

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09443

研究課題名(和文) カニクイザル網膜静脈閉塞症モデルに対するリポソームによる薬物治療の開発

研究課題名(英文) Development of drug treatment using sugar-chain modified liposome for the macaque monkey model of retinal vein occlusion

研究代表者

西信 良嗣 (SAISHIN, YOSHITSUGU)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30379193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：リポソームによる薬物治療を目的として蛍光標識リポソームの作製を行った。様々なタンパク質を内包した。いずれのタンパク質内包リポソームも粒子径を測定したところ、粒子径100nmを有していた。IgG内包リポソームを作製し、冷蔵保存をしたところ、13か月後においても粒子径89nm、内包タンパク質濃度が1.3mg/mlであり、長期にわたって安定することが証明された。蛍光色素内包リポソームからの漏出量の評価したところ、30日間は粒子径分布に大きな変化は認められなかった。60日後の漏出量は3.436 µgであった。薬剤内包リポソームが網膜静脈閉塞症に対する薬物治療の手段となりえる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リポソームは生体膜に大量に存在するリン脂質、コレステロールなどを主成分とする人工の脂質二重膜でできた粒子径100nmの微細なカプセルである。封入する薬剤については、直接化学修飾する必要がないので、実用化への過程が短くて済む。抗体や糖脂質などをリポソーム表面に組み込むことにより、特定の組織、細胞に対して標的指向性をもつリポソームを作製できる。また作製した薬剤内包リポソームに薬剤徐放効果があることがわかった。この標的指向性薬剤内包リポソームを用いることで、網膜静脈閉塞症に対する抗VEGF阻害薬の硝子体内投与に代わる新たな創薬コンセプトの確立への手掛かりとなった。

研究成果の概要(英文)：Fluorescently labeled liposomes were prepared for the purpose of drug treatment with liposomes. A variety of proteins were encapsulated. The intensity-average diameter of the liposomal nanoparticles was approximately 100 nm. Liposomes encapsulated with human immunoglobulin were prepared and characterized. The size of liposomes remained 89nm until 13 months at 4 degree. The leakage amount at 60 days was approximately 3.436 µg. The liposomes can lead to the slow and controlled release of drug. These results suggest that liposomes encapsulated with drug may be feasible for antibody treatment of retinal vein occlusion.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜静脈閉塞症 たんぱく質 リポソーム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) リポソームは生体膜に大量に存在するリン脂質、コレステロールなどを主成分とする人工の脂質二重膜でできた粒子径 100nm の微細なカプセルである。リポソームは DDS (drug delivery system) や薬物キャリアーとして研究されてきた。封入した物質が免疫機構により異物として認識される可能性が低く、カプセル化することにより組織障害性や、毒性も軽減される。封入する薬剤については、直接化学修飾する必要がないので、実用化への過程が短くてすむ。さらに、抗体やレクチン、糖脂質などをリポソーム表面に組み込むことにより、特定の組織、細胞に対して標的指向性(能動的ターゲティング)をもつリポソームが作成できる。このような特色は臨床的にみて非常に有利な点である。リポソームを利用する系は実験的に効果が上がることが判明すれば、直ちに臨床実用化が可能な点で現時点では最も有望なものであろう。しかし、標的指向性をもつリポソーム研究がはじまってから日が浅く、眼科臨床への応用を念頭においた研究もまだ数少ないのが現状である。

(2) 網膜静脈閉塞症は、加齢とともに有病率が高くなり、日本人では 40 歳以上の約 50 人に 1 人(2.1%)に発症し、有病率は他のアジア人や白人より高く、日本人にとって重要な疾患である。発症すると血流量が低下して網膜が虚血、低酸素状態に陥ると血管内皮細胞増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)などのサイトカインが過剰に産生される。過剰な VEGF により血管の透過性が亢進し網膜浮腫が生じるとともに、血管新生が生じる。治療法としてはいずれも対症療法であり、確実に有効な治療法が現在も確立されていないのが現状である。近年、VEGF 阻害薬の硝子体内投与が主流となっている。VEGF 阻害剤は治療効果の持続が短く、再投与を要する症例が多いため投与回数の多さが課題となっている。そのため、ヒトに近いモデル動物を用い、網膜静脈閉塞症に対する新たな治療法を開発することが喫緊の課題である。

