

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 3 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670763

研究課題名(和文) 網膜芽細胞腫治療の新しい試み

研究課題名(英文) New clinical treatment trial of retinoblastoma

研究代表者

勝山 綾 (Katsuyama, Aya)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・技術補佐員

研究者番号：50722873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：副作用などで長期に全身使用できない抗癌薬でも持続的に多剤を眼局所に徐放し、幼児でも加療可能な眼内腫瘍治療の開発を目指してきた。具体的には、我々の既報の技術を利用したポリエチレングリコール等のポリマーを利用した径強膜徐放可能なデバイスを作製し、in vitroでは徐放抗癌剤の抗腫瘍効果の確認ができた。エトポシドとシスプラチンなどの抗癌剤をバーストなしで持続徐放が可能になり、複数薬剤も強膜上から同時徐放できる可能性が示せた。さらに、異種細胞であるヒト網膜芽細胞腫のラットの眼内での増殖を可能にできるシステムのおおまかな準備が出来た。

研究成果の概要(英文)：Whole body administration of Anticancer drug usually causes side effects. Development of new clinical treatment of retinoblastoma for infant patients, is one of our research goal. We have been developing the device by which drugs can be released from sclera made from polymer of polyethylene glycol using our technique already reported. Here, we confirmed the anticancer effect of drugs released from our device in vitro. Anticancer drugs such as Etoposide (ETP) and Cisplatin (CDDP) can be released from the device continuously without burst, showing a possibility that multiple anticancer drugs simultaneously release via sclera. Furthermore, we made a basic system, in which retinoblastoma originated from other animal species can proliferate in the eyes of rats.

研究分野：Ophthalmology

キーワード：網膜芽細胞腫 ドラックデリバリー 抗癌剤 眼内腫瘍作製

1. 研究開始当初の背景

網膜芽細胞腫は小児眼腫瘍の代表であるが発見も遅れがちで眼球摘出にいたることも多い。眼局所に発生した腫瘍でも眼内であれば簡単に腫瘍だけ摘出ができない。放射線治療なども試みられてきたが、顔面の変形や骨の成長不全などが報告されており、治療成績や二次癌の発生なども考慮すると治療の第一選択にするのは難しい。

網膜芽細胞腫など眼原発の腫瘍に限れば、全身投与でなく局所で持続的な薬剤投与ができれば、全身の副作用を減らせ、より強力な薬剤治療を試みることができる。

ここで我々が考慮してきたのはできるだけ全身への薬剤の分布を減らし、複数の薬剤でも持続的に徐放できるドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発である。このために我々が開発したのはリザーバータイプのドラッグデリバリーデバイスである (図1)。このデバイスはこれまでの検討では我々が徐放を試みた薬剤はすべてバーストなしに持続的に徐放できることを確認した (特許:

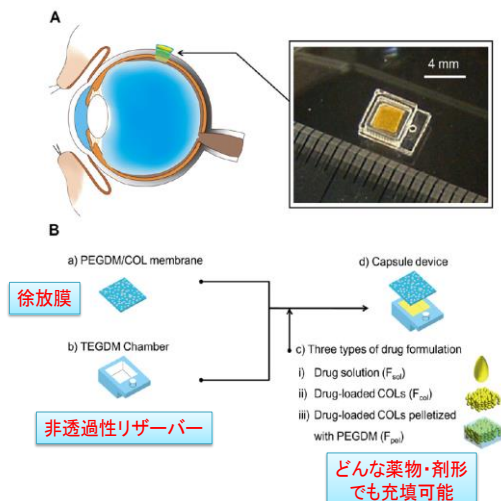


図1. カプセル型経強膜DDSの開発

米国、中国済、EU、日本申請中)。このデバイスは眼内一方向のみに薬剤を徐放するので、結膜の下、強膜上に置くことで持続的な眼内へ向かう薬剤徐放が可能になった。これまでのところ低分子から高分子まで徐放可能であることが判明し、網膜内薬剤濃度も確

認した。このデバイスはリザーバー型であり、複数の薬剤を包埋でき、癌治療に利用された既存の複数薬剤の局所徐放を可能にすると考え、それぞれの薬剤を別々に徐放コントロールできれば、難治性眼内腫瘍の治療法の開発が可能であると考えに至った (図2)。

