

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500429

研究課題名（和文）血中滞留性を向上した網膜標的光応答型 siRNA 送達システムの構築

研究課題名（英文）Preparation of retina-targeted siRNA delivery system possessing stability in blood

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

研究成果の概要（和文）：

血液網膜関門（BRB）等の存在により薬物送達が困難な後眼部（特に網膜）を標的とし、網膜色素上皮細胞に発現するトランスフェリン（Trf）受容体を指標とし、かつ血中でも高い安定性を示す Trf 修飾核酸内封リポソーム製剤を構築した。非侵襲的な点眼で投与可能であり、結膜、強膜、脈絡膜血管を介して網膜近傍に核酸を送達可能であることをラットによる *in vivo* 評価で明らかにした。さらにリポソームの構成脂質および組成により核酸放出のトリガーとなる光・温度に対する感受性を付与する可能性を示唆し、核酸医薬による網膜疾患治療への応用を期待する基礎的成果を得た。

研究成果の概要（英文）：

The transferrin(Trf)-modified liposomes which encapsulates nucleic acids such as siRNA and has stability in blood stream is developed for effective gene delivery to the posterior segment of eye (particularly retina) which has been known to be hard to deliver substances from blood stream. The results in vivo and in vitro study suggest that the system is available as non-invasive application such as eye drop and could be added light- and thermo-activating function by improving components of lipids.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：薬物送達システム、siRNA

## 1. 研究開始当初の背景

近年、難治性疾患や慢性疾患に対する治療法として機能性核酸が注目され、これを用いた核酸医薬の開発が進められている。機能性核酸は、遺伝子レベルで疾患因子の産生を促進あるいは抑制することが可能であり、効率かつ特異的に標的部位に送達させること

で、通常の全身性薬物治療に比べ、少ない副作用で高い治療効果が期待できる。癌などの難治性疾患に対しての遺伝子治療法に関する研究も進められており、機能性核酸を効率良く送達させるための遺伝子導入キャリアの研究、開発も盛んに行われている。

siRNA などの機能性核酸は、血中のヌクレオ

一ゼ等により容易に分解され、活性を損失することが知られている。さらに、ナノ粒子化等による送達システムは細網内皮系 (RES) により捕捉され排泄されることが周知である。近年では、RES を回避し、さらにスクレアーゼに耐性を示す遺伝子導入キャリアについての研究が進み、全身循環可能なデリバリーシステムが確立されつつある。特に、腫瘍標的ナノ粒子が注目されており、全身循環系から脆くなった血管組織間隙を介して腫瘍に集積する EPR 効果を利用したデリバリーシステムが多く報告されている。種々の技術が発展する昨今でも、未だにアンメットメディカルニーズの疾患は多い。特に、全身循環血流からの物質 (薬物など) の移動を制御する血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) や血液網膜関門 (blood-retinal barrier; BRB) が存在する脳や眼の疾患に対する有効な薬物送達技術が必要とされている。

加齢黄斑変性症 (AMD) は 50 歳以上の高齢者に発症し、欧米では失明原因の第 1 位となっている。この疾病は、眼の網膜中心部にある黄斑の機能が老化によって低下して生じる。滲出型 AMD の場合には、網膜色素上皮細胞 (RPE 細胞) の機能低下が原因で、脈絡膜から網膜を突き破るほどの新生血管が生じ、硝子体内に血液が滲出することで、視力の低下、時には失明にいたる。血管新生に関わる血管内皮増殖因子 VEGF の産生を阻害する siRNA を用いることで疾病治療につながると考えられる。近年、モノクローナル抗体やアプタマーによる AMD 治療薬が開発されたが、いずれも硝子体への直接注射による侵襲的投与方法であり、感染症併発等の大きなリスクを伴う治療法が適用されているのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では、AMD の発症に関与する VEGF の産生を抑制し得る siRNA 等の核酸を、血管が豊富に存在する脈絡膜から血液網膜関門を介して AMD 発症に関わる網膜色素上皮層 (RPE) へ安定に効率良く送達するためのデリバリーシステムとして後眼部 (特に網膜) 標的化核酸内封リポソーム粉末製剤を調製することを目的とする。最終的には、光応答性等の機能性を付与する。

## 3. 研究の方法

本研究は、ヘルシンキ大学薬学部 Arto Urtti 教授を研究協力者として遂行するものである。研究協力者は、金ナノ粒子の光照射による発熱現象を利用して光応答性を高める脂質ナノ粒子に関する研究成果を報告している。

