

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592679

研究課題名(和文) 標的化リポソーム新生血管阻害剤の開発：加齢黄斑変性の新規治療を目指して

研究課題名(英文) Development of new drug delivery system using targeted liposomes for age-related macular degeneration

研究代表者

本田 美樹 (Honda, Miki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30348990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000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(DDS)により脈絡膜新生血管(CNV)に対する新しい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。ラットCNVモデルにファスジルリポソームを点眼後、HPLCを用いて、眼内組織のファスジル到達量を測定した結果、脈絡膜内にファスジルが検出された。さらに、CNVの形成が抑制されていることを確認した。本研究の結果、ファスジルリポソームは加齢黄斑変性の新しい治療薬となる可能性が示された。

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 remote loading method (liposomal fasudil). After the suspension of liposomal fasudil was dropped into eyes of the model animal, the amount of fasudil in the ocular tissue was measured using high performance liquid chromatography. We could confirm the signal of fasudil in the choroid. 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 age-related macular degeneration.

研究分野：眼科

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

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そ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、日本でも疾患数が増加している。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ている眼内局所投与による臨床試験が競って行われるようになった。

現在注目されているのが血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)を標的分子とした抗新生血管療法である。これらの薬剤は、ヒト、または動物実験で抗脈絡膜新生血管作用が報告されている一方で、薬剤は非常に高価であり、さらに有効な治療効果を得るためには頻回投与が必要であるため、それに伴う合併症、高額な医療費が問題となっている。薬物を少ない投与量で標的とする組織に効率的に作用させ、投与回数と副作用を少なくすることを目的とするドラッグデリバリーシステム(DDS)を用いた新規の治療法の確立が求められる。そこで申請者の研究グループは、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研究を行なっている。

申請者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(図1 A,B)。

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持って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。

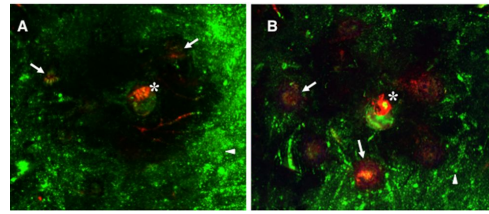


図1 硝子体内注入4日後の蛍光染色
A: Lip-SU5416 B: APRPG-Lip-SU5416
: CNV *視神経
リポソーム(赤)脈絡血管(緑)

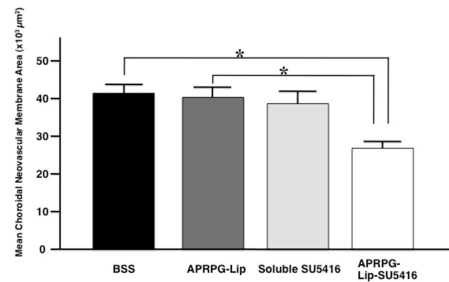


図2. APRPG-Lip-SU5416のCNV抑制効果

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

本研究の最終目標は、抗新生血管薬をリポソーム化することにより、薬物標的化、放出制御を行うことであるが、その前段階として1)リポソームの脂質組成、サイズ、電価などをコントロールし、糖質や抗体などの表面修飾を行い、脈絡膜新生血管の標的化に有効なリポソームの探索 2)眼に局所投与したリポソームの動態、安全性、という臨床、基礎解析を通じて、薬剤封入リポソームの有用性の検討を検討する。さらにドラッグデリバリーシステム(DDS)技術を用いて、眼内抗新生血管薬の製剤化、リポソームを薬剤キャリアとして抗新生血管薬の薬物標的化、薬物放出制御(コントロールドリリース)を行い、少ない治療回数で治療効果が得られるような製剤を探索し、合併症の減少、医療費の削減を目標とする。さらに治療における有用性を検討することを目的とする。組成の異なるリポソームの眼内動態明らかにし、安全性についての検討を行う。

以上、本研究はDDS技術を用いて、少ない回数で治療効果を得られる加齢黄斑に対する新規DDS製剤を開発することを目的とする。

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

粒子径：90nm 総脂質濃度：40mM

DPPC：ジパルミトイルホスファチジルコリン
DPPG：ジパルミトイルフォ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

