

令和元年6月18日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01397

研究課題名(和文) 血液網膜関門を回避する低侵襲性網膜指向型核酸送達システムの構築

研究課題名(英文) Development of non-invasive retina-targeted siRNA delivery system for overcoming a blood-retina barrier

研究代表者

高島 由季 (Takashima, Yuuki)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70236214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：中途失明を起こす網膜疾患の原因となる新生血管因子(VEGF)の産生を阻害する核酸(sRNA)を低侵襲的な点眼投与で網膜へ送達し得るナノキャリアの設計を目的とした。網膜色素上皮細胞(RPE)をマウスに免疫し、種交叉性かつ内在化特性を示すモノクローナル抗体を作製した。これを多機能性ペプチドや脂質ナノ粒子に修飾したナノキャリアは、脈絡膜からRPEへの移行が期待される微小粒子径を示し、ラットRPE細胞への高い取込み効率、抗VEGF-siRNAの搭載により顕著なVEGF産生抑制効果を示した。また、点眼後のラット網膜において高い集積性がみられ、点眼による網膜への核酸送達キャリアとしての有用性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

眼には血液網膜関門等の高度なバリア機能が在るため、網膜への薬物送達は容易ではなく、中途失明や視力低下を起こす網膜疾患に対しては硝子体内への直接注射等の侵襲的な薬物治療がなされる。本研究において、標的とする網膜に指向性を示すモノクローナル抗体を組み込んだ微小キャリアを設計し、通常困難とされる点眼投与によって病因タンパク質の産生を細胞レベルで阻害する核酸の送達が可能であることを明らかとした。本研究での知見は患者の身体的・精神的負担を軽減する薬物治療への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)： The objective is to prepare the non-invasive retina-targeted nanocarriers for siRNA delivery to suppress the production of vascular endothelium growth factor which cause retina disease leading to late-blindness. The monoclonal antibody (mAb) which has specific internalizing ability to retinal pigment epithelium (RPE) was produced and followed by modification to liposomes which encapsulate complexes of siRNA and multifunctional peptide. The mAb-modified liposome shows small particle size which is permeable to retina through choroid. In addition, the mAb-liposomes was extremely accumulated in the isolated retinal membrane by eye drop to rat.

研究分野：製剤設計学、薬物送達学

キーワード：siRNA delivery リポソーム モノクローナル抗体 網膜 点眼

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、高齢者の約 40%が網膜疾患に罹患し、失明や視力低下により不自由な生活を強いられている。中でも失明原因上位の加齢黄斑変性症は、加齢に伴う網膜機能の低下により惹起される脈絡膜新生血管の発生・伸展により網膜が障害される疾患である。網膜は、ヒトが形や色等を認識するための重要な組織であり、角膜や血流を介した眼内への物質流入を制限する強固なバリア機能(血液網膜関門、血液房水関門、角膜バリア)によって保護されている。また、一般的な点眼投与は、涙液による速やかな排出等により眼内特に前房から後房への薬物送達効率は極めて低い。このため、点眼剤、錠剤や静脈注射などの一般的な投与形態では網膜へ十分に薬を届けることは困難とされ、現在は、眼球に直接注射針を挿して硝子体内に薬物を注入する侵襲的な投与方法が有効な薬物療法となっている。加齢黄斑変性症の発症原因として新生血管形成が知られており、この新生血管を抑える抗血管内皮増殖因子(VEGF)作用を示す核酸医薬品(Pegaptanib、マクジェン®)および抗体医薬品(Ranibizumab、ルセンティス®)などが治療薬として用いられている。血液網膜関門等の眼内バリア機能の存在は、核酸医薬や抗体医薬などの水溶性かつ高分子量の薬物送達の障壁となっており、いずれの製剤も硝子体内への直接注射による頻回投与が適用される。硝子体内投与は、患者に身体的・精神的苦痛を与え得る極めて侵襲的な投与方法であるだけでなく、頻回注射による網膜剥離や感染症などの副作用のリスクも高く、非侵襲的な治療薬の開発が切望されている。