本法が新しい眼内治療法として確立できればこれまでの治療概念を根底から変えることができる。すなわちこのデバイスは1年以上の長期間徐放が可能であるため、一度の



図2. サル眼用デバイス

投与で持続的に安全に眼内投与が可能であり、加齢黄斑変性治療で行われているような頻回の侵襲的な眼内注射の必要はなく、患者の身体的負担を大きく軽減できる可能性がある。必要がなくなれば容易に摘出できる。また、眼疾患治療に長く使用されてきた面倒な点眼の必要がなくなり、特に網膜芽細胞腫は主として幼児が対象になることがほとんどで、服薬コンプライアンスの面から考えても適している。個々の眼内腫瘍は頻度が少なくとも悪性リンパ腫まで考慮すると使用頻度は増える可能性がある。網膜疾患を中心に眼内疾患に対する薬剤徐放の試みはこれまでもたくさん試みられてきたが、上記のような安全性を第一に眼内に薬剤を徐放する薬剤徐放システムの報告はなく、我々のデバ

イスを利用した薬剤徐放臨床応用に利用できれば眼疾患以外にも広くさまざまな疾患に適応できる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

副作用などで長期に全身使用できない抗癌薬でも持続的に多剤を眼局所に徐放し、幼児でも加療可能な眼内腫瘍治療の開発を行う。特に腫瘍存在強膜上から複数の薬剤を独立徐放させる治療を目指す。

3. 研究の方法

本研究はさまざまな抗癌剤を複数徐放して、動態制御を可能にする抗癌マルチドラッグデリバリーデバイスの技術確立を目指す。デバイスは臨床応用されているポリエチレングリコール (PEG) を基材としたカプセルを応用する (国際特許出願済 ; W02011/021594)。また、眼内への新規薬剤投与経路として、すでに薬剤の網膜内移行を確認した薬剤徐放デバイスの強膜上移植を検討する。この研究期間は下記を検討し、早期臨床応用のための第一ステップとする。

- ① 複数の既存抗癌薬の徐放制御法の確立
- ② デバイスからの複数薬物徐放による培養細胞の細胞周期と増殖抑制濃度の検討
- ③ デバイス移植後の複数薬物徐放によるラット、ウサギの眼内分布の確認
- ④ デバイス移植後の複数薬物徐放によるウサギ網膜芽細胞腫モデルでの抑制効果確認

4. 研究成果

26 年度

●複数抗癌薬徐放制御法の確立 (担当: 勝山、永井 (連携研究者)、大学院生)

これまで新生血管抑制因子 vasohibin (40 k

Da) や低分子化合物の GGA、EDV の徐放制御法を確立してきたが、いずれもシングル徐放であった。今回は、これらの薬物を 1 つのデバイスから徐放する制御方法を開発する。本デバイスはリザーバー、薬物ペレット、徐放膜の 3 つから構成されるが、このうち薬物ペレットと徐放膜の 2 つのポリマー組成を変えることで徐放速度をコントロールできる仕組みである (図 3)。薬剤の徐放を徐放膜で制御し、低分子化合物の徐放を薬物ペレットで制御する方法を検討する。まず培地中での徐放を検討し、徐放量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定する。薬剤はシスプラチン (CDDP)、エトポシド (ETP)、シクロフォスファミド (CPA) を使用した。

<結果>

CPA は約 10 日間 (図 4-1.)、脂溶性の ETP は 120 日の長期徐放 (図 4-2.) を確立できた。さらに ETP では PEG/TEG 組成比と Spin-cover で放出制御が可能であることを明らかにした。この 2 段階徐放システムを利用すれば、複数の分子量の異なる薬物を同時に動態制御でき、効果的な抗癌作用の開発に寄与できると考えられる。

CDDP においては、UV 照射時間により徐放制

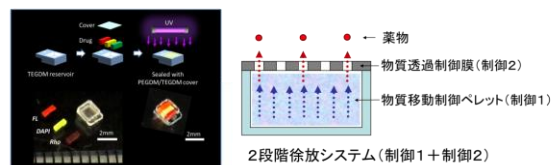


図3. 各薬物の徐放制御を変えることで複数薬物を異なる速度で徐放する制御が可能であることがわかった (図 4-3)。

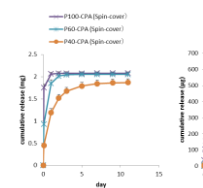


図 4-1.

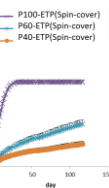


図 4-2.

