

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23249005

研究課題名(和文) 創造的インテリジェントDDSによる脳虚血再灌流障害の診断と治療の新展開

研究課題名(英文) New development of diagnostic and therapeutic modality for ischemia/reperfusion injury by intelligent DDS

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管疾患は、我が国の死因別死亡率第4位、要介護第1位の重篤な疾患であり、その6割が脳梗塞である。本研究は、脳梗塞の新たな治療薬として脳梗塞部位に薬を運ぶ薬物送達システムを利用した製剤を創り、その有効性を示すものである。普段は血液中から脳組織への物質透過は厳密に制御されているが、脳梗塞時にはこの関門が破綻する。我々は100 nm(1万分の1 mm)の脂質でできたカプセル(リポソーム)が、虚血部位に入ることを見出した。このリポソームの表面に脳細胞を保護するタンパク質を付けたリ、リポソーム内に脳保護薬を入れると、脳梗塞で死ぬ脳細胞の数が減り、後遺症の指標である運動機能の低下が一部抑えられた。

研究成果の概要(英文)：Cerebrovascular disease, stroke, is the fourth leading cause of death in Japan, and the first position of the number of people certified for long-term care. Cerebral infarction occupies about 60% of the disease. This study aimed to create a new drug by use of drug delivery system which delivers the drug to the ischemic site. Although transport of materials from bloodstream to brain tissue is strictly regulated in normal brain, this barrier (blood-brain barrier) is degenerated in cerebral infarction. We observed that 100 nm-sized liposome, a lipid-based microcapsule, could enter the ischemic brain tissues. We modified a certain protein having neuro protective effect on the liposomal surface or incorporated some neuro protective drugs in liposomes. These liposomes protected the brain cell death by infarction, and suppressed the decrease in motor function, an indicator of the aftereffect by brain infarction.

研究分野：薬物送達学

キーワード：脳梗塞 虚血再灌流障害 薬物送達システム DDS リポソーム 脳保護薬 ナノ粒子 運動機能

### 1. 研究開始当初の背景

心疾患および脳血管疾患は予後不良のため、要介護に至る第 1 位の疾患であり、患者の QOL の観点のみならず、医療経済的にも本疾患の克服は重要課題である。脳血管疾患の約 6 割は血栓により虚血が誘発される脳梗塞である。我々はこれまでにリポソーム DDS の開発を進め、脳虚血による脳梗塞を改善するリポソーム化ヘモグロビン (LEH, 人工赤血球) が血液の行かない虚血部位 (ペナンブラ領域) に送達されること (*Artif. Organs* 33: 164-168, 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効率的に働くことにより心筋梗塞を改善すること (*J. Am. Coll. Cardiol.* 53: 709-717, 2009) を共同研究により明らかにしてきた。これらは虚血性疾患治療にリポソーム DDS が極めて有効であることを示唆している。さらに、より詳細に DDS の可能性を探るために、栓子法による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。その結果、脳切片の 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (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、再灌流直後から血管透過性が亢進することを見出した (*Brain Res.* 1321: 164-168, 2010)。本研究ではリポソームの最適化を行い、細胞保護効果があり、標的能を有するアシアロエリスロポエチン等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。

### 2. 研究の目的

本研究では、栓子法による一過性中大脳動脈閉塞モデル (transient middle cerebral artery occlusion, t-MCAO) を用い、虚血再灌流部位へのリポソームを用いた薬物送達の有効性を検討する。これには細胞保護作用が知られ、脳神経細胞等に受容体が発現しているアシアロエリスロポエチン (A-EPO) を薬剤として用いる。A-EPO は、EPO と異なり造血作用がなく細胞保護・血管新生作用を有するが血中消失が極めて速いため、DDS 製剤化が極めて有効と考えられる。A-EPO の特性を考慮し、脳血管障害部位を標的としたアクティブターゲティング DDS 製剤の開発を行う。また、研究が予想以上に進展した場合には、A-EPO に代わる低コストの DDS 製剤についても開発を進める。これらに検討により、世界初の脳を標的とするリポソーム DDS 製剤の有用性を明らかにし、臨床応用可能な製剤開発の基盤を形成する。

### 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) モデルラットを用い、蛍光色素 Dil-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した。Dil-C<sub>18</sub> の蛍光はインビボ蛍光イメージングシステム (IVIS) により脳切片を *ex vivo* で観察した。同時に TTC 法により脳細胞死を測定した。また放射標識 ([H-3]cholesteryl-hexadecyl ether を使用) ナノ粒子を用いて、定量的解析を行った。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、アポトーシス細胞の存在を解析した。

