 導入効率およびラット点眼後の網膜への移行性を向上することが判った。機能性ペプチドのアミノ酸配列が RPE 細胞への siRNA 送達にどのように寄与するか検討するため、多機能性ペプチドの構成アミノ酸(システイン、アルギニン、ヒスチジン)を異なるアミノ酸に置換したペプチドを合成し、リポソームに修飾した際の実験的取込み特性を、エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシスを阻害する条件下で評価した結果、siRNA に対し高い保持能力を示す正電荷アルギニン、及びジスルフィド結合を形成するシステインは、RPE 細胞への siRNA 取込み促進に大きく寄与することが判った。これらは主にマクロピノサイトーシス経路で細胞内に取り込まれ、点眼後、粒子径非依存的な眼内移行性によって後眼部に送達される可能性を示した。これらのペプチドを併用することで、3D-RPE スフェロイドにおいて RPE の密着結合を透過し得ることが確認され、至適なアミノ酸配列の機能性ペプチドがナノ粒子担体の点眼後の網膜への移行性向上に寄与するものと推察した。HA 修飾による点眼後の後眼部への移行性はリポソーム担体で優位であり、高分子ナノミセルにおいては HA 修飾・未修飾いずれも大きな差異はみられなかった。siRNA 搭載率等の粒子解析の結果、多機能性ペプチドを付与することでリポソーム表面と機能性ペプチド鎖の双方に siRNA が搭載された構造となることが予測され、これが RPE 細胞における有意な VEGF 産生抑制作用を示した要因のひとつと推察した。ラットへの点眼評価において、リポソームへの機能性ペプチドの修飾は点眼後の眼内移行性を向上し、特に siRNA の保持能及び細胞透過能に寄与するアルギニン及びシステインを含む機能性ペプチドで構成されるリポソームが、血管新生モデルラットへの点眼において、有意に網膜での VEGF 産生を抑制することを示した。以上、本研究において、siRNA の搭載率、細胞内挙動、点眼後の眼内移行性、粒子特性の検討結果に基づき、点眼による後眼部への核酸送達を可能とするナノ粒子点眼剤の至適処方を確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Nishida Shogo, Takashima Yuuki, Udagawa Ryotaro, Ibaraki Hisako, Seta Yasuo, Ishihara Hiroshi	4. 巻 15
2. 論文標題 A Multifunctional Hybrid Nanocarrier for Non-Invasive siRNA Delivery to the Retina	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 611 ~ 611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics15020611	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西田祥伍、高島由季、遠藤花歩、宇田川凌太郎、石原比呂之
2. 発表標題 多機能性ペプチド修飾リポソームの構成アミノ酸によるsiRNA細胞内導入効率への影響
3. 学会等名 日本薬学会第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西田祥伍、高島由季、宇田川凌太郎、茨木ひさ子、瀬田康生
2. 発表標題 機能性ペプチド修飾抗VEGF-siRNA搭載リポソームのラット点眼後の網膜への集積性およびVEGF産生抑制効果
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田祥伍、高島由季、茨木ひさ子、Tatu Lajunen、瀬田康生
2. 発表標題 リポソームの表面電荷による点眼投与後のラット網膜への移行性ならびに網膜色素上皮細胞（RPE）への取り込み特性
3. 学会等名 日本薬学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水菜央、高島由季、西田祥伍、Tatu Lajunen、茨木ひさ子、瀬田康生
2. 発表標題 網膜標的化ヒアルロン酸修飾リボソームの設計
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西田祥伍、高島由季、清水菜央、茨木ひさ子、Tatu Lajunen、瀬田康生
2. 発表標題 点眼投与によるラット網膜への送達性ならびに網膜色素上皮細胞（RPE）におけるVEGF抑制効果を向上するリボソーム表面電荷特性
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020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
研究協力者	ラユネン タトゥ (Lajunen Tatu)	ヘルシンキ大学	

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
---------	---------