

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592623

研究課題名(和文) 標的指向性リポソームを用いた網膜静脈閉塞症の病態解明と薬物治療の開発

研究課題名(英文) Pathological mechanism and a new method for the treatment of retinal vein occlusion using sugar-chain modified liposome.

研究代表者

西信 良嗣 (SAISHIN, YOSHITSUGU)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：30379193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：眼内への抗体療法を目的とした徐放性を有する抗体内包リポソームの作製を行った。作製したヒトIgG内包リポソーム溶液は100nmの均一な粒子をもち、使用ヒトIgG量の16-21%がリポソームに内包可能であった。漏出量に関しては、経時的な漏出率の増加が認められ、60日後の漏出率は約35%であった。リポソーム表面をアルブミンコートすることによって、漏出率を低く調節できることがわかった。次にペバシズマブ内包リポソームを作製し、リポソームからのペバシズマブの漏出量を検討した。前房水のペバシズマブ量に徐放効果が認められた。抗体内包リポソームが眼内への抗体療法の手段となりえる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Liposome is one of the most effective tools for drug delivery systems. Liposome offers improved pharmacokinetic properties, controlled and sustained release of drugs. Liposomes encapsulated with human immunoglobulin for intravitreal administration were prepared and characterized. The liposomes were prepared using the improved cholera dialysis method. The intensity-average diameter of the liposomal nanoparticles was approximately 100 nm. Encapsulation efficiency was approximately 16-21%. The size distribution of liposomes remained stable until 45 days. The efficiency of leakage at 60 days was approximately 35%. The leakage concentration of human immunoglobulin was gradually increased during the study period. The liposomes can lead to the slow and controlled release of drug in the vitreous. These results suggest that liposomes encapsulated with immunoglobulin for intravitreal administration may be feasible for antibody treatment of ocular diseases.

研究分野：眼科学

キーワード：タンパク質 細胞・組織 応用動物 脂質

1. 研究開始当初の背景

(1) 網膜静脈が動脈との交叉部で閉塞する疾患を網膜静脈閉塞症という。血管閉塞により、その静脈が受け持つ領域の網膜が障害を受け、網膜出血や網膜浮腫を生じ視野欠損や視力障害を来す。黄斑部に網膜出血や網膜浮腫を生じると、中心視力は急激に低下する。50 歳以上の高齢者に起きやすい疾患であり、加齢とともに頻度が増大する。網膜循環障害が基礎となる疾患であるが、同疾患眼の硝子体中に血管内皮増殖因子 (VEGF) を初めとした多種類のサイトカインが多量に存在し、病態形成には多くの因子が関与する疾患であると考えられている。治療法として血栓溶解薬、網膜循環改善薬、網膜光凝固、硝子体手術の報告はあるが、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疾患である。近年、同疾患に抗 VEGF 薬などを硝子体内へ投与する治療が行われ良好な結果が報告されている。しかし、再発例もあり、再投与を要することが多く、投与回数、投与間隔、投与量に関して明確な指針はなく課題が残されている。今後は、ヒトに近いモデル動物を作製し、網膜静脈閉塞症の病態を究明するとともに治療方法の開発を検討することが必要である。

(2) 人工の脂質二重膜でできた微細なカプセルであるリポソームは DDS (drug delivery system) や人工生体膜として研究されてきた。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ため、薬物キャリアーとして使う場合、毒性が少なく、異物として働く可能性も少ない。脂質二分子膜で外界から隔離されているため、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も低く、カプセル化することにより組織障害性や、毒性が軽減される。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、特定の組織または細胞に対して標的指向性をもつリポソームが作成できる。このような特色はリポソームを薬物キャリアーとして使用するとき、臨床的にみて非常に有利な点である。しかしながら、リポソームをマイクロカプセルとして使用するシステムは研究がはじまってから日が浅く、臨床医学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. 研究の目的

本研究の目的はカニクイザルを用いて網膜静脈閉塞症のモデル動物を作製し、抗 VEGF 薬 (ペバシズマブ) および血栓溶解剤 (t-PA 製剤) を内包した標的指向性リポソームを硝子体内に投与し、その治療効果を検討することである。E-セレクチンの主要なリガンド糖鎖であるシアルルイス X、VEGF の受容体である VEGFR2 に対する抗体、網膜静脈閉塞症において硝子体中での増加が報告されている

