

令和元年8月29日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05081

研究課題名(和文)脳梗塞治療を革新するスマートDDS製剤FA-Snapの創製

研究課題名(英文)Development of FA-Snap, a smart DDS drug, for proposing an innovative therapeutic modality of ischemic stroke.

研究代表者

奥直人(OKU, Naoto)

帝京大学・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) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞は脳血管疾患の約6割を占め、臨床では組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)製剤による血栓溶解療法が行われるが、治療可能時間(TTW)が短く適応患者は限定される。我々はこれまでに、脳梗塞時にナノ粒子が病巣部位へ移行すること、再灌流後早期からのリポソームDDSによる脳保護薬デリバリーが脳虚血/再灌流障害の治療に有用であることを示唆してきた。本研究では、リポソーム製剤により、t-PAのTTWを延長できる可能性を示すこと、リポソーム内封薬としてFasudilの有用性を示すこと、リポソームにPDGFR阻害プローブを結合し、リポソーム製剤の有用性を高めることを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳血管障害は我が国の死因別死亡率第4位、要介護5に至る疾患第1位であるが、その6割を占める脳梗塞治療に関して世界的に認められる治療薬は組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)のみである。超高齢社会にあって効率的な治療薬あるいはt-PAの治療可能時間を延長できる薬剤に対する期待は大きく、本研究の成果は重要な学術的意義および社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：Ischemic stroke is a leading cause of severe disability and death in the world. Tissue plasminogen activator (t-PA) for thrombolytic therapy is the only approved therapeutic agent worldwide. However, patients received t-PA therapy are extremely limited due to the narrow therapeutic time window (TTW). Hence, development of effective therapies has been most desirable. Our previous studies revealed that nano-sized liposomes can accumulate in the ischemic region and that liposomal delivery of neuroprotective agents should be effective for the treatment of cerebral I/R injury. In the present study, we would like to demonstrate that combination treatment of t-PA with liposomal neuroprotectants could prolong its TTW, to clarify the effectiveness of Fasudil as the liposomal drug, and to develop the useful targeting probe for the liposomal medicine.

研究分野：薬物送達学

キーワード：脳梗塞治療 リポソーム 薬物送達システム ファスジル 組織プラスミノゲン活性化因子 虚血性疾患 脳血管疾患 DDS

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は我が国の死因別死亡率第4位の疾患であり、また要介護5に至る患者数第1位の疾患である。脳血管疾患の約6割は虚血性疾患(脳梗塞)で、約4割が出血性疾患である。我々は、虚血時には血管透過性が亢進し、Enhanced permeability and retention (EPR)効果によりナノ製剤が虚血部位に集積することを明らかとし、虚血性疾患治療のためのリポソームDDS製剤の開発研究を進めてきた。具体的には、脳梗塞を改善するリポソーム化ヘモグロビンがラット脳虚血再灌流モデルにおいて虚血部位に送達されること(*Artif. Organs*, 2009)、血管透過性亢進は、脳虚血再灌流直後し (*Brain Res.*, 2010)、脳細胞保護効果を有するアシアロエリスロポエチン修飾リポソームが脳虚血再灌流後に、脳細胞死の抑制等を示すこと(*J. Control. Release*, 2012)、および虚血再灌流後のラット運動能低下を改善すること(*Int. J. Pharm.*, 2012)を見出した。またFK506リポソーム化製剤においても、虚血再灌流障害を顕著に抑制すること(*FASEB J.*, 2013)、脳梗塞時でも虚血部位にリポソームが到達すること(*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013)を明らかとした。一方、臨床においては、脳梗塞時に組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)投与の有効性が示されているが、治療可能時間(therapeutic time window, TTW)の制限などから、適用患者は5%程度に限られる。本研究は脳梗塞治療の臨床応用を見据え、脳梗塞時に効率的に脳保護効果を有し、またt-PAのTTWを拡大しうるDDS製剤の開発基盤構築を目指すものである。