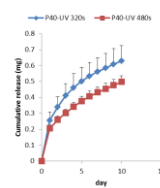


図 4-3.

PEG 濃度の違いと CPA 徐放
PEG 濃度の違いと ETP 徐放
UV 照射時間と CDDP

●培養細胞を用いた効果確認 (担当: 勝山、竹下、阿部)

デバイスから徐放されたそれぞれの薬剤は癌細胞株 (WERI retinoblastoma cells、Y79 human retinoblastoma cells) に及ぼす影響について確認し、dose-dependence curve から有効濃度確認を行った。この薬剤には長期徐放が可能なETPを用いた。細胞を培養したウェルにインサートを挿入する方法で DDS を行った (図 5-1.)。

<結果>

2 μg/day 及び 3 μg/day ETP-DDS で細胞増殖抑制効果を示した (図 5-2.)。また電顕と免染での形態確認も行った。

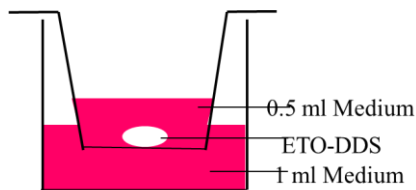


図 5-1.ETP-DDS

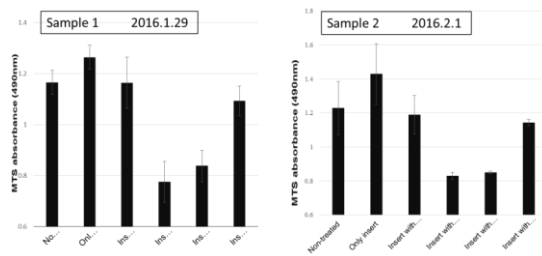


図 5-2.ETP-DDS の有効濃度確認

27 年度

●ラット網膜芽細胞腫モデルの作成 (担当: 竹下、阿部、勝山)

既報に準じてラット網膜芽細胞腫モデルを作製する (Wang S, et al; J Biomed Biotechnol. 2011;2011:394730.)。このモデルはラットに cyclosporin A(CsA) 投与後、網膜下に上記細胞株を 1.5×10^6 個/30・1 注入するものであるが、我々はこれまでにラット網膜下に培養自

己細胞の移植を数多く試みてきており操作上問題になるところはなかった。腫瘍形成評価にはIVISを用いた。シクロスポリン投与のタイミングは細胞移植3日前(CYA-DDS 3d before cell injection)、細胞移植時投与群 (Simultaneous CYA-DDS)、非投与群 (Non-CYA-DDS) の3群とし、細胞移植は同日にすべて行った。細胞移植後4日、7日、15日後にIVISによりデータを取得した。実際にはルシフェリンを120mg/kg投与し、投与後15分後に画像取得した。

<結果>

IVIS の画像は細胞移植3日前 (図 6-1.)、細胞移植時投与群 (図 6-2.)、非投与群 (図 6-3.) に示した。発行部は ROI 解析により数値化し、比較検討を行った (図 6-4.) その結果、2 群間 (t-test)、3 群間 (Turkey, Fisher) による比較で有意差はみられなかったものの、CsA 投与群では腫瘍の増殖が非投与群よりも維持されている傾向がみられた。CsA の全身投与による歯肉炎、下痢、体重減少などは定期的に確認している (データ非表示)。

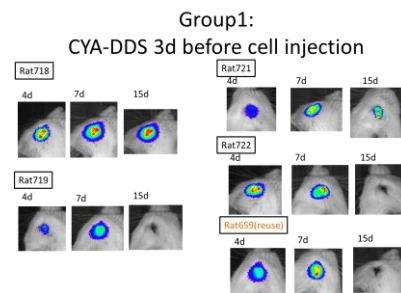


図 6-1. IVIS 画像 (細胞移植3日前投与群)

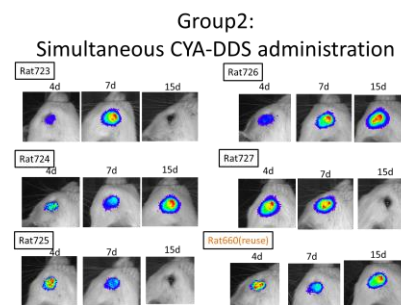


図 6-2. IVIS 画像 (細胞移植時投与群)