### 2. 研究の目的

網膜静脈閉塞症に対する抗 VEGF 薬硝子体内投与は治療効果の短さ、投与回数の多さが障壁となっている。ヒトに近いモデル動物を用いて、新たな治療法を開発することが課題である。本研究では、ヒトへの近似度が高いカニクイザルを用いた網膜静脈閉塞症のモデル動物を確立する。さらに、抗体や糖脂質をリポソーム表面に修飾させることにより、眼内局所濃度を高める能動的ターゲティング機能をもつ標的指向性リポソームを作製する。抗 VEGF 薬(ベバシズマブ)、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボン、抗血小板薬であるアスピリンをリポソームに封入し、標的指向性薬剤内包リポソームを作製する。カニクイザルの硝子体内にリポソームを投与し、カニクイザル網膜静脈閉塞症モデルにおける網膜構造および網膜血管異常の改善効果を評価し、これを基に、網膜静脈閉塞症の新たな創薬コンセプトの確立に挑むことが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) 蛍光標識リポソームの作製。リポソームの主成分であるリン脂質、コレステロールなどの各脂質を秤量し、クロロホルム/メタノールに溶解する。エバポレーターで溶媒を除去後、真空乾燥して脂質膜を得る。脂質膜を水和し超音波処理を行いミセル懸濁とする。ミセル混濁液を限外濾過にかけ、リポソームを作製する。リポソーム溶液に架橋試薬を添加してリポソーム表面に fluorescein isothiocyanate (FITC) を修飾する。蛍光標識することで眼内へのリポソームの取り込みを非侵襲的に評価できる。

(2) カニクイザルを用いた網膜静脈閉塞症のモデルの作製。全身麻酔下でカニクイザルの網膜静脈に対しレーザー光凝固装置にて網膜の静脈血管を凝固し、静脈閉塞を作製する。網膜動静脈交差部付近の静脈血管分岐部を凝固して静脈分枝の閉塞を作製する網膜静脈分枝閉塞症と、視神経乳頭付近の静脈血管を凝固して網膜中心静脈の閉塞を作製する網膜中心静脈閉塞症の 2 類の静脈閉塞症を作製する。網膜静脈閉塞症が発症すると血流量が低下して網膜が虚血、低酸素状態に陥り血管内皮細胞増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)などのサイトカインが過剰に産生される。過剰な VEGF により血管の透過性が亢進し網膜浮腫が生じるとともに、血管新生が生じる。

(3) 標的指向性リポソームの作製。蛍光標識リポソーム溶液に架橋試薬を添加しリポソーム表面に炎症部位の血管内皮細胞に発現上昇が見られる E-セレクチンに対する抗 E-セレクチン抗体、E-セレクチン分子に特異的に結合する糖鎖であるシアリルルイス X (SLX) 抗 CD54 (ICAM-1) 抗体、を修飾し標的指向性を持たせる。

(4) 標的指向性リポソームの評価。生理食塩水に作製した標的指向性リポソームを添加する。37 の恒温装置内に入れ、限外濾過を行いリポソームの粒子径分布、脂質定量、リポソーム内の残存薬剤濃度を検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 蛍光標識リポソームの作製：改良コール酸除去法により、リポソームにタンパク質を内包した。tPA、ブタ IgG、 $\beta$ -galactosidase、Heparine、HSA-Cy5.5 の各蛋白質を内包した。内包率は各々、3.0%、4.3%、5.9%、0.4%、2.5%であった(図1)。いずれのタンパク質内包リポソームも動的光散乱法により粒子径を測定したところ、粒子径 100nm を有しており、空リポソームと比較してもリポソームの崩壊などは観察されなかった(図2)。次にヒト IgG を用いて、IgG 濃度 25mg/ml の IgG 内包リポソーム(リポソーム組成 2 種類)が作製可能であるか検討した。脂質成分 DPPC/DPPE/DCP/Cholesterol/Ganglioside (15/5/5/40/15 モル比) を秤量し、改良コール酸除去法により、IgG 内包リポソーム溶液を得た。得られたリポソーム溶液に架橋試薬 BS3 を加えて攪拌し、リポソーム膜上にヒト血清アルブミンを結合させた。粒子径、脂質濃度、内包 IgG 濃度を測定した。IgG 内包リポソームは、粒子径 125nm、内包 IgG 濃度が 2.11mg/ml であった。ヒト血清アルブミンを結合させた IgG 内包リポソームは、粒子径 111nm、内包 IgG 濃度が 1.66mg/ml であった。濃縮操作により、IgG 濃度 25mg/ml のリポソームとすることが可能であった。内包効率は使用 IgG 量の 21.1%、16.6%であった。Cy5.5 内包リポソーム(蛍光色素内包リポソーム)を作成したところ、粒子径 82nm、内包タンパク質濃度が 1.4mg/ml であった。冷蔵保存をしたところ、13 か月後においても粒子径 89nm、内包タンパク質濃度が 1.3mg/ml であり、長期にわたって安定することが証明された(図3)。眼球内への1回の投与量が 0.05ml であるとすれば、各々64 回分、48 回分に相当し、実験使用上可能なリポソームが作製できることが判明した。