細胞接着因子 (ICAM-1) に対する抗体、を修飾して標的指向性を持たせる。網膜静脈閉塞症のモデル動物作製にヒトへの近似度が高いカニクイザルを使用することにより疾患の病態を詳しく検討する。そしていまだ確実に有効な治療法のない網膜静脈閉塞症に対する治療法の手がかりを得ることが最終的な目的である。

3. 研究の方法

(1) カニクイザルを用いた網膜静脈閉塞症モデル動物の作製。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分岐部を凝固し、静脈閉塞を作製する。実際の病態に対応する様々な血管閉塞の程度を持つ動物モデルを作製するために、レーザー光凝固前にローズベンガル液を網膜血管に注射することにより凝固効率を上げる。

(2) 抗 VEGF 薬 (ペバシズマブ) および血栓溶解剤 (組織性プラスミノゲン活性化因子製剤・t-PA 製剤) を内包した標的指向性リポソームの作製。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、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。ミセル混濁液と抗 VEGF 薬 (ペバシズマブ) または血栓溶解剤 (t-PA 製剤) を混合後、限外濾過を行い、抗 VEGF 薬 (ペバシズマブ) 内包リポソームおよび血栓溶解剤 (t-PA 製剤) 内包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糖鎖や抗体を修飾し、能動的に特定の組織や細胞に配送しようとする標的指向性を持たせる。

(3) 標的指向性リポソームの薬剤徐放効果の *in vitro* での検討。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) カニクイザルの硝子体内における標的指向性リポソームの薬物動態の検討。全身麻酔下でカニクイザルの硝子体に標的指向性リポソームを投与する。各々のリポソームについて薬剤濃度を経時的に測定し、*in vivo* におけるリポソームの薬剤徐放効果を検討する。

4. 研究成果

(1) 標的指向性リポソームの作製：ミセル混濁液とヒト IgG、抗 VEGF 薬 (ペバシズマブ) または血栓溶解剤 (t-PA 製剤) を混合後、限外濾過を行い、ヒト IgG、抗 VEGF 薬 (ペバシズマブ) 内包リポソームおよび血栓溶解剤 (t-PA 製剤) 内包リポソームを作製した。作製した 3 種類リポソームはそれぞれ 110-120nm の粒子径を有していた。また脂質濃度を変化させることによって、リポソーム

の崩壊性が変化した。10mg のヒト IgG から 1.66mg-2.11mg の内包リポソームが作製可能であった。内包効率は 16.6%-21.1%であることがわかった。(図 1)(表 1)

	粒子径(nm)	IgG濃度(mg/ml)
DPPC/DPPE/DCP/Cholesterol/Ganglioside	125	2.11
DPPC/DPPE/DCP/Cholesterol/Ganglioside +ヒト血清アルブミン表面コート	111	1.66

表 1 IgG 内包リポソームの物性

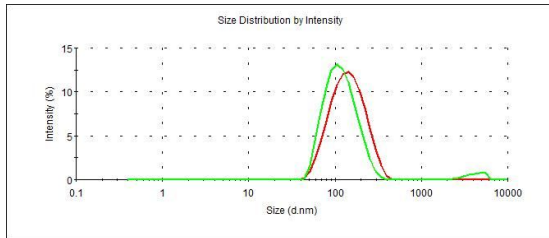


図 1 IgG 内包リポソームの粒子径分布図

37 の生理食塩水にリポソームを添加し、経時的にサンプリングすることにより、ヒト IgG 内包リポソームからの漏出量を検討した。37 で 30 日間はリポソームの粒子径分布に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った。漏出量に関しては 3 日で 144 μg、7 日で 152 μg、14 日で 213 μg、30 日で 327 μg、45 日で 335 μg、60 日で 617 μg となった。漏出率は 3 日で 8.1%、7 日で 8.6%、14 日で 12%、30 日で 18.4%、45 日で 18.9%、60 日で 34.7% となり、経時的な漏出率の増加が認められた。(図 2) また、ヒト IgG 内包リポソームのリポソーム表面をアルブミンコートすることによって、漏出率を低く調節できることがわかった。作製した標的指向性リポソームの粒子径、脂質濃度、内包薬物濃度を測定した結果、本研究に使用可能なリポソームであることが証明された。

