

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592604

研究課題名(和文) 標的指向性・光感受性リポソームの薬物動態解析

研究課題名(英文) Pharmacokinetic analysis of site-directed and light-sensitive liposome

研究代表者

橋田 徳康 (Hashida, Noriyasu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30456959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ベルテポルフィンを光感受性物質とした標的指向性・光感受性リポソームの作成を行った。532nm、698nmのレーザー照射で破壊され、さらに抗癌剤であるシスプラチン(CDDP)を内包したリポソームはレーザー照射によりCDDPを放出することを明らかにした。正常マウスでの急性毒性試験では、血球系および肝酵素の異常を認めなかった。Colon26細胞を用いたin vitroの系及び、担癌マウスモデルにおける検証で光照射群で強い癌細胞増殖抑制効果を得た。標的指向性・光感受性リポソームは、細胞毒性を起こすことなく安全性を高めた効率の良い優れたドラッグデリバリーシステムを持つ薬物に成りうる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The site-directed and light-sensitive liposome (SDLSL) was prepared using a light-sensitive substance verteporfin in this study. SDLSL could be effectively destroyed by laser irradiation of 532nm and 698nm. We also encapsulated the cisplatin (CDDP), an anticancer agent, into SDLSL in order to investigate further to check the release of CDDP by laser irradiation. As a result, we observed the release of anticancer agent. We validated tumor-suppressive efficacy of the CDDP encapsulating SDLSL in vitro and in vivo. Using colon 26 cell line and CDDP encapsulating SDLSL, strong cancer cell growth inhibitory effect was obtained with light irradiation group in vitro and in vivo, respectively. From these results, SDLSL can be a highly efficacious site-directed drug delivery system in vitro and in vivo. Using SDLSL as a vehicle for drug delivery, substantial pharmacologic effects with minimum side effects into site-directed tissues should be achieved.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼免疫学 リポソーム ドラッグデリバリーシステム

科学研究費補助金研究成果報告書

研究題目：標的指向性・光感受性リポソームの薬物動態解析

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼免疫学・リポソーム・ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

高度に情報化された現代社会で、五感の中でも特に“視覚”から得られる情報は多大でありこれらに関わる眼疾患を予防し治療していくことは、人間の QOL の維持にきわめて重要であると考えられる。多岐にわたる疾患領域の中で、難治性の眼科疾患の 1 つにぶどう膜炎があげられる。ぶどう膜炎は、眼球のぶどう膜(虹彩、毛様体、脈絡膜)に強い炎症を引き起こす眼科疾患の総称であり、その原因として多くの症例では全身の自己免疫異常が関与しており原因同定が困難である。重症型のぶどう膜炎では、特に治療に抵抗し視力を脅かすことも多い。本研究を通じてぶどう膜炎の新たな治療法とその予防法を解明していくことは、今日の眼科学の直面する重要な課題であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、眼科疾患の中でも難治性疾患であるぶどう膜炎疾患に対する治療薬の開発を目的として行う基礎研究である。具体的には、ステロイド剤・免疫抑制剤などの大量投与・長期投与に伴う全身的・局所的な副作用の軽減を目的として、E-selectin を分子標的とするシアリルレイス X(SLX) を分子表面結合した標的指向性リポソームをベースにして、光感受性物質ベルテポルフィンを結合した光感受性リポソームを開発する。実験的自己免疫性ぶどう膜炎マウスモデルを評価系として、この新規薬物の分子動態と *in vivo* における薬物動態を観察し、レーザー光照射による薬物のコントロール・リリースを解析することにより、標的指向性かつ光感受性リポソームの新規開発を目指す。