図1 各内包物質の内包率

内包物質	内包率(%)	脂質(mg/ml)
tPA	3.0	13.9
ブタ IgG	4.3	18.3
$\beta$ -galactosidase	5.9	13.7
Heparine	0.4	20.0
HSA-Cy5.5	2.5	18.5

図2 リポソームの粒子径分布

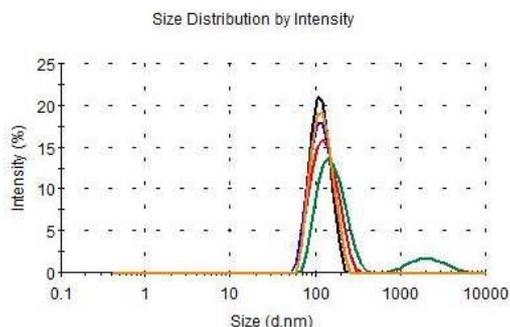


図3 冷蔵保存時の内包タンパク質保持率

	平均粒子径 (nm)	内包タンパク質濃度 (mg/ml)
Day0	82	1.4
13 か月後	89	1.3
保持率 (%)		93

(2) 蛍光色素内包リポソームからの漏出量の評価：作製した Cy5.5 内包リポソーム(蛍光色素内包リポソーム)からの Cy5.5 漏出量を評価した。脂質成分 DPPC/DPPE/DCP/Cholesterol/Ganglioside (15/5/5/40/15 モル比) を秤量し、改良コール酸除去法により、HSA-Cy5.5 内包リポソーム溶液を得た。得られたリポソームは粒子径 130nm、電位 -13.4mV、HSA-Cy5.5 濃度 3.05mg/ml、脂質濃度 3.61mg/ml、HSA-Cy5.5/脂質 0.84mg/ml であった(図4)。

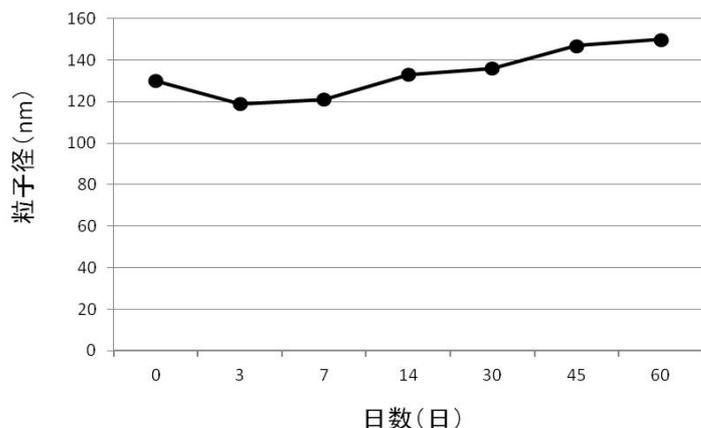
図4 内包リポソームの物性

粒子径(nm)	電位 (mV)	濃度(mg/ml)	脂質濃度 (mg/ml)	HAS-Cy5.5/ 脂質(mg/mg)
130	-13.4	3.05	3.61	0.84

漏出量の検討は以下の通りに行った。8 mL の生理食塩水にリポソームを 0.1 mL 添加し 37 °C の恒温装置内に静置した。0, 3, 7, 14, 30, 45, 60 日後に、1ml を抽出し、限外濾過により、漏出した HSA-Cy5.5 を除去し粒子径分布、ゼータ電位、HSA-Cy5.5 定量を行った。粒子径は、0, 3, 7, 14, 30, 45, 60 日後に各々、130, 523, 429, 475, 477, 443, 404nm となり、3 日後に大き

