

## 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24年5月20日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659010

研究課題名（和文） 新規ナノ粒子 DDS の開発と斬新的脳血管障害治療法の確立

研究課題名（英文） Development of novel nanoparticles for DDS, and establishment of Therapeutic modality for brain ischemia by use of these nanoparticles.

研究代表者

奥 直人 (OKU NAOTO)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10167322

研究成果の概要（和文）：脳虚血/再灌流障害は、脳梗塞治療後血流再開に伴って生じる二次的な障害である。我々は灌流後に虚血巣を中心とした血液脳関門の破綻による血管透過性亢進に着目し、リポソーム DDS を用いた障害部位への薬剤送達が可能であることを明らかとした。そこで脳保護効果が知られているアシアロエリスロポエチンおよび FK506 を選択し、リポソーム製剤の有用性について検討し、脳虚血/再灌流障害に対する治療の開発を目指した。

研究成果の概要（英文）：Brain ischemia/reperfusion injury is a secondary injury occurring after reperfusion. We previously clarified that liposomal DDS enables the delivery of certain drugs to the ischemic site through the disrupted blood-brain barriers after reperfusion. Therefore, we selected two kinds of agents having neuroprotective effect, asialoerythropoietin and FK506, attempted to liposomalize them, and examined the usefulness. The aim of this work is to develop a novel DDS drugs for the treatment of brain ischemia/reperfusion injury.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,400,000 | 0       | 1,400,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 総計     | 2,700,000 | 390,000 | 3,090,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー

## 1. 研究開始当初の背景

虚血性疾患は、我が国においてがんに次いで死因別死亡率を占める克服すべき重篤な疾患である。なかでも脳梗塞は、再発率が高く、後遺症を残すことが多々あるため、患者のQOLを大きく低下させる。脳梗塞は、血栓により脳血流量が局所的に低下し、脳組織が虚血に曝されて壊死に陥る病態である。虚血によりその中心部は不可逆的な損傷を負うが、虚血巣周辺部には血流再開により死を可逆的に免れるペナンプラ領域と呼ばれる領域が存在す

る。従って、ペナンプラ領域の保護を目的とした血栓溶解療法の開発により脳梗塞治療は飛躍的な進歩を遂げた。しかし、未だ予後不良の場合が多く、その原因の一端として虚血/再灌流障害が注目され、盛んに研究されている。しかしながら未だに有効な治療薬の開発には至っていない。

脳虚血時や再灌流後には血管透過性が亢進することから、ナノ粒子製剤が有効に働く可能性が考えられる。すなわち、ナノ粒子によりラジカルスカベンジャー等の薬剤を早期に

虚血再灌流部位に送達・貯留させることにより、虚血再灌流障害を回避・改善することが可能となる。実際にこれまでに虚血性疾患へのナノ粒子 DDS の開発と応用に関して、リポソーム化ヘモグロビン (LEH, 人工赤血球) が、脳虚血部位 (ペナンプラ領域) に送達されること (*Artif. Organ*, 33, 2009)、ラット心虚血再灌流モデルにおいてリポソーム化アデノシンが心筋梗塞を改善すること (*J. Am. Coll. Cardiol.* 53, 2009) を共同研究により明らかにしている。

## 2. 研究の目的

本研究は、虚血性疾患の新たな治療薬として DDS 製剤の有効性を示すとともに、薬剤開発への応用を念頭に置いて虚血性疾患の新たな治療法を提唱する挑戦的研究である。脳虚血/再灌流障害では、脳血液関門が破たんすることが知られていることから、我々はドラッグデリバリーシステム (DDS) の脳虚血/再灌流障害への応用が可能と考えた。実際に我々は、再灌流直後から血管透過性が亢進することを見出し、さらに直径 100 nm のナノ粒子が再灌流直後から虚血再灌流部位に蓄積することを予試験的に見いだした。より詳細に DDS の可能性を探るためにラット脳虚血再灌流モデルを構築し、蛍光標識デキストランを投与後に脳切片を調製し、蛍光イメージングにより血管透過性を調べたところ、TTC 染色により確認できる再灌流障害が顕著にみられる 3 時間以降よりはるかに早く透過性変化が現れることを確認した。

本研究ではナノ粒子の最適化を行い、脳保護効果のある薬剤を用いて虚血性疾患部位への DDS を確立し、新たな DDS 創薬を実現することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 虚血再灌流障害診断・治療用 DDS キャリアの開発