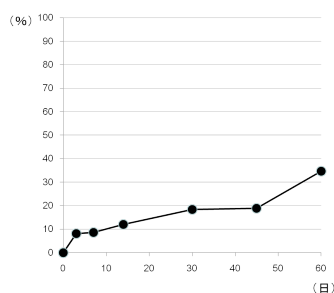
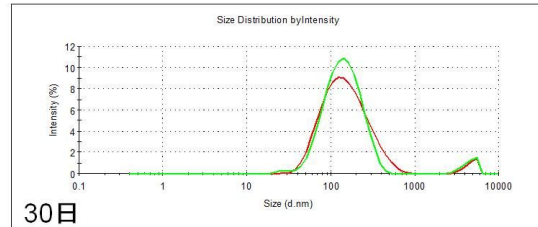


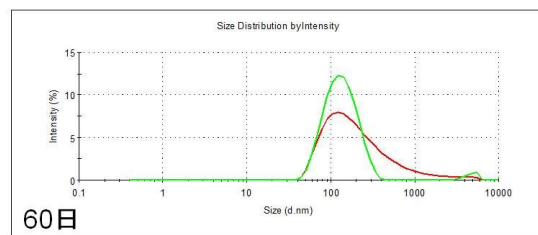
図 2 漏出率の経時的変化

(2) 網膜静脈閉塞症モデルの作製：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分岐部を凝固した。その結果、静脈閉塞を作製することが可能であることがわかった。
(3) 標的指向性リポソームの薬剤徐放効果の in vitro での検討：改良コール酸除去法により、IgG 内包リポソーム溶液を作製した。表面をアルブミンコートすることにより、膜安定性を向上させた IgG 内包リポソーム溶液も作製した。作製したリポソーム溶液を動的

光散乱法により測定したところ約 100nm の均一な粒子径を有していた。使用 IgG 量の 15-20% がリポソームに内包されたことがわかった。37 の生理食塩水にリポソームを添加し、経時的に抽出し、限外濾過することにより、ヒト IgG 内包リポソームからの IgG 漏出量を検討した。37 で 30 日間はリポソームの粒子径分布に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、リポソームが不安定化した。(図 3)



30日



60日

図 3 粒子径分布の経時的変化

漏出量に関しては、7 日で 8.6%、14 日で 12%、30 日で 18.4%、60 日で 34.7% となり、経時的な漏出率の増加が認められた。改良コール酸除去法により、ペバシズマブ内包リポソームを作製し、リポソームからのペバシズマブの漏出量を検討した。漏出量は、7 日で 0.29%、14 日で 0.94%、42 日で 1.63%、60 日で 5.50% となり、経時的な漏出率の増加が認められた。アバスチン内包リポソームの方が漏出率が低いことがわかった。リポソーム表面をアルブミンコートしているため、リポソームを安定化し、ペバシズマブの漏出を抑えていると推測された。(図)

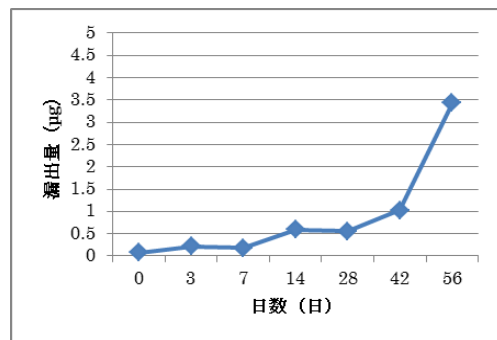


図 漏出量の経時的変化

(4) カニクイザルの硝子体内における標的指向性リポソームの薬物動態の検討：全身麻酔下でカニクイザルの硝子体にリポソームを投与し、経時的変化を細隙灯顕微鏡により検討した。投与後、2 週間の段階では眼内炎など明らかな炎症所見を認めなかった。
(5) 標的指向性リポソームを硝子体内に投与した網膜静脈閉塞症のモデル動物におい