く大粒径側にシフトした。リポソームからの漏出量は、3, 7, 14, 30, 45, 60 日後に各々、55.0, 54.6, 53.6, 59.5, 62.4, 55.9%となり、60 日後までほぼ一定の漏出率であった。早期に粒子径分布の変動が大きく、リポソームが3 日程度で不安定化し、抗体を漏出していると考えられた。そのため、リポソーム表面上をアルブミンコートすることでリポソームの安定化を図った。その結果、粒子径は、0, 3, 7, 14, 30, 45, 60 日後に各々、130, 119, 121, 133, 136, 147, 150nm となった(図5)。

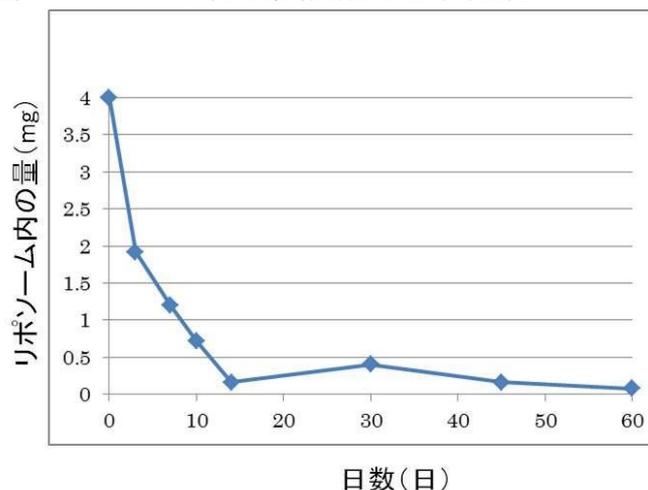
図5 粒子径の経時的変化



30 日間は粒子径分布に大きな変化は認められなかったが、60 日後には、粒子径分布の幅が大きくなり、大きな粒子径を有するリポソームまたは凝集体の存在が示唆された。漏出率に関しては、3, 45 日後において、8, 36%と初期は低い漏出率を示し、経時的な漏出率の増加が認められた。徐放効果がある蛍光標識リポソームが作製できることが判明した。

(3) 薬剤内包リポソームの評価: 作製した Cy5.5 内包リポソーム(蛍光色素内包リポソーム)に抗 VEGF 薬(アバスタチン)の内包を試みた。各脂質を秤量し、クロロホルム/メタノール(1:1 容量比)に溶解し、改良コール酸除去法によりアバスタチン, HSA-Cy5.5 内包リポソーム溶液を作製した。作製したリポソーム溶液は、粒子径 132nm、電位 -50.0mV、アバスタチン濃度 40.0mg/ml、脂質濃度 27.1mg/ml であった。37 °C の恒温装置内に静置して、0, 3, 7, 10 日後に、限外濾過により、リポソームから漏出したアバスタチンを除去し、粒子径分布、ゼータ電位、リポソーム溶液中のアバスタチン定量(Bradford 法、ELISA 法)を行った。漏出アバスタチン量は、0, 3, 7, 10 日後には各々、0, 416, 640, 1312 μg となった。漏出したアバスタチン量は経時的に増加していることが証明され、10 日で 32.8%であった。経時的なアバスタチンの徐放効果が認められた。

図6 リポソーム内の薬剤濃度の経時的変化



次により長期にアバスタチンの徐放効果を検討した。37 °C の恒温装置内に静置して、0, 3, 7, 10, 14, 30, 45, 60 日後に、限外濾過後のリポソーム溶液中のアバスタチン定量を Bradford 法により行った。0, 3, 7, 10, 14, 30, 45, 60 日後のリポソーム内のアバスタチン量は各々、4000, 1920, 1200, 720, 160, 400, 160, 80 μg であった(図6)。リポソーム外に漏出したアバスタチン量は各々、0, 0.213, 0.182, 0.587, 0.561, 1.020, 3.436 μg であった(図7)。リポソーム内のアバスタチン量は経時的に減少し、リポソーム外に漏出したアバスタチン量は経時的に増加している。以上より経時的なアバスタチンの徐放効果が認められた。