脳虚血再灌流モデルとしては、既に当研究室で確立した栓子法による一過性中大脳動脈閉塞 (t-MCAO) モデルラット (図 1) を用いる。まず蛍光色素 DiI-C<sub>18</sub> で標識した種々の組成のリポソームの再灌流後における血管外集積を検討する。DiI の蛍光は *in vivo imaging system*, IVIS により脳切片を *ex vivo* で観察する。同時に TTC 法により脳細胞死を測定する。また放射標識 ([H-3]cholesteryl-hexadecyl ether を使用) ナノ粒子を用いて、定量的解析を行う。さらに脳内局所での分布と初期の脳細胞死を測定するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて血管内皮細胞の免疫染色、蛍光標識リポソーム等の集積、アポトーシス細胞

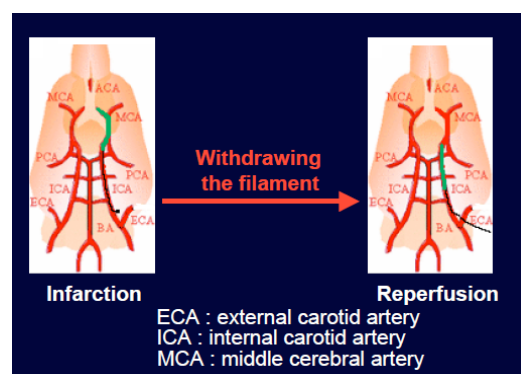


図 1 : Preparation method of t-MCAO model rats

の存在を解析する。リポソームのサイズおよび脂質組成を変化させ、リポソーム膜の流動性および荷電脂質の影響等について詳細に検討する。また血中滞留性を高める PEG 修飾の有無についても検討する。

### (2) アシアロエリスロポエチン DDS 製剤の開発

A-EPO は細胞保護効果が知られているが、血中消失が極めて速いため、虚血性疾患への到達性の改善が、本薬剤が実際の臨床応用に供されるための大きな関門となっている。DDS 製剤化は、同時にこの関門をクリアーできる方法論である。まず A-EPO のリポソーム化としてリポソーム内水相への内封、およびリポソーム表面への修飾が考えられる。これまでに予試験的に種々の条件を検討したが、高い内封率の DDS 製剤を開発することは困難であった。そこで本検討では A-EPO の共有結合によるリポソーム膜への修飾を試みる。これらの検討で、安定した A-EPO のリポソーム化製剤を開発する。

### (3) アシアロエリスロポエチンリポソーム製剤による脳虚血再灌流障害改善効果の解析

まず、A-EPO リポソーム製剤化により、A-EPO の活性がどの程度保持されるか、またリポソームに結合した A-EPO に細胞保護効果があるかどうかをインビトロで検討する。これには神経成長因子 (NGF) 存在下で神経細胞に分化する PC12 細胞を用いる。神経細胞に分化させた PC12 細胞は NGF 非存在下ではアポトーシスを起こすことが知られていることから、A-EPO リポソーム製剤によりアポトーシスの抑制が見られるかどうかを検討する。次に実際の t-MCAO モデルラットを用いて、A-EPO リポソーム製剤の投与による脳浮腫の抑制、脳細胞死の抑制等について検討する。A-EPO リポソーム製剤は尾静脈内投与で十分に脳に分布し、BBB の破綻により脳虚血再灌

流部位への集積が期待できる。

また脳虚血再灌流障害では、ラットの行動異常、すなわち神経病理学的障害が現れることが知られていることから、行動薬理的検討により、神経病理学的障害の抑制活性を評価する。

#### (4) タムスロシン DDS 製剤の開発

タムスロシン(FK506)内封 DDS 製剤を調製する条件を決定し、DDS 製剤化した FK506 に脳虚血障害に対する保護作用があるかどうかを、検証する。すでにリポソーム組成を工夫することで FK506 をリポソームの膜に安定に保持させることに成功した。本製剤の血清中での安定性、リポソームの PEG 化の影響、体内動態等を詳細に検討する。

#### (5) タムスロシン DDS 製剤の脳虚血再灌流障害への作用

調製した FK506 内封リポソーム製剤を一過性中大脳動脈閉塞モデルに投与し、その有効性について、TTC 染色による脳細胞死に対する軽減作用、脳浮腫の抑制作用、局所的アポトーシスの抑制作用等を指標に詳細に検討し、本 DDS 製剤の脳虚血再灌流障害への有用性を実証する。