(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、本薬剤を臨床応用に供す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。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が、内封率の問題やアクティブターゲティングのメリットを考え、本検討では A-EPO を直接脂質に共有結合させリポソーム膜を修飾する方法を用いた。実際に、A-EPO 修飾リポソームの調製にすでに成功しており、24 時間後においても血液中に存在することを確かめている。

さらに A-EPO の活性が、この修飾によりどの程度保持されるか、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した。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 細胞を用いた。NGF で PC12 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した。

(3) A-EPO リポソーム製剤の薬理活性の検討:

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、疾患部位の脳血流の経時的変化について検討した。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、脳機能障害を基としたラットの行動異常、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。そこで A-EPO および A-EPO リポソーム製剤を用いて、t-MCAO モ

デルラットにおける行動薬理的検討により、神経病理学的障害を A-EPO リポソーム製剤がどの程度抑制できるかを評価した。

#### (4) 脳血管障害部位へのアクティブターゲティング法の開発：

虚血性疾患診断・治療における DDS 戦略に、次世代型アクティブターゲティング DDS を取り入れ、本戦略の展開を図った。脳神経細胞は EPO 受容体を発現しており、A-EPO リポソームはアクティブターゲティング能を兼ね備えている。そこで、A-EPO リポソームの体内分布に関して、A-EPO を直接[<sup>125</sup>I]標識することにより、虚血再灌流部位への集積を検討した。障害部位へのアクティブターゲティングが可能となれば、種々の創薬に応用が可能となり、飛躍的な発展が考えられる。

#### (5) 脳虚血・虚血再灌流障害の診断法の開発：

我々はリポソームや高分子ミセル等のナノ粒子を簡便に[<sup>18</sup>F]でポジトロン放出核種標識できる方法論を確立している(*J. Med. Chem.*, 50: 6454-6457, 2007)。リポソーム等のナノ粒子は BBB を透過できないため、正常な脳組織にはリポソームは蓄積せず、脳イメージングの際のバックグラウンドは極めて低く保たれる。さらに本標識法の最大のメリットは調製後のリポソームを標識できる点であり、これまでにそのようなポジトロン放出核種標識法は存在していない。そこで、A-EPO リポソーム製剤を調製後にポジトロン放出核種標識を行い、脳虚血再灌流モデルラットを用いた虚血再灌流部位のイメージングへの応用を検討した。すなわち基礎検討で得られた虚血再灌流時の脳障害の時間経緯に合わせたイメージング像の変化を詳細に検討し、脳虚血・虚血再灌流の診断、および治療効果の評価が可能となる PET 製剤の開発を目指した。

#### (6) 脳標的化 DDS を利用した低コスト脳梗塞治療薬の開発：

上記の研究が予想以上に進展したので、A-EPO 以外の低コスト低分子を用いた脳梗塞治療薬の開発研究に発展させた。すなわち、低分子として FK506 などの脳保護効果の知られる薬剤をリポソーム化し、上記と同様な検討を行った。これにより標的化 DDS が、受容体への結合を利用した A-EPO に限らず、広く応用可能であることを証明すると同時に、低コスト脳梗塞治療薬の開発にも道を開くこととなる。

### 4. 研究成果

#### (1) 虚血再灌流障害診断・治療用 DDS キャリアの開発：

栓子法による一過性中大脳動脈閉塞

(t-MCAO)モデルラットにおける脳細胞死を、TTC 染色により確認した。TTC 染色では生細胞は赤褐色を呈し、傷害された細胞は白色のままである。1 時間の虚血後再灌流し、TTC 染色を行った。その結果、3 時間以降に脳細胞死が現れることが明らかとなった。一方 100 nm にサイジングした PEG 化リポソームの再灌流後における血管外集積は、投与直後から虚血コアで観察された。

#### (2) アシアロエリスロポエチン DDS 製剤の開発：

A-EPO のリポソーム修飾は、PEG 先端に NHS を結合した DSPE-PEG-A-EPO を用いて行い、リポソームに post-insertion した(図 1)。

