

令和元年9月11日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18948

研究課題名(和文) 後眼部疾患の革新的核酸医薬療法を実現する点眼微粒子DDS製剤の開発

研究課題名(英文) Development of drug delivery to posterior segment of the eye by topical instillation of nucleic acid medicine using nanoparticles

研究代表者

田原 耕平 (Tahara, Kohei)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30454325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、眼内注射を不要とし点眼により後眼部疾患治療が可能な革新的な核酸医薬微粒子DDS製剤を開発することを目的とした。まず、核酸医薬に近い分子量や物性を有するモデル化合物をリボソーム内部へ封入し、後眼部治療の有用性を評価した。その結果、リボソームを利用することで網膜への薬物送達率が向上することを明らかにした。また、高分子ナノ粒子を用いた場合でもモデル薬物を後眼部へ送達できることを見出した。ナノ粒子に対し機能性ポリマーによる表面修飾を施すことで、後眼部への薬物送達能が向上することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

眼疾患治療における硝子体内注射や結膜下注射に代わる治療法を確立でき、糖尿病網膜症や血管新生黄斑症などの核酸医薬による革新的な低侵襲後眼部薬物治療が可能となると期待される。核酸医薬の点眼による治療という非侵襲的な新規コンセプトを提案することにより、患者の安全性やコンプライアンスが確実に向上するだけでなく、従来になかった後眼部疾患の進行防止及び予防等、これまでになかった新しい効果や治療法も生まれる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to develop innovative nucleic acid medicine using nanoparticle DDS to treat posterior segment of the eye by topical instillation without requiring intraocular injection. First, a model compound of nucleic acid medicine was encapsulated in liposomes, and the delivery efficiency to the posterior segment of the mouse eye was evaluated. As a result, it was demonstrated that drug delivery efficiency to the retina was improved by using liposome as drug carrier. Further, we found that polymeric nanoparticles could improve the drug delivery to the posterior segment. Surface modification with functional polymer on nanoparticles could increase drug delivery efficiency to the posterior segment of the eye.

研究分野：製剤学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 微粒子キャリア 核酸医薬 点眼 網膜 薬剤反応性 DDS

1. 研究開始当初の背景

siRNA を始めとする核酸医薬は、配列特異的にターゲット遺伝子の発現を制御できるため、薬物治療が困難な難治性疾患に対する切り札と考えられている。この治療の具現化には、細胞内へ核酸医薬を的確に導入する薬物送達システム(DDS)が必要不可欠であり、微粒子ナノキャリアの研究は、世界中で展開されてきた。我々も、主としてリポソームや高分子微粒子の表面修飾の手法開発に注力して、粘膜付着性キャリアを設計し、経粘膜投与経路に関する多くの研究発表を行い、この分野をリードしてきた。

一方、核酸医薬は眼科領域に対しても、薬物治療の確立が強く期待されている。後眼部疾患には、糖尿病性網膜症や加齢黄斑変性症など失明につながる重篤な疾患が多く、我が国では急速な高齢化に伴い、これらの疾患が急増している。薬物治療として、抗体医薬(アイリニア、ルセンティスなど)や核酸医薬が有効であるが、現在は眼内注射しか方法がなく、注射に伴う組織障害や感染症などのリスクが極めて高いため、低侵襲な薬物療法の確立が強く望まれている。

点眼による後眼部治療は、眼科領域の専門家の間では不可能と考えられていた。しかし、我々の研究では、リポソームやポリ乳酸・グリコール酸(PLGA)微粒子を中心とするDDSキャリアを利用し、点眼による後眼部薬物送達を達成できることを明らかにした。網膜疾患はアンメットメディカルニーズが高く、点眼のような低侵襲治療の早期開発が必須である。また、「数力月の治療に数百万円の負担」という抗体医薬と比較し、核酸医薬は製造工程がシンプルで、効率的に大量に製造できる大きな利点がある。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、siRNA を中心とした核酸医薬を点眼により後眼部へ送達する革新的な微粒子 DDS キャリアを設計することが本研究課題の目的である。これまでの核酸医薬や経粘膜 DDS 製剤の研究基盤を最大限に活用することで、以下の課題を克服し網膜疾患治療が可能な核酸医薬の点眼製剤を具現化する。