3. 研究の方法および 4. 研究成果

ベルテポルフィンの吸光スペクトル解析

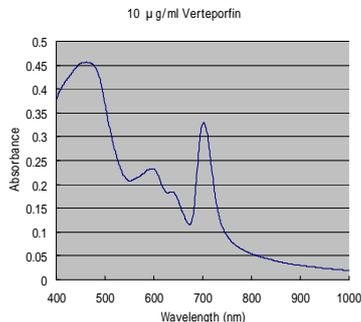


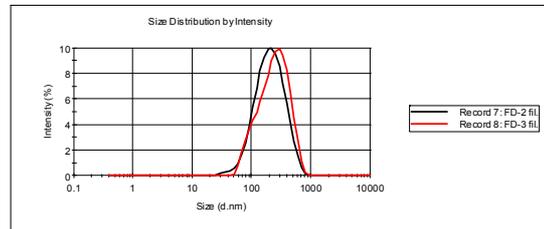
図 1. 10µg/mL ベルテポルフィンの吸光スペクトル
光線力学療法に対して使用される波長 628nm に加えてより低波長である 450nm 付

近および、600nm 付近でも吸光がある。

研究成果

(1)ベルテポルフィン内包リポソーム作成の条件検討

ベルテポルフィンの溶解性に関して、凍結乾燥法による内包の程度を 3 種類(10, 5, 1 mg/ml)の濃度で検討した。1mg/ml の濃度では、粒子直径が不均一で Z-Average 427nm と大きく至適でない判断した。さらに、5 mg/ml および 10mg/ml の濃度で検討した。その結果、限外濾過後の平均粒子径が 200nm の均一な分布を示す 5mg/ml の濃度を至適濃度と決定した。(図 1)。リポソームの科学的な組成検討においては、この条件で検討を行った。



Sample Name	Z-Average (d.nm)	Pdl	Zeta Potential (mV)	内包量 (ug/ml)	崩壊濃度 (mg/ml)
FD-1 (初期濃度10 mg/ml)	457	0.513	-53.8	-	-
FD-2 (初期濃度 5 mg/ml)	275	0.839	-65.5	-	-
FD-3 (初期濃度 1 mg/ml)	272	0.477	-77.3	-	-
FD-2 fil.(FD-2濾過後)	178	0.241	-77.1	381	4.61
FD-3 fil.(FD-3濾過後)	214	0.268	-76.1	251	4.57

図 2. ベルテポルフィン内包量の検討

(2) レーザー照射によるリポソーム破壊実験

実際に作成したリポソームにレーザーを照射し破壊実験を行った。ベルテポルフィンはいくつかの吸収波長をもつ。臨床で使用される 532nm(緑)、561nm(黄)、659nm(赤)とヒトの加齢黄斑変性に対する光線力学療法で使用される 698nm(赤外)の 4 種類で行った。その結果、吸収の強い 532nm, 698nm において明らかな Z-average の増加を認めた。実際に観察したのは粒子径の分布であり、レーザー光により破壊されたと予想される残骸が凝集した結果、Z-average が増加することをみただけである可能性が考えられた。

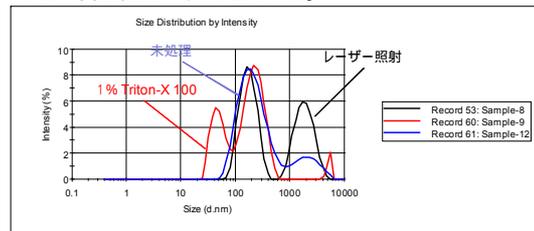


図3 苛酷条件によるリポソーム破壊後の粒子径分布

Sample No.	破壊方法	Z-average (d.nm)	Pdl	備考
8	レーザー照射 (green:532 nm)	282	0.487	0.2 sec x 200 mW x 200 μm x 1000 shots
9	界面活性剤	96.6	0.379	1% Triton-X 100
Control	-	206	0.360	未処理

次に、ベルテポルヒンを内包していないリポソームを用いて Green(532nm)レーザーによる破壊実験を行った。1% Triton-X 処理では、リポソームが破壊され、上記のレーザー照射条件では壊れたりリポソームが凝集するのか、直径が増加した。