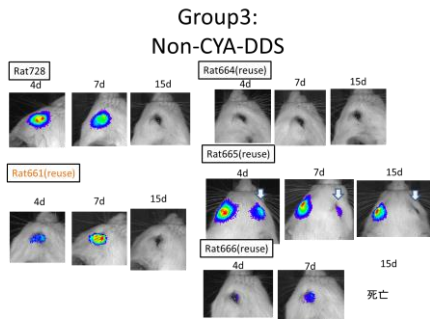


図 6-3. IVIS 画像 (非投与群)

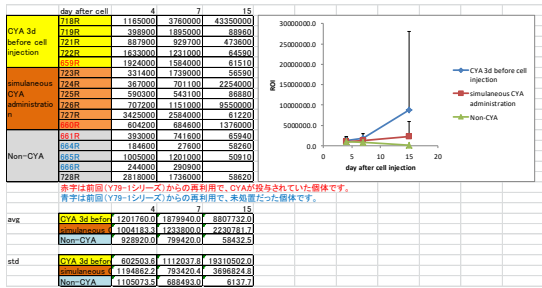


図 6-4. ROI 解析結果

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 0 件)

[学会発表] (計 9 件)

1. Nobuhiro Nagai, Yasuko Izumida, Remi Motoyama, Eri Koyanagi, Aya Katsuyama, Shinji Yamada, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe “Polymeric device based on UV-cured poly(ethyleneglycol) dimethacrylates for controlled intraocular drug delivery” *Pacificchem2015, Hawaii, USA (December 15-20, 2015)*
2. Shinji Yamada, Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Aya Katsuyama, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe “Controlled drug release device fabricated with PDMS mold-based UV curing of polyethyleneglycol dimethacrylates” *BMES 2015 annual meeting, Tampa, Florida, USA (October*

7-10, 2015)

3. Toshiaki Abe, Shinji Yamada, Hirokazu Kaji, Aya Katsuyama, Matsuhiko Nishizawa, Nobuhiro Nagai “Sustained release system of ranibizumab for transscleral administration” *BMES 2015 annual meeting, Tampa, Florida, USA (October 7-10, 2015)*
4. Toshiaki Abe, Aya Katsuyama, Hideyuki Onami, Toru Nakazawa, Nobuhiro Nagai “Transscleral Sustained Ranibizumab Delivery Device Using Polyethyleneglycol Dimethacrylates” *2015 ARVO annual meeting, 4153, Denver, Colorado, USA (May 3-7, 2015)*
5. Aya Katsuyama, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe “Fabrication of a Capsule Device using Polyethyleneglycol Dimethacrylates for Extended Release of Ranibizumab” *BIT' s 1st Annual World Congress of Smart Materials 2015, Busan, Korea (March 23-25, 2015)*
6. 永井展裕, 泉田泰子, 梶弘和, 勝山綾, 西澤松彦, 山田慎二, 眞島行彦, 阿部俊明 「網膜色素変性症治療を目指した薬剤徐放デバイスの開発」第 15 回日本再生医療学会総会、大阪国際会議場、大阪 (2016 年 3 月 17 日-19 日) Poster
7. 永井展裕, 勝山綾, 泉田泰子, 小柳恵理, 山田慎二, 梶弘和, 阿部俊明 「持続性抗がん剤マルチ徐放デバイスの開発」第 37 回バイオマテリアル学会大会、京都テルサ、京都(2015 年 11 月 9 日-10 日)Poster
8. 山田慎二, 永井展裕, 勝山綾, 泉田泰子, 小柳恵理, 梶弘和, 阿部俊明 「マイクロ細孔を有するタンパク質徐放デバイスに関する検討」第 37 回バイオマテリアル学会大会、京都テルサ、京都 (2015 年

11月9日-10日) Poster

9. 永井展裕、泉田泰子、梶弘和、勝山綾、西澤松彦、山田慎二、眞島行彦、阿部俊明「ウノプロストン経強膜持続投与デバイスの開発」第35回日本眼薬理学会、ソラシティカンファレンスセンター、東京(2015年9月5日~6日) Oral

[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 勝山 綾 (Aya Katsuyama)

東北大学・医学系研究科・技術補佐員

研究者番号：50722873

(2)研究分担者 竹下 孝之 (Takayuki Takeshita)

東北大学・大学病院・助手

研究者番号：70361095

(3)連携研究者 阿部 俊明 (Toshiaki Abe)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90191858