リポソームは凍結乾燥法を用いて調整した。上記脂質をナスフラスコに添加した後 Tert-butanol を適量加え、減圧下クロロホルムを除去、凍結乾燥(overnight)4.20 mM HEPES 5 mL を加え、ハイドレーション(60度)の後、凍結融解(×3)を行った。エクストルージョン(100 nm×5)を行った後、粒子径とゼータ電位を測定を行った。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(ファスジル)の内封を行った：APRPG 修飾ファスジル内封リポソームの調製を行った。

始めに、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 に溶解したファスジル溶液を 750 μg/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、ファスジル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ファスジルを除去し、粒子径および電位を測定した。なお、リポソームへのファスジル内封量は吸光度(λ=320 nm)から算出した。

(3) 動物モデル

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 視神経周囲、同心円状に6発)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(2×106 MW)を用いて灌流染色を行った。脈絡膜血管は緑に染色、リポソームは赤に染色されるように二重染色を行い、眼局所投与後のリポソームの到達を蛍光顕微鏡(キーエンス BZ900)を用いてリポソーム到達量を判定した。さらに蛍光顕微鏡解析ソフトを用いて、CNV の面積測定を行うことにより、薬剤内封リポソームの CNV 抑制効果を判定した。

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) 高速液体クロマトグラフィーを用いた分析・定量

組織に局在しているファスジルを定量するために、高速液体クロマトグラフィーを用いた。カラムは逆相 C18 カラム (TSK) を使用し、移動相としてアセトニトリル、0.1% ギ酸を用い、流速を 0.5 mL/min、カラム温度を 60 に設定した。まず、0.1% ギ酸溶液で平衡化したカラムに測定試料 (20 μL) を添加し、0.1% ギ酸溶液で洗浄後、アセトニトリルの濃度勾配 (0-30% / 20 分) により溶出した。次にアセトニトリルを 70% に上昇させて10分間カラムを洗浄した後に0.1%ギ酸溶液で再平衡化し、次の測定に備えた。ファスジルの検出は 320nm の吸光度測定により行った。

本方法を用いたファスジルの定量的定量範囲を確認するためにファスジル標準品を測定し、ファスジルの量と 320nm の吸光度との関係を調べた。その結果、10ng の範囲で定量直線性があることが分かり、作成した検量線により定量した(図3)。

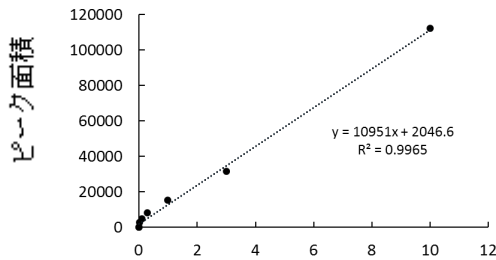


図3：組織中のファスジルの検量（ $\mu\text{g/mL}$ ）

(5)組織中のファスジルの定量

眼局所投与後の各組織のファスジルの定量は以下の方で行った。

ラットの眼球摘出後に各組織（角膜、虹彩・網様体、水晶体、網膜、脈絡膜、強膜）を分離し、平底チューブに各組織を入れ、組織の受領を測定した。組織の重量(g) \times 5(mL)の0.9%NSCL/10mM Glutamine水溶液を加え、氷冷しながら完全にホモジナイズ（ジルコニアビーズ、shameman2）を行った。その後組織ホモジナイズ液、除蛋白抽出液である「5%過塩素酸・30%AcCN/65%MeOH」を1：の割合で混合し、Vortex後、室温で30分間放置した。その後遠心分離（20,000 \times g、15min）を行い、上清を回収、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて定量を行った。

4．研究成果

(1)ラット実験的 CNV に対する標的化リポソームの到達の検討

ラット眼に以下の新生血管標的化リポソームを結膜下注射（1日1回）・点眼（1日4回）を行った後の二重染色の結果を示す。
 DPPC/choI/APRPG-PEG-DSPE：電化修飾なし
 DPPC/choI/SA/APRPG-PEG-DSPE：正電荷修飾
 DPPC/choI/DPPG/APRPG-PEG-DSPE 負電荷修飾
 の点眼・結膜下注射・硝子体内注入を行った後に二重染色を行い蛍光顕微鏡を用いて眼内薬物動態を検索し、CNVに到達する最も適したリポソームを検討した。全ての群でリポソームは脈絡膜に到達していた。負電荷修飾リポソームが電化修飾（-）リポソームよりも、CNVに多く到達している傾向が認められ、負電荷修飾リポソームの到達量が最も多かった。さらに結膜下注射では脈絡膜血管にリポソームが集積しているのに対し、点眼群ではCNV周囲にリポソームの集積を認めた。（図4）