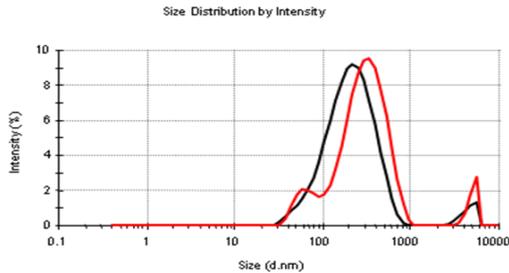


図4 . 金コロイド内包リポソームのレーザー照射結果

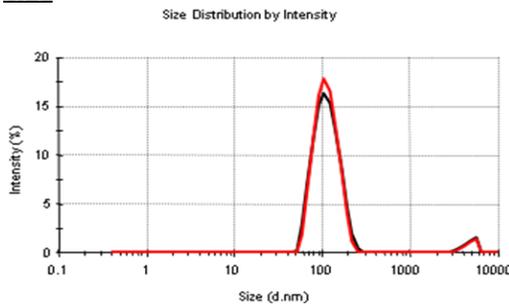
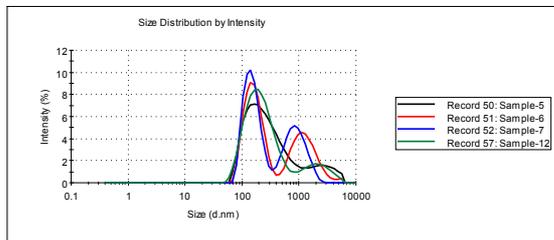


図5 . FITC 内包リポソームのレーザー照射結果

— レーザー照射時
— レーザー未照射時

ベルテポルヒンを内包しなければレーザー照射で壊れない。FITC 内包リポソームは破壊されないが、金コロイド内包では壊れる。



Sample No.	Laser color	Wave length (nm)	Z-average (d.nm)	Pdl
5	Green	532	227	0.409
6	Yellow	561	237	0.443
7	Red	659	215	0.408
Control	-	-	206	0.360

図6 . レーザー波長変化による粒子径分布の変化

sample	Dose (mg/Kg)	RBC (x10 ⁴ /ul)	RBC (x10 ⁴ /ul)
untreatment		957±20.8	30.5±18.0
HEPES		934±27.0	38.8±16.9
Liposome	100	961±27.0	45.9±19.6
Liposome	200	950±41.4	37.0±8.5
Liposome	400	955±26.0	37.9±10.0

sample	Dose (mg/Kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP(U/L)	BUN (mg/dl)	PL (mg/dl)
untreatment		52±9.1	42±8.9	361±27.5	18.8±2.53	172±9.7
HEPES		51±9.1	42±8.0	338±18.0	21.3±2.51	179±11.5
Liposome	100	50±9.3	37±9.5	375±26.8	15.9±1.67	180±14.2
Liposome	200	59±12.8	46±15.7	359±23.0	17.6±2.90	174±4.8
Liposome	400	50±5.8	37±3.2	369±29.9	16.0±0.79	168±16.8

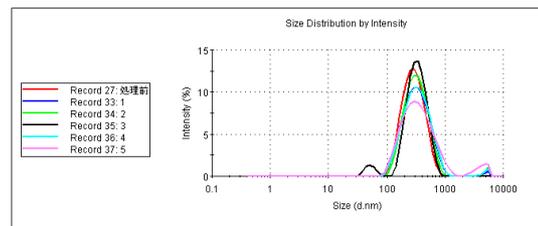
sample	Dose (mg/Kg)	Body weight (g)	Relative organ weight (mg/10g B.W.)				
			Heart	Lung	liver	Kidney	Spleen
untreatment		25.3±1.4	50±1.3	75±7.2	483±31.4	154±4.4	41±2.0
HEPES		25.6±0.9	52±3.2	71±6.0	491±22.1	149±11.9	42±3.4
Liposome	100	25.1±0.7	52±3.0	73±4.1	497±17.2	155±7.4	46±3.7
Liposome	200	24.9±1.1	52±3.8	75±5.1	470±18.3	155±12.9	51±5.4
Liposome	400	25.7±0.5	51±2.9	67±7.1	510±31.3	147±11.2	52±1.8