て、標的指向性リポソームの機能評価および薬物を内包した標的指向性リポソームの治療効果を検討した。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 DPPC/DPPE/DCP/Cholesterol/Ganglioside (15/5/5/40/15 モル比)の割合で秤量し、クロロホルム/メタノールに溶解した。エバポレーターで溶媒を除去後、脂質膜を得た。脂質膜を水和し超音波処理を行いミセル懸濁とした。このミセル混濁液と抗 VEGF 薬 (ベバシズマブ) を混合後、限外濾過を行い、抗 VEGF 薬 (ベバシズマブ) 内包リポソームを作製した。モデル動物に作製した標的指向性リポソームを添加した。0,3,7,14,30,45,60 日後に前房水のサンプリングを行った。リポソームから前房水中へのベバシズマブの漏出量を検討した。リポソーム表面をヒト血清アルブミンコートしていない場合、ELISA 法による定量では、漏出量は 3 日目 33.2 μ g、7 日目 43.2 μ g であり、漏出率は 3 日目 6.26%、7 日目 8.15% となった。BCA 法による定量では、漏出量は 3 日目 404.0 μ g、7 日目 1140.0 μ g であり、漏出率は 3 日目 5.05%、7 日目 14.25% となった。ELISA 法、BCA 法のどちらの定量においても前房水のベバシズマブ量に徐放効果が認められた。リポソーム表面をヒト血清アルブミンコートした場合、漏出量は、3 日目 0.882 μ g、7 日目 0.825 μ g、14 日目 1.729 μ g、30 日目 3.783 μ g、45 日目 1.823 μ g、60 日目 6.587 μ g であり、漏出率は 3 日目 0.71%、7 日目 0.66%、14 日目 1.38%、30 日目 3.03%、45 日目 1.46%、60 日目 5.27% であった。モデル動物においても、in vitro 同様、薬物を内包した標的指向性リポソームは薬剤徐放効果を有することがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Ito Y, Saishin Y, Sawada O, Kakinoki M, Miyake T, Sawada T, Kawamura H, Ohji M: Comparison of single injection and three monthly injections of intravitreal bevacizumab for macular edema associated with branch retinal vein occlusion. *Clinical ophthalmology* 2015;9:175-180. 査読有, doi: 10.2147/OPHT.S76261.

Ichiyama Y, Sawada T, Kakinoki M, Sawada O, Nakashima T, Saishin Y, Kawamura H, Ohji M: Anterior chamber paracentesis might prevent sustained intraocular pressure elevation after intravitreal injections of ranibizumab for age-related macular degeneration. *Ophthalmic research* 2014;52:234-238. 査読有, doi: 10.1159/000365253.

Fujikawa M, Kawamura H, Kakinoki M, Sawada O, Sawada T, Saishin Y, Ohji M:

Scleral imbrication combined with vitrectomy and gas tamponade for refractory macular hole retinal detachment associated with high myopia. *Retina* 2014;34:2451-2457. 査読有, doi: 10.1097/IAE.0000000000000246.

Wang X, Sawada T, Sawada O, Saishin Y, Liu P, Ohji M: Serum and plasma vascular endothelial growth factor concentrations before and after intravitreal injection of aflibercept or ranibizumab for age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology* 2014;158:738-744 e731. 査読有, doi: 10.1016/j.ajo.2014.06.009.

Sawada T, Kakinoki M, Wang X, Kawamura H, Saishin Y, Ohji M: Bimonthly injections of ranibizumab for age-related macular degeneration. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2014;252:1545-1551. 査読有, doi: 10.1007/s00417-014-2612-8.

Wang X, Sawada T, Kakinoki M, Miyake T, Kawamura H, Saishin Y, Liu P, Ohji M: Aqueous vascular endothelial growth factor and ranibizumab concentrations after monthly and bimonthly intravitreal injections of ranibizumab for age-related macular degeneration. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology* 2014;252:1033-1039. 査読有, doi: 10.1007/s00417-013-2505-2.