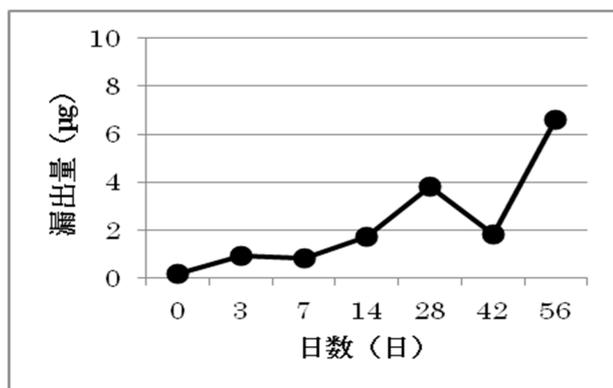


図7 薬剤漏出の経時的変化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ichiyama Y, Sawada T, Sawada O, Ito Y, Kakinoki M, Obata S, Saishin Y, Ohji M	4. 巻 41
2. 論文標題 The Correlation between Aqueous Vascular Endothelial Growth Factor Level and Clinical Activity in Neovascular Age-Related Macular Degeneration.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Retina	6. 最初と最後の頁 111-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IAE.0000000000002790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ichiyama Y, Obata S, Saishin Y, Sawada O, Kakinoki M, Sawada T, Kubota Y, Ohji M	4. 巻 35
2. 論文標題 The systemic antiangiogenic effect of intravitreal aflibercept injection in a mouse model of retinopathy of prematurity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 e21390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202002414R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto R, Saishin Y, Ohji M	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Evaluation of acquired color vision deficiency in retinal vein occlusion using the Rabin cone contrast test.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-021-05171-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Obata S, Saishin Y, Teramura K, Ohji M	4. 巻 10
2. 論文標題 Vogt-Koyanagi-Harada Disease-Like Uveitis during Nivolumab (Anti-PD-1 Antibody) Treatment for Metastatic Cutaneous Malignant Melanoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Rep Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 67-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000496682.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Obata S, Ichiyama Y, Kakinoki M, Sawada O, Saishin Y, Ohji M	4. 巻 13
2. 論文標題 Comparison of Surgical Outcomes Between Two Types of Lamellar Macular Holes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 2541-2546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/OPHTH.S231363.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawada O, Ichiyama Y, Obata S, Ito Y, Kakinoki M, Sawada T, Saishin Y, Ohji M	4. 巻 256
2. 論文標題 Comparison between wide-angle OCT angiography and ultra-wide field fluorescein angiography for detecting non-perfusion areas and retinal neovascularization in eyes with diabetic retinopathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 1275-1280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-018-3992-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawada T, Wang X, Sawada O, Saishin Y, Ohji M	4. 巻 46
2. 論文標題 Aqueous vascular endothelial growth factor and aflibercept concentrations after bimonthly intravitreal injections of aflibercept for age-related macular degeneration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Exp Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 46-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ceo.13002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Okamoto R, Sawada O, Ichiyama Y, Obata S, Kakinoki M, Sawada T, Saishin Y, Ohji M
2. 発表標題 Comparison of imaging area between CLARUS and Optos
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting. (Vancouver, Canada, April 28 - May 2, 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Murotani S, Kakinoki M, Ichiyama Y, Obata S, Iwasa M, Sawada O, Sawada T, Saishin Y, Ohji M
2. 発表標題 Color abnormality measured with the Rabin cone contrast test in central serous chorioretinopathy.
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting. (Vancouver, Canada, April 28 - May 2, 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kakinoki M, Sawada O, Saishin Y, Ichiyama Y, Obata S, Ohji M
2. 発表標題 Investigation of postoperative refractive error of intraocular lens suturing and intrascleral fixation.
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting. (Vancouver, Canada, April 28 - May 2, 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshitsugu Saishin
2. 発表標題 Combination of topical bromfenac and ranibizumab therapy for BRVO
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of Japanese Retina and Vitreous Society
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshitsugu Saishin
2. 発表標題 Anti-VEGF therapy for retinal vein occlusion
3. 学会等名 The 123rd Annual Meeting of the Japanese Ophthalmological Society
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	一山 悠介  (ICHIYAMA YUSUKE)  (10749021)	滋賀医科大学・医学部・助教   (14202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------