図7 . マウスにおける急性毒性試験

実際のベルテポルフィン内包リポソームを正常マウスに投与し急性毒性試験を行い薬物投与が生体に及ぼす影響に関して解析した。リポソームの投与量は 100, 200, 400 mg/Kg の 3 条件で行った。その結果、赤血球・白血球数に異常を認めず、AST, ALT, ALP, BUN などの酵素に異常を認めなかった。これらのリポソームは最終的には細網内皮系で捕捉され分解されると考えられるが、投与 1 カ月後の臓器重量を、心臓・肺・肝臓・腎臓・脾臓で調べたところ、200 mg/Kg と 400 mg/Kg の投与群において脾臓において臓器の増加が認められた。

(3) シスプラチン(CDDP)内包リポソームのレーザー照射による破壊実験

シスプラチン(CDDP)を同時に内包させて破壊実験を行った。532nm と 698nm の波長でレーザー照射を行い、破壊され粒子径が凝集により増加することを確認したうえで、限外濾過を行い濾液中に CDDP が放出されていることを確認した。ベルテポルフィンの励起に伴い活性酸素が発生するとされるが、リポソームの崩壊に伴って活性酸素が生じているか確認している。



サンプル	脂質 (mg/ml)	Verteporfin (mg/ml)	CDDP (μg/ml)	CDDP(μg) / 脂質(mg)	平均粒子径 (nm)	ゼータ電位 (mV)
処理前	11.3	2.8	415	37	235	-66
CTR	11.1	2.4	415	37	270	-64
PDT1回	12.5	2.1	369	29	275	-65
PDT5回	11.1	2.1	385	35	266	-61
PC200shots	12.7	2.4	369	29	277	-63
PC1000shots	12.7	2.2	385	30	285	-60

サンプル	リポソーム溶液中 CDDP (μg)	る液中 CDDP (μg)	漏出割合 (%)
元サンプル	62.3		
CTR	62.3	2.6	4.2
PDT1回	55.4	2.8	4.5
PDT5回	57.7	2.9	4.7
PC200shots	55.4	3.1	5.0
PC1000shots	57.7	4.5	7.2

図8 シスプラチン(CDDP)内包リポソームのレーザー照射後の CDDP 漏出割合の算出

(4)レーザー単独照射の細胞活性に及ぼす影響

Colon26細胞を96wellに5000個/well(100μl)で撒き24時間後、レーザーを照射し培地を交換した。48時間培養し、WST8の入った培地にさらに交換する。1時間後に細胞活性を測定したが、レーザー照射単独では細胞毒性がみられなかった。

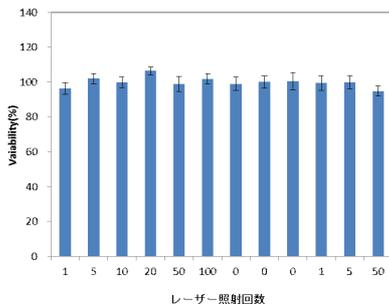


図9. レーザー照射単独での細胞への影響

(5)in vitro の系での抗腫瘍活性の検討

レーザー照射による細胞毒性はないことを確認したので、CDDPの濃度を振ってColon26細胞に対する効果を検証した。リポソーム中に含まれるベルテポルフィン濃度を一定にして(最終濃度260ng/mL)、内包するCDDP濃度を変化させて、レーザー照射の有無で検討した。