### 4. 研究成果

アジアロエリスロポエチン(A-EPO)、タムスロシン(FK506)のリポソーム化に先立ち、当初予定していたラジカルスカベンジャー内封 DDS 製剤の開発を目指して、エダラボン内封リポソームの調製を試みたが、エダラボンは膜を透過する低分子であるため、リポソーム化ができる脂質組成は見いだせなかった。そこで、薬剤としては脳保護効果が知られている A-EPO および FK506 を用いることとした。

#### (1) アジアロエリスロポエチン DDS 製剤の開発

A-EPO は血管保護・新生作用が知られているが、血中消失が極めて速く虚血性疾患への応用は課題である。まず A-EPO のリポソーム化として 2 種のアプローチを行った。第一は内封である。これまでの経験から内封率をあげることは極めて難しいと考えられたが、やはり内封率が極めて低いことが明らかとなった。そこで第二の方法として A-EPO の共有結合によるリポソーム膜への修飾を試みた。実際には修飾可能な PEG 脂質である DSPE-PEG-NHS を用いた。

まず、神経様細胞において、AEPO 修飾 PEG リポソーム (AEPO-lip) の薬理活性を MTT ア

ッセイにより評価した。その結果、AEPO-lip は AEPO 単独と同等の細胞保護効果を示した。

続いて *in vivo* での検討を行った。脳虚血再灌流障害のモデルとして、栓子法による一過性中大脳動脈閉塞 (t-MCAO) モデルラットを用い、サンプルは全て再灌流直後に尾静脈内投与した。体内動態解析から、AEPO のリポソーム化によって、血中半減期が有意に向上し、虚血側半球への集積が上昇することが認められた。そこで AEPO-lip を蛍光標識し、その脳内挙動を組織レベルで観察した結果、AEPO-lip の蛍光は NeuN により染色された神経細胞周辺に強く観察された。この結果から、神経細胞膜上に発現している EPO 受容体と AEPO-lip の結合が示唆された。脳虚血再灌流後に投与した AEPO リポソームは血管から虚血周辺脳実質組織へ漏出し、神経細胞と結合した後、その作用を発揮することが示唆された。

最後に、疾患モデルにおける当該障害治療効果を検討した結果、対照群と比較し、有意な当該障害の改善が認められた。以上より、AEPO リポソームは脳虚血再灌流障害治療において有用であることが示唆された。また、本研究結果はリポソーム DDS 技術が当該障害に対する有用な治療戦略となることを支持している。

#### (2) タムスロシン DDS 製剤の開発

種々の脂質組成を用い、FK506 封入 PEG 修飾リポソームの製剤検討を行った。その結果、粒子径約 100 nm の FK506 封入 PEG 修飾リポソームの開発に成功し、高効率に薬物封入可能な調製法を確立するに至った。続いて血清とインキュベート後の FK-Lip の安定性と薬物の保持率を検討した結果、凝集は認められず、薬物の漏出もほとんど観察されなかった。さらに FK-Lip の保存条件を検討したところ、FK-Lip は冷蔵保存下で 1 ヶ月間安定であり、凍結後や乾燥後においても約 60% の保持率を示し、粒子径に有意な変化は認められなかった。以上から、FK-Lip の血中での良好な製剤安定性が示され、*in vivo* への適応可能性が示唆された。

次に脳虚血/再灌流障害モデルラットにおける FK506 封入 PEG 修飾リポソームの脳内挙動の観察をした。1 時間の虚血の後、再灌流と同時に FK-Lip を投与し、その脳内挙動を *ex vivo* 解析、免疫組織学的解析を用い評価した。その結果、FK-Lip は早期から継続的に虚血巣を中心に集積し、長時間にわたって保持されること、さらに集積した FK-Lip は血管内から漏出し、脳実質組織の広範囲に拡散すること

が示された。従って、FK-Lip は脳実質の神経細胞やグリア細胞にまで FK506 を送達でき、脳保護効果を発現可能であると推察される。

FK-Lip 投与による脳虚血/再灌流障害治療を検討した。まず、急性期における治療効果を評価した結果、FK-Lip は t-MCAO モデルラットにおいて、対照群である PBS 投与群、同用量の FK506 投与群と比較し、脳細胞死、脳浮腫、運動機能障害を有意に抑制した。さらに、その後の長期的な経過観察においても良好な運動機能障害、脳血流不全の改善効果が観察された。よって、FK-Lip は原薬と比べ脳虚血/再灌流障害に対する治療効果が向上し、投与量を低減可能であることが示された。

