

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462754

研究課題名(和文)自己集合性ペプチドを用いた新規徐放剤の開発

研究課題名(英文)The development of the new controlled release agent using a self-assembling peptide

研究代表者

坂口 裕和(Hirokazu, Sakaguchi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：80379172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：薬物治療を行う際、患部に薬物を直接投与することが最も効果的である。網膜疾患においては、硝子体内投与が広く用いられているが、薬剤の効果持続期間の問題から頻回投与を必要とする場合が多い。そのため、長く効果が持続するような徐放剤の開発が急務となっている。我々は、自己集合性ペプチドに薬剤徐放能力があることを確認し、徐放された薬剤にその効果があることを確認した。また、開発した徐放剤が硝子体内投与可能であることも併せて確認した。

研究成果の概要(英文)：When treating a disease pharmacologically, it is most effective to deliver a drug directly to the affected area. In retinal disease, intravitreal administration has been widely used and, often needed frequent dosing because the duration of effect of drug is short. Therefore it's imperative that controlled release agent remaining effective for a long time is developed. We confirmed that a self-assembling peptide had an ability to release a drug slowly and the released drug had effect. Additionally, we checked that the controlled release agent could be administered intravitreally.

研究分野：網膜硝子体

キーワード：網膜疾患 硝子体投与 DDS 自己集合性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

眼球は、角膜、強膜で囲まれており、また、血液網膜関門、血液房水関門などのバリアがあり、眼外からの、あるいは血管からの物質の移動が厳格に制御されている。したがって眼内特に網膜脈絡膜組織へのドラッグデリバリーを考える場合、点眼、軟膏、内服等では薬剤を有効濃度に到達させることが困難であることが多い。現在、網膜脈絡膜組織への薬物投与方法として、最も有用なものの一つに、硝子体内投与がある。眼外から強膜、毛様体を通して(多くは27Gより細い針を用いて)硝子体内へ薬物を注入する。眼内へ直接投与可能であることから、全身的な影響も最小限であると考えられる。

現時点における硝子体内投与の問題は、多数回投与が必要である場合が多いことである。薬物治療を行う際に、眼内における薬物濃度を長期間維持することが重要になる。しかし、当方法では単回投与の場合、眼外への移行が早く、そのため有効濃度持続時間も短くなるため頻回に投与することが必要となる。現在硝子体内投与という方法で用いられている薬剤には、ラニズマブなどがあるが、いずれも複数回投与を必要としている。さらに投与には合併症を生じる可能性もあるため、複数回投与すれば、それだけリスクも高くなる。また、複数回投与は患者にとって金銭的な負担も課すこととなり、社会的な問題になっている。

2. 研究の目的

複数回投与の問題を解決するために、現在、様々な徐放剤の開発が進んでいる。眼内で分解される分解性インプラント、あるいは半年から数年徐放可能な貯蔵型の非分解性インプラント、微粒子製剤、といったものである。分解性インプラントでは、除去手術が不要である反面、長期の安定した徐放剤の開発が困難で徐放効果は数ヶ月程度である。非分解性インプラントでは、半年から数年の長期に渡って徐放可能であるが、インプラントは眼内に残留することになる。半年から数年に渡り徐放可能であり、安定した薬剤徐放効果を有し、生体内で分解されるといった性質をもつ理想的な徐放剤の開発には、現在のところ至っていない。

一方、我々はこれまで自己集合性ペプチドゲル PanaceaGel を用いて人工硝子体の開発を行ってきた。この自己集合性ペプチドゲルは、非動物由来の完全合成自己集合性ペプチドからなる透明な高含水ゲルである。水中において自己集合して逆並行シート構造を形成する。このシートは片面に親水性アミノ酸を、もう片面に疎水性アミノ酸が露出するように設計されている。水中では疎水性面を隠すように集合し、両面に親水性アミノ酸が露出した分子集合体となる。この分子集合体が伸長し、ナノファイバーとなり、3次元網目構造を形成することで水溶液はゲ

ル化する。この網目構造を有するため、自己集合性ペプチドゲルは薬物徐放基材となり得ること、また安定した徐放作用を有する可能性があることが報告されている。加えて、我々の人工硝子体研究において、徐々に眼内で分解されることも分かっており、長期の安定した徐放効果があり、かつ生体内で分化されるための術後摘出手術も不要である、より理想的な情報製剤になる可能性がある。以上を踏まえ、本研究の目的を、自己集合性ペプチドを用いた硝子体内投与可能な新規徐放剤の開発とし、対象薬剤をベバシズマブとし、自己集合性ペプチドゲルの徐放基材としての性能、そして、自己集合性ペプチドゲル包埋による薬剤への影響を *in vitro* で、さらに硝子体内投与が可能かを *in vivo* で検討した。

3. 研究の方法

(1) 薬剤の封入性評価

各種濃度のペプチドゲルに 12.5mg/mL に希釈されたベバシズマブを混合し、静置した。その後、蒸留水で混合ゲルを洗浄し、その洗浄液を回収し、そこに含まれるベバシズマブ量を ELISA 法により定量することにより、ペプチドゲルへの薬剤封入率を算定した。

(2) 薬剤の徐放性評価

薬剤の封入性評価実施後の混合ゲル上に BSS プラス® を静置した。その後 1 ヶ月間、適当な間隔で上清の BSS プラス® をサンプリングした。各時期に回収された BSS プラス® 中に含まれるベバシズマブ量を ELISA 法により定量し、その徐放性を評価した。