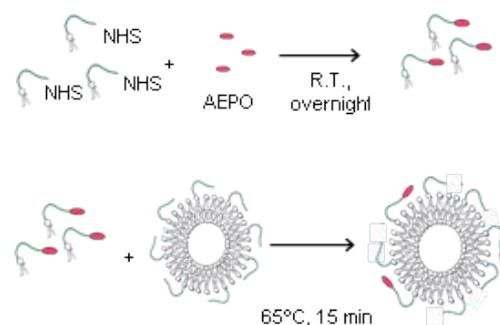


図 1 A-EPO リポソーム調製法の概略

A-EPO に細胞保護効果があるかどうか、さらにリポソーム化により活性が保たれるかどうかについてインビトロで検討した。まず PC12 細胞を神経成長因子 (NGF) 存在下で 5 日間培養し、神経様細胞に分化させた PC12 細胞を用いる。NGF で PC12 神経様細胞に分化させた。この細胞は 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。ここに遊離の A-EPO あるいは A-EPO リポソームを添加し、細胞死の抑制を観察した。その結果、A-EPO リポソームは遊離の A-EPO と同程度に PC12 の細胞死を抑制した。この結果はリポソーム A-EPO が、脳細胞死の抑制に働く可能性を示唆している。

#### (3) A-EPO リポソーム製剤の薬理活性の検討：

次に、t-MCAO モデルラットを用いて、1 時間虚血後に再灌流させ、再灌流直後に A-EPO リポソームを投与した時の虚血再灌流障害抑制について検討した。その結果、虚血部位のコアである線条体において、コントロールの PBS 投与群で多くのアポトーシス細胞が観察される一方、A-EPO リポソーム処理群では TUNEL 陽性細胞の優位な減少が観察された。非虚血側の線条体では TUNEL 陽性細胞は見られなかった。

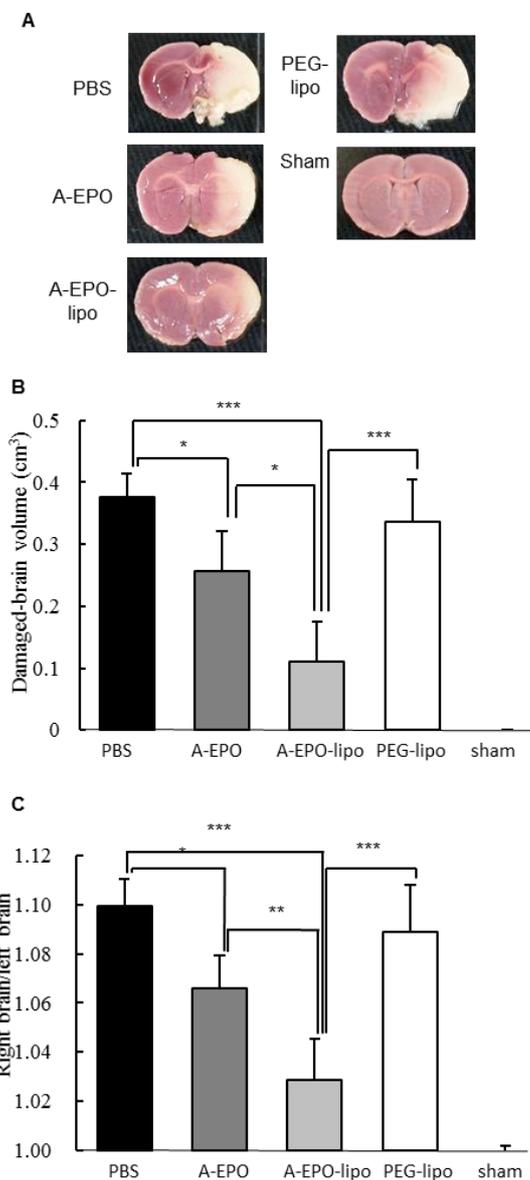


図2 A-EPO リポソームによる虚血再灌流障害の抑制 (J. Control. Release 160: 81-87, 2012 一部改変) :

図5の検討と同様に、t-MCAOモデルラットを用い、1時間虚血後、再灌流し、直後にA-EPOリポソームを投与した。虚血から24時間後に脳切片を作成しTTC染色を行った。Aは虚血コアである線条体を含む切片のTTC染色像である。B傷害容積とC浮腫は、全切片のイメージから求めた。アスタリスクは有意差(\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)を示す。

次に同様の処理により、脳切片で見られる脳細胞死をTTC染色により確認した。図2に示すようにA-EPOリポソーム投与群では脳細胞死が抑えられることが明らかとなった。定量的にもA-EPOリポソームが有意に脳細胞死を抑制していること、虚血側半球における浮腫も有意に抑制していることが明らかとなった。