モデル核酸として、オリゴデオキシリボ核酸 (ODN)、アルカリホスファターゼ (SEAP)

および VEGF の産生を抑制する短鎖 2 本鎖リボ核酸 (siRNA)、発光もしくは蛍光タンパク質発現 pDNA を用いた。

(1) 後眼部指向性を持つ核酸封入リポソーム製剤の処方および調製条件の検討

血中安定性を確保し、凝集や含有率低下等のない保存安定性の高い核酸封入リポソーム製剤の処方および調製条件を検討した。リポソームの構成成分には、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をベースとする種々の脂質を用い、界面活性剤除去法、薄膜水和法、高压高速乳化法などの調製法を応用した。また、RPE 細胞に多く発現するトランスフェリン (Trf) 受容体に結合する Trf をリガンドとして修飾し、後眼部への指向性向上を試みた。得られた種々のリポソームについて、粒子径、核酸封入率等の物性を評価した。また、金ナノ粒子併用による光応答性を示すリポソーム組成を探るため、まずは温度感受性の高い脂質組成を検討した。さらに、核酸凝縮・保持力が高いカチオン性ペプチドを用いた核酸複合体ナノ粒子をコアし、脈絡膜血管を介して網膜に送達され得る 80 nm 以下の微小な核酸封入リポソームを調製し、RPE への送達性を評価した。

(2) 調製した核酸封入リポソームの *in vitro* 細胞内取込み効率の評価

蛍光標識もしくは蛍光物質を内封した Trf 修飾および未修飾リポソームをヒトおよびラット由来 RPE 細胞にトランスフェクションし、フローサイトメトリーにて細胞内への取込み効率を測定した。また、過量 Trf で前処理した細胞への取込み効率を測定し、Trf リガンドによる取込み促進の可能性を評価した。

(3) *in vivo* 眼内分布および体内挙動の観察

蛍光標識した核酸封入リポソームについて、ラットへの点眼、硝子体内注射、尾静脈投与後の眼内・体内挙動を蛍光イメージングシステムにて観察した。また、試料投与一定時間後に摘出した眼球組織の凍結切片について蛍光顕微鏡観察を行い、眼内における局在性を評価した。

## 4. 研究成果

はじめに、凍結乾燥リポソーム再水和時に核酸溶液を加えて核酸を内封することを目的として、凍結保護剤として機能するヒアルロン酸を修飾した DOTAP/DOPE リポソームを調製し、凍結乾燥前後の物性を評価した。リポソームは粒子径約 100 nm を示したものの再水和後は約 3 倍の粒子径増大を示し、凝集あるいは多層リポソームとなることが確認された。また、核酸封入率は極めて低く調製段階での核酸のロスが大きく製造効率が低いことが判った。これを踏まえ、核酸を内封する調製法を界面活性剤除去法に変更し検

討を行った。ここでは脂質膜の安定化および血中滞留性向上のためポリエチレングリコール (PEG) を構成成分として用いた。脂質 (DOPE/CHEMS/DSPE-PEG) の薄膜に界面活性剤溶液を添加して得た混合ミセル溶液に核酸と塩基性高分子 (ポリエチレンジイミン PEI) の複合体を滴下後、界面活性剤を除去し核酸封入リポソームを調製した。得られたリポソームは粒子径 100~150 nm、70-100%の核酸内封率を示した。In vitro 安定性評価において、siRNA 単独では RNase A により速やかに分解されたのに対し、PEG を修飾した群で試験開始 24 時間後も核酸が分解されることなく安定であることを確認した。また、スクロースを凍結保護剤とした乾燥前後の粒子径および封入率に変化はなく 1 ヶ月以上安定であることを確認し、核酸内封リポソーム粉末製剤の形態にし得ることが判った。

さらに、ポストインサージョン法によるリポソーム表面への Trf 修飾を試み、ヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) における取込み挙動および遺伝子発現性、ラットへの点眼投与による眼内挙動を評価した。その結果、本リポソームが Trf 受容体を介して ARPE-19 に取り込まれること、血清存在下でも高い遺伝子発現性を示すこと、ラット眼組織切片において網膜近傍に選択的に滞留することが確認され、Trf をリガンドとした後眼部指向性付与の可能性を示唆した。