点眼微粒子キャリアの後眼部輸送機構は不明な点が多く、また網膜へ到達し滞留する微粒子量が未だ不十分である。また、後眼部送達には微粒子への表面修飾が有効であるが、わずかな粒子物性の変化が薬理効果に大きな影響を及ぼすため、極めて精密な粒子設計の確立が必要となる。本研究では、点眼微粒子製剤のまだ解明されていない研究を完成し、DDS を利用した画期的な後眼部薬物治療の臨床応用に展開するための基盤研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 点眼ナノ DDS 粒子設計

点眼微粒子製剤において、粒子分散性が投与後の薬物治療に大きな影響を及ぼすことが分かっている。点眼後の後眼部送達効率に大きく影響すると思われる微粒子物性は、コア基剤、サイズ・多分散指数(PDI)、表面修飾剤である。特にサブミクロンサイズ以下の単分散粒子は、点眼後の後眼部送達量が顕著に増大するため、平均粒子径は 100 nm ~ 200 nm、コア基剤と表面修飾剤の組合せが異なる微粒子キャリアを網羅的に調製する。本研究ではコア粒子として、リポソーム及び生分解性ポリ乳酸・グリコール酸(PLGA)ナノ粒子の2種類を用いる。

(2) 培養細胞を用いた in vitro 安全性及び細胞内導入効率評価

角膜・結膜・網膜培養細胞を用いて、網羅的に調製した核酸医薬微粒子キャリアの安全性と細胞内導入効率評価を行う。

(3) 点眼微粒子キャリアのマウス網膜への到達効率評価

表面修飾微粒子キャリアのマウス点眼後の後眼部送達特性を評価する。すでに培養細胞レベルで薬理効果が確認されている実際の核酸配列を用い、経眼投与時の移行性を評価する。各々の微粒子キャリアに蛍光化合物を封入し、マウス点眼後眼球切片を作製し、蛍光顕微鏡観察により網膜送達効率を評価する。

4. 研究成果

(1) 点眼微粒子キャリアの後眼部移行性評価

核酸医薬に近い分子量や物性を有するモデル化合物をリポソーム内部へ封入し、後眼部薬物治療の有用性を評価した。その結果、水溶性高分子の場合でもリポソームを利用することで網膜への薬物送達率が向上することを明らかにした。

また、生分解性高分子ナノ粒子(PLGA ナノ粒子)を点眼用薬物キャリアとして用いた場合でもモデル薬物を後眼部へ送達できることを見出し、論文として報告した。図1には蛍光標識 PLGA ナノ粒子を点眼した際の網膜における蛍光強度の経時的变化を示す。点眼 30 分後に最も PLGA ナノ粒子の後眼部移行性が増大することが明らかとなった。PLGA ナノ粒子点眼製剤はリポソームの場合と同様の経路で網膜付近まで到達すると考えている。リポソームや PLGA ナノ粒子に対し機能性ポリマーを用いて表面修飾を施すことで、後眼部への薬物送達能が向上することも見出している。このように後眼部送達には微粒子への表面修飾が有効であるが、わずかな粒子物性の変化が薬理効果に大きな

影響を及ぼすため、極めて精密な粒子設計の確立が必要であることが示唆された。

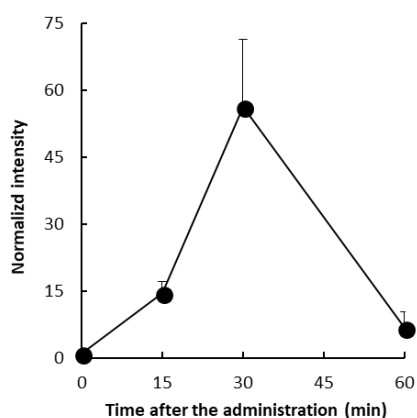


図 1 蛍光標識 PLGA ナノ粒子点眼剤のマウス網膜への移行性評価

(2) 培養細胞を用いた in vitro 安全性及び細胞内導入効率評価

リポソーム及び PLGA ナノ粒子について、培養細胞を用いて細胞毒性を評価した結果、in vivo での投与濃度における安全性を確認した。リポソームや PLGA ナノ粒子と培養細胞との相互作用を評価したところ、モデル核酸溶液と比較して有意に細胞内取り込みが増大することが明らかになった。また、カチオン性ポリマー修飾リポソームでは、修飾濃度依存的に細胞内取り込み量が増大することが明らかとなった。