網膜の最外層に位置する網膜色素上皮(RPE)は、上皮細胞が強固な密着結合を形成し、血管が豊富な脈絡膜から網膜内部への物質移行を厳しく制限する血液網膜関門の一つであり、加えて加齢黄斑変性症などの新生血管を伴う網膜疾患の発症に関与する。これまでの検討で、RPEに多く発現するトランスフェリン受容体に着目し、脂質ナノ粒子(リポソーム)の表面にトランスフェリンを化学的に修飾し、さらに脈絡膜毛細血管板を通過し得る粒子サイズのキャリアとすることで、点眼投与によって、後眼部の脈絡膜およびRPEの近傍に選択的に核酸を送達可能であることを明らかにしている。また、アルギニン、ヒスチジン、システインのアミノ酸からなる独自の多機能性ペプチドが、新生血管因子等の病因タンパク質の産生を抑制する核酸を安定に保持し、標的細胞内に取り込まれた後のエンドソームからの脱出能、細胞内還元環境下での核酸放出機能を持つことを報告している。

### 2. 研究の目的

本研究では、網膜疾患の原因となる新生血管因子等の産生を阻害する核酸(siRNA)を、低侵襲的な点眼によって網膜へ特異的かつ効率的に送達し得るナノキャリアを構築することを最終目標とし、1)網膜上皮に発現する抗原受容体に対する内在化モノクローナル抗体の探索・選定、2)作製したモノクローナル抗体のRPE細胞に対する内在化能等の評価、3)モノクローナル抗体をリガントとした核酸搭載ナノキャリアの調製について検討し、RPE細胞への取り込み特性やラットへの点眼による網膜への移行性評価等を行った。

### 3. 研究の方法

平成28年度は、網膜指向型の内在化モノクローナル抗体を探索し、顕著な指向性を示す因子を同定・選定し、大量生成した。【方法】モノクローナル抗体の作製:ラット由来RPE細胞(RPE-J細胞)をマウスに免疫し、単離した脾臓細胞とミエローマ細胞を融合したハイブリドーマを作製した。培養上清(分泌された抗体を含む)にジフテリア毒素と抗体結合ドメインの融合タンパク質を混合し(イムノトキシン)標的細胞であるRPE-J細胞に添加し3日間培養後にイムノトキシンアッセイを行い、細胞障害性の高い抗体(内在化活性の高い抗体)を産生するハイブリドーマを選定した。選定したハイブリドーマについて、培養とイムノトキシンアッセイを繰り返してさらに特異性を示すハイブリドーマクローンを絞り込み、スケールアップした。限界希釈法により単一コロニーを形成させ、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選定した。培地を回収し、ハイブリドーマから分泌されるモノクローナル抗体のサブクラスをIsoStripにより判定した。精製後の抗体濃度はDC protein assay kitを用いて定量した。RPE-J細胞への抗原特異性の確認:RPE-J細胞およびヒト由来RPE細胞(ARPE細胞)を用い、作製した複数のモノクローナル抗体について、抗原受容体への特異性をフローサイトメトリーにて解析した。RPE-J細胞への取込み特性の評価:作製した複数のモノクローナル抗体について、イムノトキシンと混合して細胞に添加し、RPE-J細胞における取込み特性をフローサイトメトリーにて評価した。毒素を結合させたモノクローナル抗体が細胞内に取り込まれることで生じ得る細胞毒性(細胞生存率)をWST-1 assayにて測定し、IC50(50%細胞傷害濃度)を求め有効濃度を確認した。解析結果をもとにRPE-J細胞に対し特異的な結合能を示すモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選定し、大量培養後、本研究に用いるモノクローナル抗体として精製した。

平成29年度は、作製したモノクローナル抗体のRPE-J細胞に対する内在化能の検討、ならびに網膜指向型モノクローナル抗体を用いた核酸送達キャリアの設計を行った。【方法】点眼による網膜への送達経路を模するため、トランスウェルを用いてRPE-J細胞の単層膜を形成した。前述の本モノクローナル抗体からなるイムノトキシンをRPE-J細胞ならびにヒトARPE細胞の単層膜の頂端膜側または基底膜側に添加し、3日後の細胞生存率を測定し、内在化特性を評価し