また、金ナノ粒子の光照射による発熱現象をトリガーとする光応答性リポソームの構成脂質について検討し、相転移温度が約 41°C の DPPC を主とするリポソームに親水性金ナノ粒子を内封することで一定波長の光照射での膜破壊による内容物の放出が確認された。DOPE/CHEMS を基本組成とし、これに温度感受性脂質 DPPC とリゾ脂質 MSPC を併用したリポソームに ODN/PEI 複合体を封入することで体温以上の 45°C 以上で顕著な ODN 放出が認められ、金ナノ粒子と光照射による光応答性付与の可能性が期待された。

一般に、血液網膜関門の存在により血流から網膜内への物質移行は厳しく制限されているが、眼球の脈絡膜毛細血管板に存在する有窓構造 (約 70-80 nm の小孔) を利用することで薬物・核酸送達が可能となると考えられる。そこで、高圧ホモジナイザーを用いた w/o/w エマルジョン法によって、より小さな核酸封入 Trf 修飾リポソームの調製を試みた。脂質の炭素鎖長や特性により異なる粒子径のリポソームが得られ、炭素鎖の短い脂質をベースとし適当な操作条件でエマルジョンを作製することで 60-70 nm のリポソームを得ることが可能となった。

本研究で得られた Trf 修飾核酸内封リポソームをラットまたはマウスに点眼、硝子体内注射および尾静脈内投与し、一定時間後の眼

組織切片、尾静脈投与においては各臓器を摘出し、蛍光量測定および蛍光イメージングシステム IVIS を用いて投与経路による眼内および体内挙動について検討した。その結果、尾静脈投与では、全身に分布するものの肝臓にトラップされる傾向がみられ眼内への移行量は少なく、一方、点眼による前眼部への投与では確実に後眼部の網膜近傍に核酸内封リポソームが送達できることを示唆した。

点眼投与においては、未修飾のリポソームは前眼部の角膜に多く局在したのち涙液等によって速やかに排泄されるのに対し、Trf 修飾リポソームは血管が豊富な脈絡膜中でも安定にかつ後眼部に局在することを明らかとし、また、粒子径を小さくすることで脈絡膜を介して網膜色素上皮層近傍に送達されることを示唆した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

① 高島由季、他、後眼部指向型核酸封入リポソーム点眼剤の設計, *Yakugaku Zasshi*, 査読無, 2012, 132:1365-1370

〔学会発表〕(計 9 件)

① 高島由季、他 5 名. 経眼投与による核酸封入リポソーム製剤の眼内分布の観察. 第 133 年会日本薬学会. (20130328). 横浜

② Yuuki Takashima, 他 5 名. Ophthalmic pDNA-loaded Trf-modified liposomes for targeting delivery to posterior eye segment. 2012 AAPS Annual Meeting and Exposition, (20121014). Chicago, USA

③ 高島由季. 点眼による後眼部への核酸デリバリー. 第 28 回日本 DDS 学会. (20120704). 札幌

④ 高島由季、他 5 名. 後眼部指向型核酸封入リポソーム点眼剤の設計. 第 132 年会日本薬学会. (20120328). 札幌

⑤ 高島由季 (2 番目)、他 5 名. Properties of liposomes produced by several microfluidizing protocols. 第 132 年会日本薬学会. (20120328). 札幌

⑥ 高島由季、他 6 名. Trf 修飾核酸内封リポソーム点眼剤の凍結乾燥法による粉末化と後眼部送達性. 第 132 年会日本薬学会. (20120328). 札幌

⑦ 高島由季、他 5 名. リポソーム点眼剤による後眼部への核酸デリバリー. 第 55 回日本薬学会関東支部大会. (20111008). 千葉

⑧ 高島由季、他 5 名. 後眼部をターゲットとした核酸封入点眼剤の設計. 第 21 回アンチセンスシンポジウム 第 11 回遺伝子・デ

リバリー研究会シンポジウム合同シンポジウム. (20110901). 大阪

⑨ 高島由季、他 5 名. 網膜指向型核酸内封リポソーム点眼剤の調製. 日本薬学会第 131 年会. (20110328). 静岡

[図書] (計 2 件)

① 高島由季、シーエムシー出版、山本昌監修、点眼による後眼部への核酸送達、非経口投与製剤の開発と応用～次世代型医薬品の新規投与形態の開拓を目指して～、in press (2013)

② 高島由季、シーエムシー出版、永井恒司、岡田弘晃監修、経眼網膜標的化リポソーム、ドラッグデリバリーシステムの新展開Ⅱー核酸医薬・抗体医薬・ワクチン医療を支える DDS 技術ー、p. 86-90 (2012)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者 なし