

金属配位結合を利用した新しい薬物ターゲティング法
による新生血管性眼疾患の治療

(研究課題番号 12470362)

平成 12 年度～平成 14 年度科学研究費補助金
(基盤研究(B)(2))

研究成果報告書



平成 15 年 3 月

研究代表者 田畑 泰彦

(京都大学再生医科学研究所)

金属配位結合を利用した新しい薬物ターゲティング法
による新生血管性眼疾患の治療

(研究課題番号 12470362)

平成 12 年度～平成 14 年度科学研究費補助金
(基盤研究(B)(2))

研究成果報告書

平成 15 年 3 月

研 究 代 表 者 田 畑 泰 彦

(京都大学再生医科学研究所)

はしがき

眼科領域における新生血管性の疾患は多く知られている。特に、加齢性黄斑変性症、あるいは糖尿病網膜症などは、欧米あるいはわが国において失明原因の第一位となっている。しかしながら、現在、これらの疾患に対する薬物治療法はなく唯一、臨床的には、新生血管をレーザーで破壊するという対処療法が行なわれ、その症状の進行を遅延させているだけである。

血管新生を抑制する作用をもつ薬物の開発とその治療への試みが行われるが、薬物自身に新生血管への指向性がなく、その薬物効果はほとんど期待できない。一般に、薬物の生体内半減期は短く、単に水溶液として投与するだけでは期待する薬効は得られないのが当然である。また、標的指向性のない薬物の治療効果を得るために大量投与が行われ、これが薬物の副作用を拡大している。そこで、薬効を損なうことなく投与薬物量を低下し、副作用を軽減させるためにドラッグデリバリーシステム（DDS）の研究が行われている。すなわち、薬物の生体内での安定性を高めたり、薬物をその標的作用部位へ選択的に作用させるという研究である。1つのDDSのアプローチとして、臓器あるいは組織に対する親和性をもつ高分子と薬物とを複合体化し、薬物をそれらの部位へターゲティングする試みがある。ところが、これまでの薬物と高分子との複合体化は化学結合によって行われていた。化学反応は時として煩雑で再現性に乏しく、反応による薬物活性の低下は避けられない。このことが、薬物の有効性を有意に高めるという多くの報告にもかかわらず、薬物-高分子複合体の臨床応用に対する一つのボトルネックになっている。

本研究の目的は、金属配位結合を利用することによって薬物を高分子と複合体化させ、薬物を新生血管部位へターゲティングすることである。配位結合は金属アフィニティクロマトグラフィに用いられている。これは、タンパク質が金属とキレートする性質を利用して、タンパク質をアフィニティ担体に結合、分離精製する方法である。もし薬物運搬体としての水溶性高分子がキレート能をもっていれば、配位結合を介してタンパク質薬物と高分子との間には複合体が形成される。この配位結合を薬物のDDS化技術に応用した例は国内外を通じて皆無である。また、新生血管性眼疾患の治療を目指した薬物のターゲティングの試みもこれま

でに報告がない。

本研究の独創的な点は、薬物と高分子との複合体化に金属配位結合を利用することである。化学結合法のように複雑なプロセスは必要とせず、金属イオンの存在下、薬物と高分子とを単に混合するだけで薬物－高分子複合体を作製できる。また、金属アフィニティクロマトグラフィにて分離精製されたタンパク質の活性は 100%保持されることから、化学結合法における薬物の活性低下の問題も、配位結合法ではクリアできるであろう。もう一つの独創的な点は、高分子と複合体化することにより、薬物を新生血管部位へターゲティングすることである。本研究では、血管新生抑制作用をもつインターフェロン（IFN）を薬物に選び、実験を進める。まず、金属キレート残基をもつ水溶性高分子を作製する。これらの高分子を金属イオンの存在下、IFN と混合し複合体を得る。新生血管性眼疾患モデル動物を作製、それらを用いて複合体の体内動態、特に、新生血管への集積性を調べる。最後に、複合体を用いた治療実験を行い、その薬物活性を評価する。

この研究目的が達成されれば、血管新生性眼疾患の治療へ革新的なインパクトを与えることは疑いない。もちろん、これらの研究成果により眼疾患への薬物治療の道が開かれ、その学術的、臨床的、および社会的な意義の大きさは計り知れない。