た。次に、網膜を指向する核酸送達キャリアの設計を試みた。本研究で作製したモノクローナル抗体に、これまでに核酸送達への有用性を明らかとしている独自の多機能性ペプチド(アミノ酸配列: CH<sub>2</sub>R<sub>4</sub>H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>)を化学的に修飾し、モノクローナル抗体修飾ペプチドキャリアを調製した。ここでは、機能性ペプチドに含まれるシステインとモノクローナル抗体をジスルフィド結合で架橋させることで化学的修飾を行った。また、siRNA、機能性ペプチド、メトキシポリエチレングリコール-ポリカプロラクトン(MPEG-PCL)ブロックコポリマーからなる正電荷の高分子ミセルとモノクローナル抗体との複合体ナノキャリア、ならびにこれまでに点眼による後眼部移行性を報告している微小サイズのリポソーム(DOPE/CHEMS/DSPE-PEG-MALを成分とする)にモノクローナル抗体をジスルフィド結合により修飾したイムノリポソームの調製について条件検討を行った。得られたキャリアについて、粒子径、ゼータ電位等の物性評価を行い、RPE-J細胞における細胞内取込み特性をフローサイトメトリーで評価した。

平成30年度は、前年度までに作製したナノキャリアに抗VEGF作用を示すsiRNA(siVEGF)を搭載し、RPE-J細胞にトランスフェクションし、72時間後の培養上清中のVEGF量をELISAにより定量し、RPE-J細胞におけるVEGF産生抑制効果について検討した。また、蛍光標識したイムノリポソームをラット右目に点眼し、一定時間後に摘出した眼球から単離した網膜についてフラットマウントを作製し、蛍光顕微鏡を用いて蛍光分布を観察することで点眼によるキャリアの網膜への集積性を評価した。

#### 4. 研究成果

はじめに、網膜を指向するリガンドとなり得るモノクローナル抗体の作製を行った。RPE-J細胞を免疫したマウスから単離した脾臓細胞とミエローマ細胞を融合し、約600クローンの抗体産生ハイブリドーマライブラリーを作製した。イムノトキシンアッセイとスケールアップを繰り返し、限界希釈法によりモノクローナル化した結果、12クローンのハイブリドーマを選定し、サブクラスを判定した。フローサイトメトリーにより抗体の非特異的結合の有無を確認した。その結果、選定したいずれの抗体もラット由来RPE-J細胞に発現する抗原を特異的に認識するのに対し、ヒト由来ARPE細胞には非特異的であったことから種交叉性を示すモノクローナル抗体であることが判明した。また、非特異的結合を引き起こすFc受容体への影響はないことも確認した。抗体量測定の結果から、抗体産生量の高い1クローンのハイブリドーマを大量培養し、抗体精製を行い以降の送達キャリアの設計検討に用いることとした。作製したモノクローナル抗体について、標的細胞であるRPE-J細胞への内在化能をイムノトキシンアッセイにより検討した結果、比較対照として用いたIgGポリクローナル抗体では細胞生存率の低下は認められなかったのに対し、本モノクローナル抗体は、濃度依存的な細胞生存率の低下を示し、ラット由来のRPE細胞に対して高い内在化能を有することが確認された。生体環境を模するためトランスウェルを用いてRPE-Jの単層膜を形成し、頂端膜側または基底膜側にイムノトキシンを添加したところ、硝子体から網膜への移行を想定した頂端膜側、脈絡膜からの移行を想定した基底膜側、いずれに添加した場合もイムノトキシン群において膜抵抗値の減少ならびに細胞生存率の低下が認められた。このことから、作製したモノクローナル抗体が、本研究の目的である点眼投与により網膜を標的とする送達キャリアのリガンドとして適用できる可能性が示された。

そこで、核酸送達キャリアとして、モノクローナル抗体修飾ペプチドキャリア、モノクローナル抗体/siRNA/MPEG-PCL高分子ミセル複合体ナノ粒子、モノクローナル抗体修飾リポソームの調製を試みた。

モノクローナル抗体のFc領域をチオール化し、これまでにsiRNAを効率的に送達することを報告している多機能性ペプチドとジスルフィド結合させて調製したモノクローナル抗体修飾ペプチドキャリアは、ペプチド由来の正電荷を示し、siRNAと複合体ナノ粒子を形成することが確認された。RPE-J細胞への取込み特性を評価した結果、モノクローナル抗体とペプチドのモル比が1:0.1のキャリアを用いた場合に、ペプチド/FAM-siRNA複合体群に比べ、顕著な取り込み効率を示した。また、ヒトARPE細胞においてはモノクローナル抗体修飾ペプチド/FAM-siRNA群、ペプチド/FAM-siRNA群に有意な差は認められず、種交叉性ならびにRPE標的的特性を示すモノクローナル抗体修飾ペプチドキャリアであることが示唆された。