2. 研究の目的

本研究では、脳梗塞治療用DDS製剤として脳梗塞患部の微細環境を認識して特異的に集積し、脳梗塞の増悪化を抑制するとともに、同部位での薬剤の放出制御が可能なスマートリポソームの開発を目的とした。薬剤としてはRho associated kinase (ROCK)の阻害により脳保護効果を発揮するFasudilを用いた。Fasudilは、くも膜下出血後の脳血管攣縮抑制薬として保険適用されており、脳虚血に伴う血管内皮障害や微小循環障害の改善、t-PAによる脳出血リスクの軽減など、脳梗塞に対する有効性が多数報告されていることから適用範囲が広く、また脳梗塞に対する臨床試験も行われていたことから、安全性に関しても多くの情報が蓄積されている。また標的化プローブとしては、ドミナントネガティブ血小板由来増殖因子(PDGF)を用いる。脳梗塞時にはPDGFとその受容体が高発現するため、この受容体を標的とすることでアクティブターゲティング効果を発揮すると同時に、微小環境に存在するPDGF結合の阻害により脳梗塞の増悪化を抑制できると考えた。これまでに申請者らは、虚血性疾患においてDDSナノ製剤が有効に働くことを報告してきた。具体的にはラット脳虚血再灌流モデルにおいて、細胞保護効果を有するリポソーム製剤が再灌流直後から虚血部位に集積し、脳細胞死・虚血再灌流障害を抑制することを明らかとした。本研究では、臨床応用可能な薬剤を用い、さらに脳梗塞患部の微小環境を認識して集積し、薬剤の放出制御を可能とする製剤の開発を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、(1)臨床の病態を反映しt-PAにより再灌流可能なモデルの構築、(2)Fasudilのリポソーム化および脳梗塞治療効果の検討、(3)脳梗塞微小環境を認識するリポソームの構築、を行い、最終的にスマートリポソームによる脳梗塞治療効果を示すことを目的とした。

(1)t-PAにより再灌流可能なモデルの構築に関しては、PITモデル(Photochemically-induced thrombosis model)を用いた。PITモデルの作製はローズベンガルを静脈内投与後、中大脳動脈をレーザー照射することにより構築した。このモデルを用い、t-PA処理の有無、t-PA処理までの梗塞時間の変化による脳障害について評価した。具体的には脳切片のTTC染色による障害の確認、共焦点レーザー顕微鏡を用いた虚血再灌流部位での蛍光標識リポソームの脳組織内分布とTUNEL法による脳細胞死の確認等を行った。

(2)Fasudilリポソームに関しては、リポソーム内水相を硫酸アンモニウム溶液とし、リモートローディング法によりFasudilがリポソームに内封できることを明らかとし、Fasudil内封率および放出挙動を検討した。さらにFasudil内封リポソーム製剤が虚血性疾患に有用であるかどうかを、PITモデルにより検討した。すなわちt-PA投与前および投与後にFasudil-Lipを投与し、血流、脳細胞死、脳障害等に関して検討した。

(3) 脳梗塞部位の微小環境認識プローブの開発に関しては、脳梗塞増悪化に關与するPDGFR α に親和性のあるPDGF-AAのドミナントネガティブ体DNPDGF-AAを遺伝子工学手法により構築した。得られたDNPDGF-AAを、PEG修飾リボソームのPEG先端に結合し、PDGF-AAに対する結合阻害等の検討を行うことを目的とした。

4. 研究成果

(1) PIT モデルラットにおけるリボソームの挙動解析：これまで脳梗塞からの血流再開後にリボソームによって脳保護薬をデリバリーすることで、脳虚血/再灌流障害を抑制できることを示してきた。一方、臨床における脳梗塞時のニーズとして、脳虚血/再灌流障害の克服に加え、標準治療である t-PA 製剤による脳への有害作用の緩和と、TTW の延長が挙げられる。脳梗塞時の BBB の透過性亢進は、再灌流後のみならず虚血時においても生じることが報告されていることから、t-PA による血流再開前の虚血後早期よりリボソームを用いて脳保護薬を送達することで、BBB および脳組織の保護が可能となれば、t-PA の有害作用や再灌流障害の抑制、および TTW の延長が期待できる。t-PA を用いた再灌流を再現できる脳梗塞モデルとして Photochemically induced thrombosis (PIT) 法による MCAO ラットを導入し、リボソーム製剤と t-PA の併用療法の有用性を明らかとすべく、検討を行った。まず PIT 法による MCAO ラットにおいて、リボソームによる虚血部位への脳保護薬送達が可能かどうかを検討した。粒子径約 100 nm の蛍光標識した PEG リボソームを梗塞後各時間に静脈内投与し、その 1 時間後の脳内分布を in vivo imaging system により解析した。加えて、脳障害の程度を TTC 染色により観察した。その結果、栓子法による MCAO ラットにおける検討に類似して、TTC 染色による顕著な傷害が認められる以前から、虚血側半球におけるリボソームの集積が認められた。