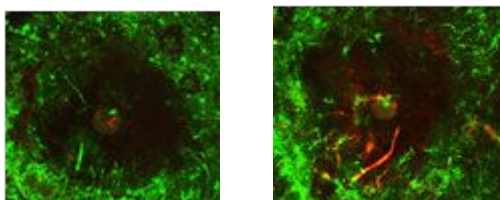


図4：左点眼後、右：結膜下注射後

さらに点眼群3群（電化修飾なし・正電荷修飾・負電荷修飾）を5日間点眼後に二重染色を行った結果、負電荷修飾リポソームがCNV周囲に集積していることが確認された（図5：a,b,c）。

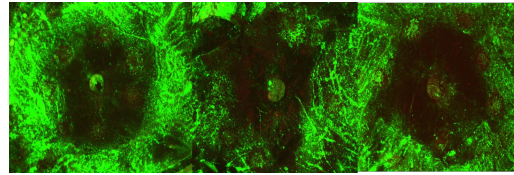


図5a b c

点眼5日後のリポソームの分布

a：DPPC/choI/APRPG-PEG-DSPE

b：DPPC/choI/SA/APRPG-PEG-DSPE

c：DPPC/choI/DPPG/APRPG-PEG-DSPE

(2)薬剤内封リポソームの調整

(1)で選定した標的化リポソーム、DPPC/choI/DPPG/APRPG-PEG-DSPEの内水相に新生血管阻害作用が報告されているRho-キナーゼ阻害剤（ファスジル）の内封を上述のリモートローディング法により行ったところ、約70%の封入率が得られた。本研究を始めた当初は、リポソーム外水層の硫酸アンモニウム除去の操作は、15分間の延伸（453,000 \times g）を1回だけ実施していた。しかしこの方法では、ファスジルの内封率が20-30%とかなり低かった。ファスジルのリモートローディング法による内封方法の駆動力には内水層と外水層間の硫酸アンモニウムの濃度勾配が重要であることが報告されている。そこで1回の超遠心では、リポソーム外水層に存在する硫酸アンモニウム水溶液の除去が不十分であったと考え、遠心・再懸濁の操作を3回繰り返し、硫酸アンモニウム水輸液の除去を徹底した。その結果ファスジルの内封率が約70%と大幅に改善した（70.4 \pm 13.6, n=3）。リポソームへのファスジルの内封には、外水層の硫酸アンモニウムの完全な除去が重要であることが判明し、最終的にファスジル内封率が約70%のAPRPG修飾ファスジル内封リポソームの調整に成功した。調製したリポソームは今のとおりである。

APRPG修飾ファスジルリポソーム

脂質組成

holsterol/DPPG/APRPGDSPE=10/5/1/1

粒子径：112 \pm 10.5

PDI;0.14 \pm 10.5*

電位：-0.39 \pm 3.7

ファスジル濃度：750 $\mu\text{g/mL}$

APRPG; Ala-Pro-Arg-Pro-Gly

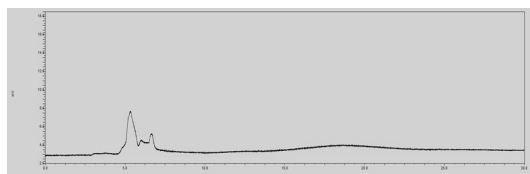
PEG; polyethylene glycol

*PDI ; olydispersity index

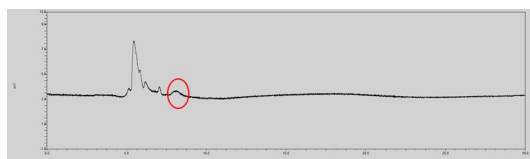
(3)組織内のファスジルの定量

ラットに1日4回、2週間点眼を行った後

HPLC を用いて各組織へのファスジルの定量を行った結果、ファスジルの虹彩網様体・脈絡膜に到達していることが確認できた(図6:A、B)。しかし到達量は虹彩・網様体が最も多く脈絡膜血管では微量であったため、今後、分析条件の改善、さらに質量分析器を用いた組織内のファスジル定量方法の確立を検討する。