- CDDP単剤
- Verteporfin+CDDP内包
- CDDP内包
- Verteporfin内包

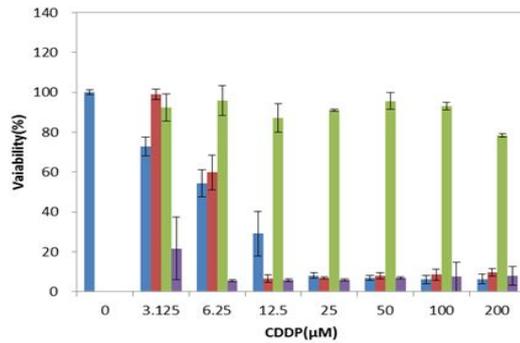


図10. レーザー照射なし群

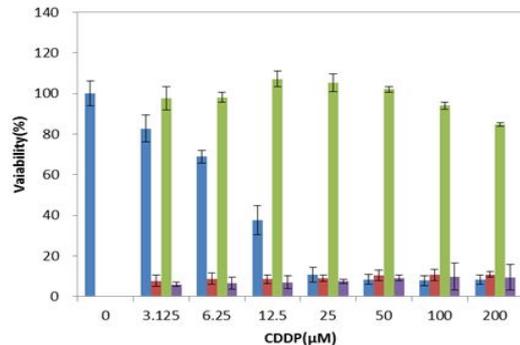


図10. レーザー照射あり群

その結果、CDDP濃度が3.125μMおよび6.25μM群でレーザー照射の効果が劇的に見られるが、同濃度のベルテポルフィン単独リポソームでも、細胞毒性がみられ、至適なベルテポルフィン濃度の検討が必要となった。

(6)ベルテポルフィン内包リポソームにおけるレーザーポインターを用いた細胞アッセイ：レーザー照射時間の検討

In vivoでレーザー照射実験を行うことを考えた場合、レーザーポインターが的確で簡便であるため、レーザーポインターを用いた条件検討も行った。

レーザーポインター波長：660nm、出力：<200mW、ベルテポルフィン終濃度：260ng/mlとして実験を行った。

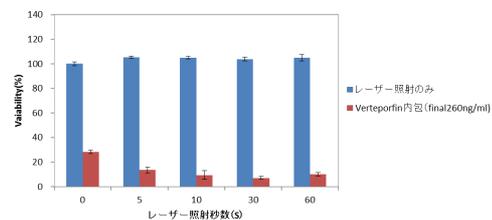


図11. レーザー照射時間の検討

その結果、レーザー照射を10秒とすることに決定した。

(7)リポソームにおけるベルテポルフィン濃度の検討

上記の結果を受けて、リポソーム中に含まれ

るベルテポルフィン至適濃度を検討した。レーザー照射は、レーザーポインターを用いて行い、照射時間は10秒として、Colon26細胞を用いて細胞毒性を解析した。

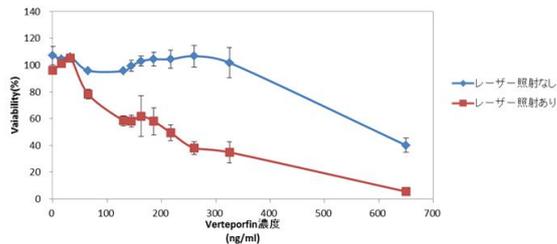


図12. ベルテポルフィン濃度の検討

その結果、ベルテポルフィン終濃度32.5ng/mLでレーザー照射による毒性が無くなる事が明らかとなった。添加終濃度では100ng/mL前後、すなわち、リポソームへの内包量として1μg/mL以上となるようにリポソームを作製することとした。

(8)ベルテポルフィンに至適化した条件でのCDDP内包量を変化させた場合の抗腫瘍活性の変化の検討

- CDDP単剤
- CDDP内包
- Verteporfin+CDDP内包
- Verteporfin内包

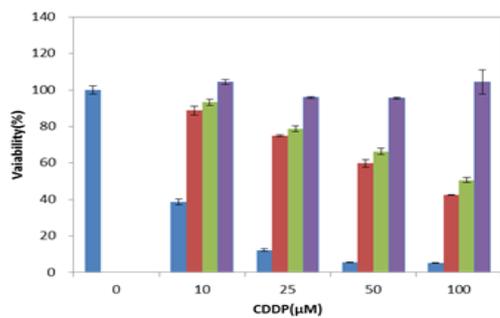


図13. レーザー照射なし群

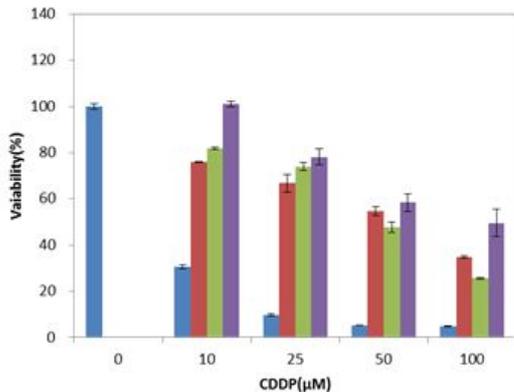


図14. レーザー照射あり群

CDDP内包ベルテポルフィンリポソームにおいてレーザーの照射効果が認められる。同様に、ベルテポルフィン単独内包群でも細胞渉外活性(活性酸素産生による)が認められる。