またA-EPOリポソーム製剤を用いて、t-MCAOモデルラットにおける運動機能障害をA-EPOリポソーム製剤がどの程度抑制できるかを評価した。運動機能障害は脳梗塞の

後遺症評価に繋がるものと考えられる。評価には運動スコア(21点満点)を用いた。

図3に示すように、虚血1時間後に再灌流を行い、直後にA-EPOリポソームを投与した。1回の投与にもかかわらず、日を追って運動機能の回復が見られた。

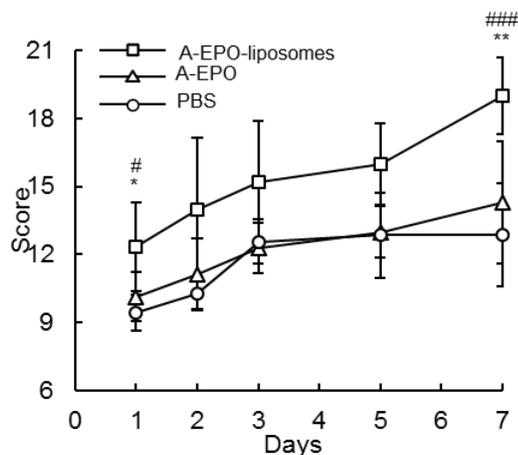


図3 A-EPO リポソームによる運動機能低下の改善(Int. J. Pharm. 439: 269-274, 2012 一部改変) :

t-MCAOモデルラットを用い、1時間虚血後、再灌流し、直後にA-EPOリポソームを投与した。虚血から1,2,3,5,7日後にスコア法により運動機能を測定した(n=7)。アスタリスクはA-EPO投与群に対する有意差(\*p<0.05, \*\*p<0.01)を示し、#は対照群(PBS投与群)に対する有意差(#p<0.05, ###p<0.001)を示す。

#### (4) 脳血管障害部位へのアクティブターゲティング法の開発 :

A-EPOリポソームは、それ自体で受容体を標的とするアクティブターゲティングツールの役目を果たしていると考えられる。そこで、A-EPOリポソーム体内分布に関して、[I-125]A-EPOを用い、虚血再灌流部位への集積を検討した。その結果、A-EPOに対してリポソーム化A-EPOは血中滞留性が有意に高く、また脳内分布では、虚血部位に集積することが明らかとなった。

次に脳内の分布について Dil-C<sub>18</sub> 蛍光標識

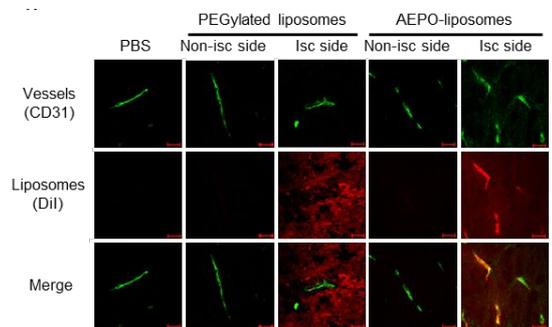


図4 リポソームの脳内分布(Int. J. Pharm. 439: 269-274, 2012 一部改変) :

虚血1時間後に再灌流したt-MCAOモデルラットにリポソームを投与し、3時間後に凍結切片を作成した。緑は脳内の血管、赤はリポソームの分布を示す。

リポソームを用いて検討した。また血管の位置を知るために CD31 抗体を用いて二重染色を行った。図 4 には脳切片におけるリポソームの分布を示した。虚血再灌流時に BBB が破綻するために、100 nm 径のリポソームは虚血部位の組織に集積することが確認された。PEG リポソームは血管周辺に漏れ出すのに対し、A-EPO リポソームは血管に共局在しているものが多くみられた。血管にエリスロポエチン受容体が発現しているためと考えられる。次により詳細に脳内分布を知るために、神経細胞を NeuN 抗体で染色した。その結果虚血コアである線条体において、リポソームが脳虚血部位に集積し、神経細胞周辺に分布していることが明らかとなった。