研究組織

研究代表者：田畑泰彦（京都大学・再生医科学研究所・教授）

研究分担者：小椋祐一郎（名古屋市立大学・医学研究科・教授）

研究経費

平成 12 年度	5,100 千円
平成 13 年度	4,100 千円
平成 14 年度	4,800 千円
計	14,000 千円

研究発表

学会誌等

- 1) Yasukawa, T., Kimura, H., Tabata, Y., Miyamoto, H., Honda, Y., Ikada, Y., and Ogura, Y.: Active drug targeting with immunoconjugates to chroidal neovascularization. *Curr. Eye Res.*, 21(6): 952-961 (2000)
- 2) Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Targeting of plasmid DNA to the liver through pullulan conjugation based on metal coordination. *Proceedings of the 5th Asian Symposium on Bimedical Materials (ASBM5)*, Cheng, J., and Leng, Y. Eds., Hong Kong: 323-328 (2001)
- 3) Suginoshta, Y., Tabata, Y., Moriasu, F., Ikada, Y., and Chiba, T.: Liver targeting of interferon-b with a liver affinity polysaccharide based on metal corrdination in mice. *J. Pharm. Exp. Therap.*, 298(2): 805-811 (2001)
- 4) Kamizuru, H., Kimura, H., Yasukawa, T., Tabata, Y., Hinda, Y., and Ogura, Y.: Monoclonal anti-body-mediated drug targeting to choroidal neovascularization in the rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42(11): 2664-2672 (2001)
- 5) Yasukawa, T., Kimura, H., Tabata, Y., and Y. Ogura.: Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. *Adv. Drug Delivery Review*, 52(1): 25-36 (2001)
- 6) Kimura, H., Yasukawa, T., Tabata, Y., and Ogura, Y.: Drug targeting to choroidal neovascularization. *Adv. Drug Delivery Review*, 52(1): 79-91 (2001)
- 7) Hosseinkahni, H., Aoyama, T., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Liver targeting of plasmid DNA by pullulan with metal coordination. *J. Control. Release*, 83(2): 287-302 (2002)
- 8) Hosseinkahni, H., Aoyama, T., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Tumor targeting of gene expression through metal-coodinated conjugation with dextran. *J. Control. Release*, 88: 297-312 (2003)
- 9) Yasukawa, T., Kimura, H., Tabata, Y., Kamizuru, H., Miyamoto, H., Honda, Y., Ogura, Y.: Targeting of interferon to choroidal neovascularization by use of dextran and metal coordination. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43: 842-848 (2002)
- 10) Yasukawa, T., Kimura, H., Tabata, Y., Miyamoto, H., Honda, Y., Ogura, Y.: Sustained release of cis-hydroxy proline in the treatment of epiretinal proliferative vitreoretinopathy in the rabbit. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 240: 672-678 (2002)

- 11) Yasukawa, T., Kimura, H., Dong, J., Tabata, Y., Miyamoto, H., Honda, Y., Ogura, Y.: Effects of tranilast on proliferation, collagen gel contraction, and transforming growth factor beta secretion of retinal pigment epithelial cells and fibroblasts. *Ophthalmic. Res.*, 34: 206-212 (2002)
- 12) Yasukawa, T., Kimura, H., Tabata, Y., Miyamoto, H., Honda, Y., Ikada, Y., Ogura, Y.: Active drug targeting with immunoconjugates to chroidal neovascularization. *Curr. Eye Res.*, (in press)
- 13) Suginoshta, Y., Tabata, Y., Matsumura, T., Toda, Y., Nabeshima, M., Moriasu, F., Ikada, Y., and Chiba, T.: Liver targeting of human interferon-b with pullulan based on metal corrdination. *J. Control. Release.*, 83(1): 75-88 (2002)