Kakinoki M, Sawada O, Sawada T, Saishin Y, Kawamura H, Ohji M: Effect of vitrectomy on aqueous vegf concentration and pharmacokinetics of bevacizumab in macaque monkeys. *Investigative ophthalmology & visual science* 2012;53:5877-5880. 査読有, doi: 10.1167/iovs.12-10164.

Kanai H, Shiba T, Hori Y, Saishin Y, Maeno T, Takahashi M: [prevalence of sleep-disordered breathing in patients with retinal vein occlusion]. *Nippon Ganka Gakkai zasshi* 2012;116:81-85. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

Iwasa M, Saishin Y, Wang X, Ohji M: Characterization and evaluation of sugar-chain modified liposome encapsulated with human immunoglobulin for intravitreal administration. Annual Meeting of

Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2014, 2014年05月04日~2014年05月08日, ORLANDO, FL, U.S.A.

Sawada T, Wang X, Sawada O, Saishin Y, Ohji M: Bimonthly injections of ranibizumab for age-related macular degeneration. Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2014, 2014年05月04日~2014年05月08日, ORLANDO, FL, U.S.A.

Wang X, Sawada T, Sawada O, Saishin Y, Ohji M: Serum and aqueous vascular endothelial growth factor concentration of patients with age-related macular degeneration after intravitreal injection of aflibercept. Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2014, 2014年05月04日~2014年05月08日, ORLANDO, FL, U.S.A.

Ichiyama Y, Kawamura H, Fujikawa M, Sawada O, Saishin Y, Ohji M: Photoreceptor outer segment length and outer foveal thickness as predictive factors associated with visual outcome after vitrectomy for vitreomacular traction syndrome. Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2014, 2014年05月04日~2014年05月08日, ORLANDO, FL, U.S.A.

Obata S, Iwasaki K, Fujikawa M, Kakinoki M, Sawada O, Saishin Y, Kawamura H, Ohji M: Changes of retinal thickness after vitrectomy for epiretinal membrane with and without internal limiting membrane peeling. Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2014, 2014年05月04日~2014年05月08日, ORLANDO, FL, U.S.A.

Saishin Y, Sawada O, Fujikawa M, Sawada T, Kawamura H, Ohji M: Two-year efficacy of six monthly injections of intravitreal bevacizumab for macular edema associated with central retinal vein occlusion. The 8th Asia-Pacific Vitreo-retinal Society Congress 2013, 2013年12月06日~2013年12月08日, Nagoya, Japan.

Wang X, Sawada T, Kakinoki M, Miyake T, Kawamura H, Saishin Y, Liu P, Ohji M: Aqueous Vascular Endothelial Growth Factor and Ranibizumab Concentrations after Monthly and Bimonthly Intravitreal Injections of Ranibizumab for Age-Related Macular Degeneration. Annual Meeting of Association for Research in Vision and

Ophthalmology, 2013, 2013年05月05日~2013年05月09日, S e a t t l e, U.S.A.

Sawada T, Kakinoki M, Wang X, Kawamura H, Saishin Y, Ohji M: The efficacy of bimonthly injection of ranibizumab for age-related macular degeneration for six months. Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2013, 2013年05月05日~2013年05月09日, S e a t t l e, U.S.A.

Ichiyama Y, Sawada T, Kakinoki M, Sawada O, Saishin Y, Kawamura H, Ohji M: A lack of delayed intraocular pressure elevation after intravitreal injections of ranibizumab for age-related macular degeneration. Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2013, 2013年05月05日~2013年05月09日, S e a t t l e, U.S.A.

Ito Y, Saishin Y, Sawada O, Kakinoki M, Miyake T, Sawada T, Kawamura H, Ohji M: Intravitreal Injections of Bevacizumab in Patients with Macular Edema Following Branch Retinal Vein Occlusion; 1-Year Outcomes. The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress, 2012年04月13日~2012年04月16日, Busan, Korea.

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西信 良嗣 (SAISHIN, Yoshitsugu)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号: 30379193

(2) 研究分担者

大路 正人 (OHJI, Masahito)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90252650