本研究成果を基に、虚血性疾患治療に有効な DDS 剤の開発が期待できる。

#### 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 5 件)

- ① Takayuki Ishii, Tomohiro Asai, Takeo Urakami, Naoto Oku: Accumulation of macromolecules in brain parenchyma in acute phase of cerebral infarction/reperfusion. *Brain Res.*, 1321, 164-168 (2010)
- ② Naoto Oku, Mina Yamashita, Yurie Katayama, Takeo Urakami, Kentaro Hatanaka, Kosuke Shimizu, Tomohiro Asai, Hideo Tsukada, Shuji Akai, Hiroaki Kanazawa: PET imaging of brain cancer with positron emitter-labeled liposomes. *Int. J. Pharm.* 403, 170-177 (2010)

[学会発表] (計 19 件)

- ① 石井貴之、浅井知浩、尾山大、福田達也、安田和、上戸由里佳、清水広介、南野哲男、奥直人：リポソーム DDS 技術を応用した脳虚血/再灌流障害治療法の開発、日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012 年 3 月 30 日
- ② 福田達也、石井貴之、尾山大、安田和、上戸由里佳、浅井知浩、清水広介、南野哲男、奥直人：リポソーム DDS を応用した脳虚血時における新規脳保護戦略の構築、日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012 年 3 月 30 日
- ③ 上戸由里佳、石井貴之、尾山大、安田和、福田達也、浅井知浩、清水広介、南野哲男、奥直人：脳虚血再灌流モデルラットにおける FK506 封入 PEG 修飾リポソームの薬理効果及び脳内挙動の解析、日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012 年 3 月 29 日

- ④ Naoto Oku, Takayuki Ishii, Dai Oyama, Tatsuya Fukuta, Nodoka Yasuda, Kosuke Shimizu, Tomohiro Asai, Tetsuo Minamino: Application of liposomal DDS for the treatment of ischemia/reperfusion injury. International Liposome Society 2011 Meeting (London, UK) 2011 年 12 月 10 日
- ⑤ 安田和、石井貴之、尾山大、上戸由里佳、福田達也、浅井知浩、清水広介、南野哲男、奥直人：脳虚血再灌流障害治療に向けた FK506 封入 PEG 修飾リポソームの応用、第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (岡山) 2011 年 11 月 24 日
- ⑥ 石井貴之、浅井知浩、福田達也、尾山大、安田和、清水広介、南野哲男、奥直人：リポソーム DDS による Asialo-erythropoietin の脳虚血再灌流障害抑制効果の増強、第 27 回日本 DDS 学会 (東京) 2011 年 6 月 9 日
- ⑦ Dai Oyama, Takayuki Ishii, Tomohiro Asai, Tatsuya Fukuta, Nodoka Yasuda, Kosuke Shimizu, Tetsuo Minamino, Naoto Oku: Treatment of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury with Liposomal Asialo-Erythropoietin, Liposomes Jerusalem 2011 (Jerusalem Israel) 2011 年 5 月 15 日
- ⑧ Takayuki Ishii, Tomohiro Asai, Dai Oyama, Tatsuya Fukuta, Nodoka Yasuda, Kosuke Shimizu, Tetsuo Minamino, Naoto Oku: Liposomal Drug Delivery System as a Potential Strategy for the Treatment of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury, Liposomes Jerusalem 2011 (Jerusalem Israel) 2011 年 5 月 15 日
- ⑨ 奥直人：DDS 剤のイメージングと脳虚血再灌流障害治療の新戦略、第 35 回製剤セミナー (浜松) 2010 年 7 月 21 日
- ⑩ Takayuki Ishii, Dai Oyama, Tomohiro Asai, Kosuke Shimizu, Tetsuo Minamino, Naoto Oku: Treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury by liposomal drug delivery system., LRD/LLMB 2010 Conference (Vancouver, Canada) 2010 年 8 月 4 日

[図書] (計 1 件)

- ① Kosuke Shimizu, Naoto Oku: Brain Tumor Diagnosis Using PET with Angiogenic Vessel-Targeting Liposomes. "Tumors of the Central Nervous System volume 3 Brain Tumors" (Part 1) (Hayat, M.A. ed.) pp.169-176 Springer London. (2011)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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◇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

奥 直人 (OKU NAOTO)  
静岡県立大学・薬学部・教授  
研究者番号：10167322

### (2)研究分担者

浅井 知浩 (ASAI TOMOHIRO)  
静岡県立大学・薬学部・講師  
研究者番号：00381731

### (3)清水 広介 (SHIMIZU KOSUKE)

静岡県立大学・薬学部・助教  
研究者番号：30423841