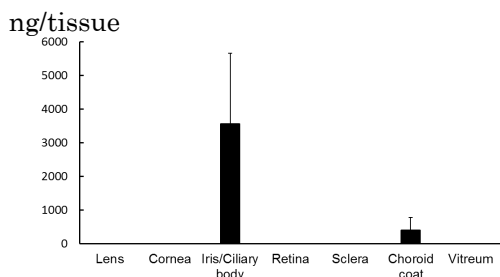


組織コントロール



ファスジル検量線ピーク (ファスジル 1 μ/mL)

図6(A) ファスジル検量のクロマトグラム



(B) 各組織におけるファスジル濃度

脈絡膜への分布は微量であったため、今後質量分析装置を用いてのファスジル定量法の確立を検討する。

点眼後の CNV 抑制効果

ファスジル内封リポソームを CNV モデルラットに2週間点眼した後、蛍光染色を用いて CNV の面積を比較した。その結果ファスジルリポソーム群はコントロール銀と比べ有意に CNV の作成が抑制されていた。今後ファスジル溶液投与後との有用性の比較を行う予定である。

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 6件)

Ogura Y, Terasaki H, Gomi F, Yuzawa M, Iida T, Honda M, Nishijo K, Sowade O, Komori T, Schmidt-Erfurth U, Simader C,

Chong V; VIEW 2 Investigators. VIEW Investigators. Efficacy and safety of intravitreal aflibercept injection in wet age-related macular degeneration: outcomes in the Japanese subgroup of the VIEW 2 study. *Br J Ophthalmol*. 2015 Jan;99:92-7. (査読あり)

Korobelnik JF, Holz FG, Roeder J, Ogura Y, Simader C, Schmidt-Erfurth U, Lorenz K, Honda M, Vitti R, Berliner AJ, Hiemeyer F, Stemper B, Zeitz O, Sandbrink R; GALILEO Study Group. Intravitreal Aflibercept Injection for Macular Edema Resulting from Central Retinal Vein Occlusion: One-Year Results of the Phase 3 GALILEO Study. *Ophthalmology*. 2014 Jan;121:202-8. (査読あり)

Honda M, Asai T, Oku N, Araki Y, Tanaka M, Ebihara N. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on ocular targets. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:495-503. (査読あり)

本田美樹 抗 VEGF 治療セミナー アフリベルセプト、あたらしい眼科 31 巻 3 号 375-376、2014

Honda M, Asai T, Umemoto T, Araki Y, Oku N, Tanaka M. Suppression of Choroidal Neovascularization by Intravitreal Injection of liposomal SU5416. *Archives of Ophthalmology* 129(3):317-21, 2011 (査読あり)

本田美樹 ペガブタニブとベバシズマブの特性と使い方、臨床眼科 67 巻 12 号 Page1840-1848、2013

[学会発表](計 11 件)

本田美樹、Rho キナーゼ阻害剤内封リポソーム点眼による実験的脈絡膜新生血管抑制効果、第 54 回日本網膜硝子体学会、2015 年 12 月 4 日、東京国際フォーラム 東京都千代田区)

本田美樹、Rho キナーゼ阻害剤内封リポソーム点眼による実験的脈絡膜新生血管抑制効果、第 119 回日本眼科学会、2014 年 4 月 16 日、さっぽろ芸文館・ロイヤルホール 北海道札幌市

本田美樹、加齢黄斑変性に対するドラッグデリバリーシステム、第 30 回日本 DDS 学会 2014 年 7 月 30 日、慶応大学薬学部 東京都港区

本田美樹、黄斑疾患に対するドラッグデリバリーシステム、第 33 回日本眼薬理学会、2013 年 9 月 21 日、京王プラザホテル 東京都新宿区

本田美樹、2013 年 第 29 回日本 DDS 学会、点眼・結膜下注射によるペプチド修飾リポソームの後眼部デリバリーの検討、2013 年 6 月 6 日、京都テルサ 京都府京都市

本田美樹、点眼・結膜下注射によるペプチド修飾リポソームの後眼部デリバリーの検討、第117回日本眼科学会2013年4月4日東京国際フォーラム 東京都千代田区

Miki Honda, Intravitreal VEGF Trap-Eye Injection for Macular Edema in Central Retinal Vein Occlusion: Results of the Phase 3 GALILEO Study, The 8th ISO-HKA, 2012年12月15日、香港

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 美樹 (HONDA, MIKI)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：30348990

(3) 連携研究者

荒木 慶彦 (ARAKI, YOSHIHIKO)
順天堂大学・医学部・先任准教授
研究者番号：70250933

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