(3) 点眼微粒子キャリアによるマウス網膜への siRNA 到達効率評価

蛍光標識 siRNA 封入リポソームをマウスに点眼投与することで、網膜における蛍光強度が Naked siRNA と比較して相対的に増大した。さらに葉酸をリポソーム表面に修飾することで、点眼後の網膜送達効率が向上した。網膜色素上皮細胞には葉酸受容体が発現していることが知られており、葉酸をリポソームへ修飾することにより、網膜への標的指向性が向上したことが大きく関与したと考えられる。また、膜透過ペプチドであるオクタアルギニン (R8) でリポソームに表面修飾を施した場合も、未修飾と比較し siRNA の網膜送達効率が向上した。

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 3 件)

Tahara K, Karasawa K, Onodera R, Takeuchi H. Feasibility of drug delivery to the eye's posterior segment

by topical instillation of PLGA nanoparticles. Asian J Pharm Sci. 12: 394-399. 2017 (査読有)

Shimazawa M, Inoue Y, Masuda T, Onodera R, Tahara K, Shimizu Y, Mibe Y, Tsuruma K, Takeuchi H, Hara H. Topical diclofenac-loaded liposomes ameliorate laser-induced choroidal neovascularization in mice and non-human primates. Curr Neurovasc Res. 14: 46-52. 2017 (査読有)

田原耕平, 竹内洋文. 生体適合性ナノ粒子を利用した非侵襲的・局所 DDS 製剤の開発. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 48: 735-741. 2017(査読無)

[学会発表](計 10 件)

松浦由佳、小野寺理沙子、田原耕平、竹内洋文. オクタアルギニン修飾リポソームによる眼内薬物送達機能の評価. 日本薬剤学会 第 31 年会. 2016 年

有木優太、林寿樹、小野寺理沙子、田原耕平、竹内洋文. 高分子医薬の網膜送達を目的とした表面修飾リポソーム点眼剤の設計. 日本薬剤学会 第 31 年会. 2016 年

小野寺理沙子、林寿樹、田原耕平、竹内洋文. 後眼部への薬物送達を目的とした葉酸修飾リポソームの網膜送達効率に及ぼす葉酸修飾の影響. 第 32 回日本 DDS 学会. 2016 年

松浦由佳、林えり、小野寺理沙子、田原耕平、竹内洋文. 点眼されたりポソームの前眼部での挙動に及ぼす因子および滞留性の評価. 第 32 回日本 DDS 学会. 2016 年

田原耕平. 非侵襲的な投与方法を可能とする生体適合性ナノ粒子の開発 眼内注射を不要とするナノ粒子点眼剤. リポソーム研究会(招待講演). 2016 年

松浦由佳、小野寺理沙子、田原耕平、竹内洋文. 眼内への薬物移行性および滞留性向上を目的としたオクタアルギニン修飾リポソーム点眼剤の設計. 第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 2016 年

有木優太、小野寺理沙子、田原耕平、竹内洋文. 点眼による後眼部への高分子医薬送達を目指したりポソーム製剤の設計. 日本薬学会 第 137 年会. 2017 年

林 えり, 小野寺 理沙子, 田原耕平, 竹内 洋文. 前眼部における眼内移行性の向上を目的としたリポソーム点眼製剤の開発. 界面特性を利用した粒子設計とプロセス開発に関するワークショップ. 2017 年

田原耕平. 生体適合性微粒子を用いた非侵襲的・局所 DDS 製剤の設計. NEPTIS-26(招待講演 X 国際学会). 2018 年

田原耕平, 小野寺理沙子, 竹内洋文. 生体適合性ナノ粒子を利用した非侵襲的・局所 DDS 製剤の開発. 日本薬学会 第 137 年会 (招待講演). 2017 年

〔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

田原 耕平 (TAHARA, Kohei)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 30454325