(3) 薬剤の徐放基材への包埋による影響の評価

細胞増殖抑制試験

ペプチドゲルに封入されたベバシズマブの HUVEC 細胞増殖抑制能を検討した。ペプチドゲルにベバシズマブを 1, 2, 3, 4 週間封入後、ベバシズマブを抽出した。その抽出ベバシズマブの HUVEC 細胞増殖抑制能を alamarblue assay により定量的に評価した。

細胞遊走抑制試験

ペプチドゲルに封入したベバシズマブの HUVEC 細胞遊走抑制能を検討した。ペプチドゲルにベバシズマブを 1, 2, 3, 4 週間封入後、ベバシズマブを抽出した。その抽出ベバシズマブの HUVEC 細胞遊走抑制能をアンジオジェネシス血管内皮細胞遊走アッセイシステムにより定量的に評価した。

(4) 徐放剤の硝子体内投与

ベバシズマブを封入したペプチドゲルを正常白色家兎へ硝子体投与を行い、投与可能かを検討した。

4. 研究成果

(1) 薬剤の封入性評価

ペプチドの最終濃度が 1, 0.7, 0.5, 0.3, 0.1, 0.05%の混合ゲル全てにおいて、そのベバシズマブ封入率は 99%以上であった。

Concentration Of Peptide (%)	0.05	0.1	0.3	0.5	0.7	1.0
Entrapment Efficacy (%)	99.6	99.2	99.6	99.7	99.6	99.5

表1 ペプチド濃度と薬剤封入率

(2) 薬剤の徐放性評価

ペプチド濃度 0.05, 0.1%の混合ゲルからのベバシズマブ徐放挙動は、初期 burst ベバシズマブ量においてはそれぞれ 19, 34 μg、1日のベバシズマブ徐放量においてはそれぞれ 0.5, 1.3 μg、封入されたベバシズマブ全量徐放されるまでの期間はそれぞれおよそ 7, 2.5 年であった。ペプチド濃度 0.3%以上においては、ベバシズマブはほとんど徐放されなかった。

Concentration Of Peptide (%)	0.05	0.1	0.3	0.5	0.7	1.0
Initial burst Amount (μg)	19	34	ND	ND	ND	ND

表2 ペプチド濃度と初期 burst 量

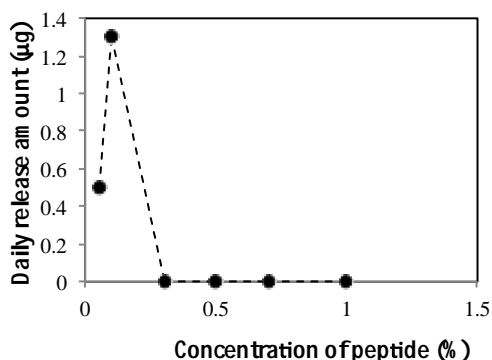


図1 ペプチド濃度と1日の徐放量

(3) 薬剤の徐放基材への包埋による影響の評価

細胞増殖抑制試験

ペプチド濃度 0.1%のゲルに封入されたベバシズマブの HUVEC 細胞増殖抑制能は、未封入のベバシズマブ活性と同等の活性を持つことが確認された。

細胞遊走抑制試験

ペプチド濃度 0.1%のゲルに封入されたベバシズマブの HUVEC 細胞遊走抑制能は、未封入のベバシズマブ活性と同等の活性を持つことが確認された。

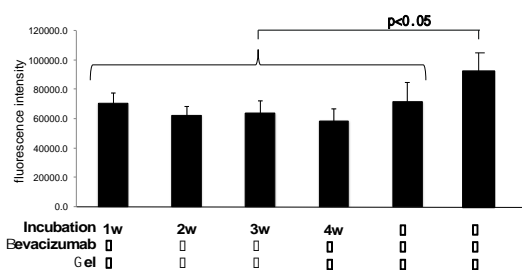


図2 HUVEC 細胞増殖抑制活性

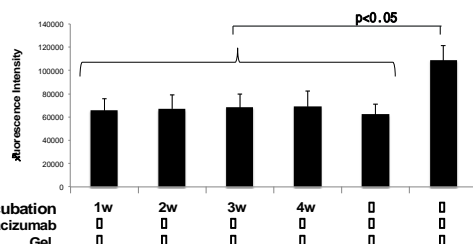


図3 HUVEC 細胞遊走抑制活性

(4) 徐放剤の硝子体内投与

ペプチド濃度 0.1%のベバシズマブ混合ゲル 300 μL は、ゲルに封入されていないベバシズマブ同様に硝子体内投与可能であることが確認された。

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0件)

[学会発表](計3件)

Sakaguchi H, Self-assembling peptide as controlled release drug carriers: Bevacizumab entrapment efficiency and controlled release, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, 2014/5/4-8, Florida, U.S.A.,

Sakaguchi H, Self-assembling peptide as controlled release drug carriers: Influence on the effect of Bevacizumab by being entrapped in the gel, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, 2015/5/3-7, Colorado, U.S.A.

坂口裕和, 抗 VEGF 抗体徐放剤の開発: 徐放性および効果について、第 120 回日本眼科学会総会、2016 年 4 月 7-10 日、仙台、仙台国際センター

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂口 裕和 (SAKAGUCHI HIROKAZU)
大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授
研究者番号：80379172

(2) 研究分担者

西田 幸二 (NISHIDA KOHJI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：40244610

林 竜平 (HAYASHI RYUHEI)
大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授
研究者番号：70535278

(3) 連携研究者

()

研究者番号：