点眼経路による網膜への移行性向上には、脈絡膜の網膜側に位置し75-85nmの小孔からなる脈絡膜毛細血管板の有窓構造を通過し得る微小サイズに設計することが有用であることを報告している。このことから、siRNAを搭載できる微小サイズのナノキャリアとして、MPEG-PCL高分子ミセルならびにリポソームに着目し、モノクローナル抗体による網膜指向性付与の可能性を検討した。MPEG-PCL/多機能性ペプチド/siRNAの3成分からなる正電荷の高分子ミセル(粒子径約30-40nm、siRNA搭載率約98%)を溶媒希釈法により調製した後、モノクローナル抗体を添加し、モノクローナル抗体-siRNA搭載高分子ナノミセル複合体を得た。本ミセル複合体は、保存安定性確保ならびに点眼量調節のための凍結乾燥による粉末化が可能であり、再分散前後の粒子径ならびにゼータ電位に有意な差は認められず、用時再分散可能な微小サイズであることを確認した。RPE-J細胞において、正電荷のFAM-siRNA/ミセル群に比べ、負電荷のモノクローナル抗体/FAM-siRNA/ミセル群は有意に高い取り込み効率を示し、RPEを標的とするモノクローナル抗体による特異的な取り込み向上が認められた。また、ELISAの結果から、siVEGFを搭載した群では有意なVEGF産生量の低下が認められ、VEGF抑制効果が顕著であることが示唆さ

れた。

さらに、モノクローナル抗体修飾 siRNA 搭載リポソームの調製について検討した結果、siRNA と機能性ペプチドの複合体ナノ粒子をコアとして SUV fusion 法により調製した siRNA 封入リポソームに、チオール化したモノクローナル抗体を添加することで、粒子径約 56 nm、ゼータ電位約 -0.8 mV、抗体修飾率約 6% の siRNA 搭載イムノリポソームを得た。RPE-J 細胞において顕著な取り込み効率を示し、ヒト ARPE 細胞には内在化しないことが確認され、モノクローナル抗体による送達効率向上が示唆された。また、健常ラットに点眼し、最終点眼 15 分後に摘出した眼球から単離した網膜のフラットマウントの蛍光観察において、未修飾リポソーム点眼群に比べ、ATTO 標識イムノリポソーム点眼群では網膜全体に赤色蛍光が観察され、モノクローナル抗体を修飾することで、点眼後の網膜への集積性が向上することが示された。

以上、本研究において、網膜への指向性かつ内在化能を有するモノクローナル抗体の作製に成功し、キャリアのリガンドとしての有用性を示した。また、脈絡膜毛細血管板の有窓構造を通過し得る微小サイズのナノキャリアを設計し、本モノクローナル抗体を付与することで網膜細胞ならびに点眼後の網膜への移行性を向上できることを見出した。

## 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計5件)

Yuuki Takashima, Yuta Adachi, Hisako Ibaraki, Takanori Kanazawa, Yasuo Seta, Neovascularization-suppressive effect in rat retina after eye drop of anti VEGF-siRNA loaded liposomes, 30 Years of Drug Delivery Research (2017/06/12, Kuopio, Finland)

Yuuki Takashima, Keisuke Segami, Yutaka Fujii, Yuta Adachi, Hisako Ibaraki, Yasuo Seta, Preparation of RPE-targeted nanocomplex for siRNA delivery to posterior segment of the eye, 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (2018/03/19, Granada, Spain)

西田祥伍、高島由季、山内文太、藤井寛、瀬上慶祐、安達裕太、茨木ひさ子、瀬田康生、福原武志、網膜指向型モノクローナル抗体修飾リポソームの作製及び網膜移行性評価、第 34 回日本 DDS 学会学術集会 (2018/06/21、長崎)

清水菜央、高島由季、西田祥伍、山内文太、藤井寛、瀬上慶祐、安達裕太、茨木ひさ子、瀬田康生、福原武志、網膜を指向するモノクローナル抗体修飾リポソーム点眼剤の設計、第 62 回日本薬学会関東支部大会 (2018/09/15、東京)

山内文太、高島由季、西田祥伍、藤井寛、瀬上慶祐、茨木ひさ子、瀬田康生、福原武志、点眼による網膜への核酸送達のためのモノクローナル抗体複合ナノ粒子の設計、第 43 回日本薬剤学会製剤・創剤セミナー (2018/08/23、神奈川)

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：福原 武志

ローマ字氏名：Takeshi Fukuhara

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。