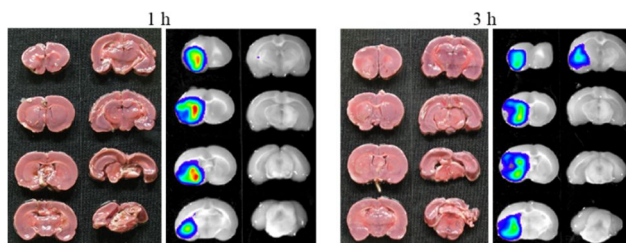


図1 脳梗塞PIT法モデルにおける脳組織傷害(左: TTC染色)とリボソーム集積(右)

(2) リボソーム製剤と血栓溶解剤の併用療法：脳保護薬搭載リボソームと t-PA の併用効果を検討するにあたり、脳保護薬として脳梗塞治療への有用性が報告され、臨床試験第III相まで進んだ背景もある Rho-kinase 阻害剤ファスジル (Fasudil) を用いた。まず、t-PA 処置による BBB の透過性への影響と、リボソーム化ファスジル (Fasudil-Lip) の血管保護効果について検討した。また、Fasudil-Lip は虚血 1 時間後に静脈内投与し、BBB の透過性は脳を摘出する 1 時間前に静脈内投与したエバンスブルーの脳実質への漏出量を指標に評価した。その結果、虚血 6、24 時間後において、t-PA によって BBB の透過性亢進が認められた一方、Fasudil-Lip 併用群では 6 時間後においてその亢進が抑制されている傾向が観察され、24 時間後においては有意に抑制されていた。また、MMP-2、-9 の活性を組織学的に観察したところ、t-PA 処置によって広域にわたる活性の増大が認められた。一方、Fasudil-Lip の併用により、特に虚血コアより離れた周辺領域において MMP の活性が抑制された。これらの結果から、Fasudil-Lip の併用によって、t-PA により誘発される脳出血性の増大が抑制できることが示唆された。また同領域においては、脳梗塞急性期の炎症への関与が特に報告されている好中球の浸潤が抑制されている様子も観察された。次に、t-PA/Fasudil-Lip 併用療法による治療効果を評価したところ、虚血 24 時間後において併用投与群は各単独投与群と比較して有意に脳細胞傷害を抑制した。さらに、t-PA の投与時間を虚血 3 時間後から 4.5 時間後と遅くした場合においても t-PA/Fasudil-Lip 併用群は有意に高い脳保護効果を示し、PIT モデルにおいて 2 時間後程度と同定された t-PA の TTW が 4.5 時間となり、少なくとも 2 時間以上延長できる可能性が示された。これらの結果から、t-PA 処置前からのリボソームによる脳保護薬送達によって、臨床における t-PA 療法の問題を改善できる可能性が示され、リボソーム DDS 製剤と血栓溶解剤の併用療法が脳梗塞治療に有用であることが示唆された。

(3) スマートリボソームに向けたプローブの開発： 脳梗塞部位では、PDGF の遊離、PDGF 受容体の発現亢進が報告されている。さらに PDGF の PDGFR α への結合が虚血による障害を増悪化すること、および PDGF-AA は脳保護効果を示す PDGFR β には結合しないことが知られてい