#### (5) 脳虚血・虚血再灌流障害の診断法の開発：

ポジトロン放出核種で標識したリポソームを用いることにより脳虚血部位のイメージングが可能かどうかについて検討した。[F-18]でリポソームを標識し、虚血 1 時間後に投与し、そのまま再灌流を行わずに 2 時間 PET 測定を行った。リポソーム等のナノ粒子は BBB を透過できないため、正常な脳組織にはリポソームは蓄積せず、脳イメージングの際のバックグラウンドは極めて低く保たれると考えられる。実際には、脳虚血側半球では、虚血による血流低下のために、PET 解析によるポジティブ造影は得られなかった。

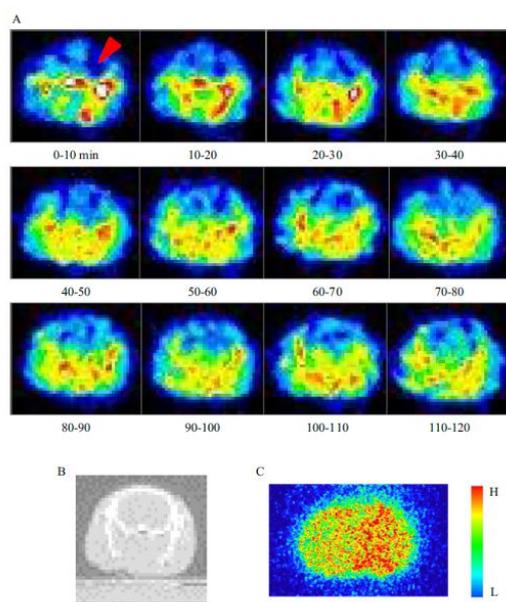


図 5 [F-18]標識リポソームを用いた脳梗塞イメージングの試み(Artif. Organs 38: 662-666, 2014)

permanent-MCAO(p-MCAO)モデルラットを用い、虚血 1 時間後に[F-18]標識リポソームを尾静脈より投与した。その後 2 時間 PET 測定を行った。B は画像に対応する CT 画像、C は 2 時間後に脳切片を調製し、Bioimaging analyzer により得られたオートラジオグラム。

興味あることに虚血を続けて 3 時間後に脳切片のオートラジオグラム(図 5c)を得ると、虚血側でリポソームの蓄積が見られた。そこで関心領域(ROI)を設け、リポソームの集積の時間 放射活性曲線(Time-activity curve)を求めた。その結果、非虚血側では初期に放射活性の増加が見られるが、その後は緩やかな増加にとどまっていた。一方虚血側では、初期の値は低いが、連続して放射活性が増加し、測定開始 2 時間後(虚血 3 時間後)では、虚血であるにもかかわらず、非虚血側と同等な放射活性を示した。これは、リポソームが虚血部位に集積したことを示唆している。すなわち虚血時にも低分子のリポソームは、少ない血流により、脳内に運ばれたことを示唆した。

#### (6) 脳標的化 DDS を利用した低コスト脳梗塞治療薬の開発：

上記の研究が予想以上に進展したので、A-EPO 以外の低分子を用いた脳梗塞治療薬の開発研究に発展させることとした。薬剤としては、より早く本研究成果を臨床に結び付けるために、すでに市販されている薬剤で脳保護効果のあるものを選定することとした。FK506 はカルシニューリンの作用を抑え、脳梗塞時にカルシウムシグナリングを抑えることで、脳保護効果を示すことが予想される。そこで、FK506 をリポソームに組み込み、t-MCAO モデルラットを用いた検討を開始した。その結果 FK506 リポソームにおいても、虚血再灌流障害を抑え、脳細胞死の抑制、運動能低下の抑制が見られた。

以上より、リポソーム DDS は脳梗塞治療に有効であることが栓子法モデルラットにおいてではあるが、明らかとなった。今後は本研究をさらに発展させ、臨床研究に至る基盤を構築したいと考えている。

#### 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 11 件)

(1) Tatsuya Fukuta, Takayuki Ishii, Tomohiro Asai, Genki Nakamura, Yoshihito Takeuchi, Akihiko Sato, Yurika Agato, Kosuke Shimizu, Shuji Akai, Dai Fukumoto, Norihiro Harada, Hideo Tsukada, Akira Kawaguchi, Naoto Oku. (査読有) Real-time trafficking of PEGylated liposomes in the rodent focal brain ischemia analyzed by positron emission tomography. Artif Organs. 38: 662-666. (2014) .

(2) Takayuki Ishii, Tatsuya Fukuta, Yurika Agato, Dai Oyama, Nodoka Yasuda, Kosuke Shimizu, Akira Kawaguchi, Tomohiro Asai,

Naoto Oku. (査読有) Nanoparticles accumulate in ischemic core and penumbra region even when cerebral perfusion is reduced. *Biochem Biophys Res Commun.* 430: 1201-1205 (2013).