最終的に、ベルテポルフィン単独では細胞毒性がない至適条件の下でベルテポルフィン濃度を決定でき、さらにCDDPを内包することで抗腫瘍活性を持たせたりリポソームを作成することができた。このリポソームは、通常では細胞毒性をもたらすCDDP濃度でも、ED50まで至らせることなく高濃度の薬物を内包させることができる、非常に有用なDDSの担体となりうることが明らかとなった。

(9)担癌マウスモデルを用いたin vivoでの抗腫瘍活性の検討

In vitroの培養細胞系での抗腫瘍活性を確認できたので、次は担癌マウスモデルを用いて抗腫瘍活性を解析した。mouseはBalb/c Slc-nu/nu, female, 6 weeksを用いて、colon26細胞を1x10⁶個移植した。1週間通常飼育して、1週間後、CDDP内包リポソームを静脈注射して、レーザー照射の有無による抗腫瘍活性について調べた。



移植部位

図15. 担癌マウスモデルの作成

1. リポソーム投与量：200μL, CDDP:15mg/kg, ベルテポルフィン投与量: 65μg/kgで行い、
2. リポソーム投与回数：3回(細胞移植後6日目、11日目、17日目に尾静脈投与を行った。)
3. レーザー照射：細胞移植後6、7、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、25、26、27日目に朝夕2回、1分間腫瘍部位を

照射した。(照射波長：660nm, 出力：<200mW)

4. 腫瘍測定：細胞移植後 6、7、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、25、26、27 日目に腫瘍の長径と短径をデジタルノギスで測定し、(長径×短径²)/2 = 腫瘍体積とした。

5. 体重測定：細胞移植後 6、7、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、25、26、27 日目に体重測定を行った。

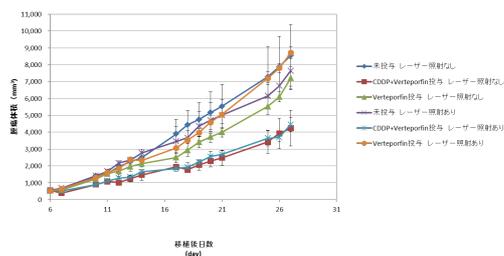


図 16 . 抗腫瘍効果の比較

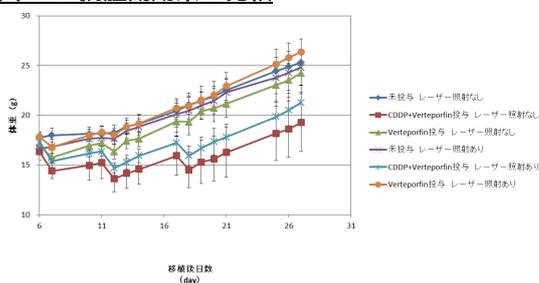


図 13 . 体重変動の比較

未投与のレーザー照射ありなしでは、レーザー照射ありの方がやや腫瘍体積が小さいが、有意差は認められなかった。ベルテポルフィン投与群では、抗腫瘍効果は認められなかった。CDDP の抗腫瘍効果は認められたが、レーザー照射の効果は認められなかった。in vivo では更なる条件検討が必要であると考えられた。

以上の結果から、ベルテポルフィン結合性のリポソームは細胞毒性を起こすことなく、レーザー照射に反応して、内包した薬物を放出し、薬物活性を発現させることが明らかとなった。さらに、CDDP の内包結果から、通常の投与量では薬物毒性が出る濃度でも、安全性高く内包させることができ、優れたドラッグデリバリーシステムを持つ薬物に成りうる可能性が考えられた。