る。さらに PDGF-AA のドミナントネガティブ(DN)体は、PDGF-CC/PDGFR α シグナルを阻害することで t-PA 誘発の脳出血を抑制することに加え、抗体や機能性ペプチドに代わる新たなターゲティングツールとして有望である可能性がある。PDGF-AA は細胞内で furin により活性体にされる。そこで PDGF-AA の cDNA が組み込まれたプラスミドの一部塩基を置換することで PDGF-AA のアミノ酸残基中の furin の認識部位に変異を導入し、PDGFR α の活性化を起こさない DN-PDGF-AA を作製した。得られた DN-PDGF-AA の PDGFR α の阻害能を評価した。DN-PDGF-AA は PDGFR α の発現量に影響を与えなかったが、DN-PDGF-AA は PDGF-AA に対して 10 倍の濃度で PDGFR α のリン酸化を阻害する傾向が見られ、本プローブが有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- Fukuta T, Ishii T, Asai T, Oku N. Applications of liposomal drug delivery systems to develop neuroprotective agents for the treatment of ischemic stroke. *Biol Pharm Bull.* 42, 319-326 (2019).
- Narita Y, Shimizu K, Ikemoto K, Uchino R, Kosugi M, Maess MB, Magata Y, Oku N, Ogawa M: Macrophage-targeted, enzyme-triggered fluorescence switch-on system for detection of embolism-vulnerable atherosclerotic plaques. *J Control Release.* 302,105-115 (2019).
- Fukuta T, Yanagida Y, Asai T, Oku N: Co-administration of liposomal fasudil and tissue plasminogen activator ameliorated ischemic brain damage in occlusion model rats prepared by photochemically induced thrombosis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 495, 873-877 (2018).
- Fukuta T, T Asai T, Yanagida Y, Namba M, Koide H, Shimizu K, Oku N: Combination therapy with liposomal neuroprotectants and tissue plasminogen activator for treatment of ischemic stroke. *FASEB J*, 31, 1879-1890 (2017).
- Fukuta T, Asai T, Ishii T, Koide H, Kiyokawa C, Hashimoto M, Kikuchi T, Shimizu K, Harada N, Tsukada H, Oku N: Non-invasive evaluation of neuroprotective drug candidates for cerebral infarction by PET imaging of mitochondrial complex-1 activity. *Sci. Rep.*, 6, 30127 (2016).
- Okuda K, Fu HY, Matsuzaki T, Araki R, Tsuchida S, Thanikachalam PV, Fukuta T, Asai T, Yamato M, Sanada S, Asanuma H, Asano Y, Asakura M, Hanawa H, Hao H, Oku N, Takashima S, Kitakaze M, Sakata Y, Minamino T: Targeted therapy for acute autoimmune myocarditis with nano-sized liposomal FK506 in rats. *PLoS One*, 11, e0160944 (2016).
- Fukuta T, Asai T, Sato A, Namba M, yanagida Y, Kikuchi T, Koide H, Shimizu K, Oku N: Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by intravenous administration of liposomal fasudil. *Int. J. Pharm.*, 506, 129-137 (2016).

〔学会発表〕(計 16 件)

- 山本裕和、柳田洋翼、奥 直人、浅井知浩：脳梗塞モデルラットを用いた血栓溶解療法における Fasudil-Lip の脳保護効果の解析。日本薬学会第 33 年会 2018 年 5 月 13 日 (静岡)
- Naoto Oku: Application of liposomal DDS for the treatment of ischemic stroke. Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society – DPhG. 2017 年 9 月 26 日 (Saarbrücken Germany)
- Naoto Oku, Tatsuya Fukuta, Hiroyuki Koide, Kosuke Shimizu, Tomohiro Asai: Usefulness of liposomal neuro-protectants for the treatment of ischemic stroke. Liposome Advances Progress in Drug and Vaccine Delivery 2017 年 9 月 18 日 (Athens Greece)
- Yosuke Yanagida, Tatsuya Fukuta, Tomohiro Asai, Kosuke Shimizu, Hiroyuki Koide, Naoto Oku: Combination therapy with liposomal fasudil and tissue plasminogen activator for ischemic stroke treatment. Liposome Advances Progress in Drug and Vaccine Delivery 2017 年 9 月 16 日 (Athens Greece)
- 福田達也、浅井知浩、奥 直人：リポソーム DDS 製剤と血栓融解剤併用による新規脳梗塞治療法の開発。第 26 回 DDS カンファランス 2017 年 9 月 1 日 (静岡)
- Kosuke Shimizu, Yudai Narita, Marten Maess, Yasuhiro Magata, Mikako Ogawa, Naoto Oku: Development of enzyme-specific, macrophage-targeted near-infrared fluorescence probe for easy diagnosis of atherosclerosis. Controlled Release Society 2017 Annual Meeting 2017 年 7 月 17 日 (Boston USA)