(3) Takayuki Ishii, Tomohiro Asai, Dai Oyama, Yurika Agato, Nodoka Yasuda, Tatsuya Fukuta, Kosuke Shimizu, Tetsuo Minamino, Naoto Oku. (査読有) Treatment of cerebral ischemia- reperfusion injury with PEGylated liposomes encapsulating FK506. *FASEB J.* 27:1362-1370 (2013).

(4) Takayuki Ishii, Tomohiro Asai, Tatsuya Fukuta, Dai Oyama, Nodoka Yasuda, Yurika Agato, Kosuke Shimizu, Tetsuo Minamino, Naoto Oku. (査読有) A single injection of liposomal asialo-erythropoietin improves motor function deficit caused by cerebral ischemia/ reperfusion. *Int J Pharm.* 439:269-274 (2012).

(5) Takayuki Ishii, Tomohiro Asai, Dai Oyama, Tatsuya Fukuta, Nodoka Yasuda, Kosuke Shimizu, Tetsuo Minamino, Naoto Oku. (査読有) Amelioration of cerebral ischemia-reperfusion injury based on liposomal drug delivery system with asialo-erythropoietin. *J Control Release* 160: 81-87 (2012).

〔学会発表〕(計 26 件)

(1) Tatsuya Fukuta, Hiroyuki Koide, Yu Hoshino, Yoshiko Miura, Kenneth J. Shea, Naoto Oku: Development of anti-high mobility group box-1 synthetic polymer nanoparticles for the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury. 248<sup>th</sup> American Chemical society National Meeting & Exposition (San Francisco, US) 2014 年 8 月 12 日

(2) Tomohiro Asai, Tatsuya Fukuta, Takayuki Ishii, Akihiko Sato, Takashi Kikuchi, Kosuke Shimizu, Hideo Tsukada, Naoto Oku: The design of a liposomal delivery system for the treatment of ischemic stroke. *Liposome Research Days 2014* (Copenhagen, Denmark) 2014 年 8 月 6 日

(3) Tatsuya Fukuta, Tomohiro Asai, Akihiko Sato, Yurika Agato, Kosuke Shimizu, Hideo Tsukada, Naoto Oku: Liposomal drug delivery system for the treatment of ischemic stroke before restoration of cerebral blood flow. *International Liposome Society 2013 Meeting Liposome Advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery* (London, UK) 2013 年 12 月 14 日

(4) Yurika Agato, Takayuki Ishii, Dai Oyama, Nodoka Yasuda, Tatsuya Fukuta, Akihiko

Sato, Kosuke Shimizu, Tomohiro Asai, Tetsuo Minamino, Naoto Oku: Neuroprotective Effect of PEGylated Liposomes Encapsulating FK506 on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury. 40<sup>th</sup> Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Honolulu, US) 2013 年 7 月 21 日

(5) Takayuki Ishii, Tomohiro Asai, Dai Oyama, Yurika Agato, Nodoka Yasuda, Tatsuya Fukuta, Kosuke Shimizu, Tetsuo Minamino, Naoto Oku: Development of PEGylated liposomes encapsulating FK506 for the treatment of cerebral ischemia/ reperfusion injury. *Liposome Research Days 2012* (Hangzhou, China) 2012 年 10 月 9 日

(6) Tatsuya Fukuta, Takayuki Ishii, Tomohiro Asai, Dai Oyama, Nodoka Yasuda, Kosuke Shimizu, Tetsuo Minamino, Naoto Oku: Treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury with asialoerythropoietin -modified PEGylated liposomes. *Liposome Research Days 2012* (Hangzhou, China) 2012 年 10 月 9 日

(7) 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

〔その他〕総説

(1) 石井 貴之、奥 直人：リポソーム薬剤送達システムによる脳預血/再灌流障害治療戦略ファインケミカル 42, 33-38 (2013)

(2) 奥 直人：がん及び虚血性疾患克服を目指したリポソーム DDS 研究

*Drug Delivery System* 27, 299-305 (2012)

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：1 0 1 6 7 3 2 2

(2)研究分担者

清水 広介 (SHIMIZU, Kosuke)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：3 0 4 2 3 8 4 1

武田 厚司 (TAKEDA, Atsushi)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：9 0 1 4 5 7 1 4