清水広介、成田雄大、Marten Maess、外村和也、間賀田泰寛、奥 直人、小川美香子：マクロファーシ標的化蛍光プローブによる動脈硬化不安定プラークの検出. 2017年5月13日（大宮）

奥 直人：脳梗塞を標的とした DDS 製剤の開発. 第 2 回生物構造学研究会 2017 年 3 月 29 日（東京）

福田達也、柳田洋翼、浅井知浩、奥 直人：リポソーム化脳保護薬と血栓溶解剤の併用による脳梗塞治療. 日本薬学会第 137 年会 2017 年 3 月 27 日（仙台）

Tatsuya Fukuta, Yosuke Yanagida, Tomohiro Asai, Naoto Oku: Treatment of ischemic stroke by combination therapy with liposomal neuroprotectants plus tissue plasminogen activator. The 12th China-Japan Symposium on Health Sciences. 2017 年 2 月 10 日 (Hangzhou, China)

Chiaki Kiyokawa, Hiroyuki Koide, Kenneth J. Shea, Naoto Oku: Development of synthetic polymer nanoparticles interacting with HMGB1 for the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury. AAPS Annual Meeting and Exposition 2016 年 11 月 15 日(Denver, USA)

Tatsuya Fukuta, Yosuke Yanagida, Tomohiro Asai, Naoto Oku: Combination therapy with liposomal neuroprotective agents plus tissue plasminogen activator for the treatment of ischemic stroke. AAPS Annual Meeting and Exposition 2016 年 11 月 14 日 (Denver, USA)

奥 直人：血管障害の診断・治療における DDS 製剤の有用性. オレオナノサイエンス部会シンポジウム 2016 年 11 月 13 日（東京）

福田達也、浅井知浩、原田典弘、塚田秀夫、奥 直人：Mitochondrial Complex-1 活性の PET 解析による DDS 製剤の脳保護効果評価. 第 16 回放射性医薬品・画像診断薬研究会 2016 年 10 月 1 日（京都）

清川千秋、小出裕之、沖嶋杏奈、星野 友、三浦佳子、Kenneth J. Shea、奥 直人：HMGB1 に親和性を示す合成ポリマーナノ粒子の脳虚血再灌流障害治療への応用. 第 10 回 QCM 研究会 2016 年 8 月 26 日（東京）

奥田啓二、松崎高志、富 海英、土田翔太、荒木 亮、山戸昌樹、福田達也、浅井知浩、奥 直人、南野哲男：リポソーム化免疫抑制剤による心筋炎治療. 第 32 回日本 DDS 学会学術集会 2016 年 7 月 1 日（静岡）

〔図書・総説〕(計 4 件)

福田達也、浅井知浩、奥 直人：リポソーム DDS 製剤と血栓溶解剤併用による新規脳梗塞治療法の開発. *Progress in Drug Delivery System* 24, (2017).

Naoto Oku: Innovations in Liposomal DDS Technology and Its Application for the Treatment of Various Diseases . *Biol. Pharm. Bull.* 40, 119-127 (2017).

福田達也、浅井知浩、奥 直人：脳梗塞治療におけるリポソーム DDS 製剤の有用性 . オレオサイエンス、17, 359-366 (2017).

福田達也、奥 直人：リポソーム DDS を用いた脳梗塞治療薬の開発. *人工血液*, 24, 48-55 (2016).

〔産業財産権〕出願状況（計 0 件）

〔その他〕

<https://www.e-campus.gr.jp/staffinfo/public/staff/detail/3247/16>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：浅井 知浩

ローマ字氏名：(ASAI, Tomohiro)

所属研究機関名：静岡県立大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号（8 桁）: 00381731

(2)研究分担者

研究分担者氏名：清水 広介

ローマ字氏名：(SHIMIZU, Kosuke)

所属研究機関名：浜松医科大学

部局名：光先端医学教育研究センター

職名：准教授

研究者番号(8桁): 30423841

(3)研究分担者

研究分担者氏名：小出 裕之

ローマ字氏名：(KOIDE, Hiroyuki)

所属研究機関名：静岡県立大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 60729177

(4)研究分担者

研究分担者氏名：馬渡 健一

ローマ字氏名：(MAWATARI, Ken-ichi)

所属研究機関名：帝京大学

部局名：薬学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 70190577