口頭発表

- 1) 上水流広史、木村英也、安川 力、田畑泰彦、本田孔士、小椋祐一郎: 抗インテグリンモノクローナル抗体を用いたラットレーザー脈絡膜新生血管モデルに対する薬物ターゲティング. 日本眼科学会第104回大会 (2000.4.5-8 京都)
- 2) Kimura, H., Yasukawa, T., Ogura, Y., Tabata, Y., and Honda, Y.: The potential of active drug targeting with immunoconjugates to choroidal neovascularization. Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology (2000.4.30-5.5 Florida)
- 3) Miyamoto, H., Yasukawa, T., Kimura, H., Ogura, Y., Honda, Y., and Tabata, Y.: Effect of tranilast on collagen gel contraction, proliferation, and TGF beta secretion of retinal pigment epithelial cells and fibroblasts. Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology (2000.4.30-5.5 Florida)
- 4) Kamizuru, H., Kimura, H., Yasukawa, T., Tabata, Y., Honda, Y., and Ogura, Y.: Monoclonal antibody-mediated drug targeting to laser-induced choroidal neovascularization in the rat. Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology (2000.4.30-5.5 Florida)
- 5) Yasukawa, T., Kimura, H., Ogura, Y., Kamizuru, H., Honda, Y., and Tabata, Y.: Targeting of interferon beta to choroidal neovascularization by use of dextran and metal coordination. Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology (2000.4.30-5.5 Florida)
- 6) 安川 力、田畑泰彦、木村英也、上水流広史、本田孔士、小椋祐一郎: 金属

- 配位結合を利用したインターフェロン β の高分子化による加齢黄斑変性に対するターゲティング療法. 第16回日本DDS学会(2000.7.28-29 秋田)
- 7) 上水流広史、木村英也、安川 力、田畑泰彦、本田孔士、小椋祐一郎: 抗インテグリンモノクローナル抗体をキャリアとしたラットレーザー脈絡膜新生血管モデルに対するアクティブドラッグターゲティング. 第16回日本DDS学会(2000.7.28-29 秋田)
- 8) 杉之下与志樹、田畑泰彦、千葉 勉、筏 義人: 配位結合を利用したプルランとの複合体化によるヒトIFN活性の肝へのターゲティング. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2000(2000.11.7-8 横浜)
- 9) Tabata, Y., and Ikada, Y.: Anti-Tumor Effects of PEG-Modified Fullerene Combined with External Physical Stimuli. 国際フラーレンワークショップ2001(2001.2.20-21 東京)
- 10) 沖 龍馬、杉之下与志樹、田畑泰彦: 薬物キャリアとしてのキレート残基をもつプルランの作製. 第47回高分子研究発表会(2001.7.6 神戸)
- 11) 沖 龍馬、杉之下与志樹、田畑泰彦: キレート残基導入プルランを用いたIFN活性の肝臓ターゲティング. 第17回日本DDS学会(2001.7.12-13 大阪)
- 12) 山本雅哉、城潤一郎、青山輝義、Hosseinkhani, H., 小川 修、田畑泰彦: 劇症肝炎の発症予防におけるプラスミドDNA-プルラン複合体の有効性. 第18回日本DDS学会(2002.6.21-22 札幌)
- 13) Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Tumor targeting of plasmid DNA by dextran conjugation based on metal coordination. 第18回日本DDS学会(2002.6.21-22 札幌)
- 14) 城潤一郎、山本雅哉、田畑泰彦: キレート残基をもつプルランとプラスミドDNAとの金属配位複合体化. 第48回高分子研究発表会(2002.7.12 神戸)
- 15) 山本雅哉、城潤一郎、青山輝義、Hosseinkhani, H., 小川 修、田畑泰彦: HGFプラスミドDNAの肝臓ターゲティングによる劇症肝炎の発症予防. 第24回日本バイオマテリアル学会大会(2002.11.29-30 東京)
- 16) Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Liver targeting of plasmid DNA through metal-coordinated conjugation of pullulan. IUPAC Polymer Conference on the Mission and challenges of Polymer Science and Technology(2002.12.2-5 Kyoto)

研究成果

平成 12 年度

本研究の目的は、加齢性黄斑変性症あるいは糖尿病網膜症などの疾患に対する薬物治療として、血管新生の抑制作用をもつ薬物、例えば IFN を新生血管へターゲティングするためのドラッグデリバリーシステム (DDS) を開発することである。方法としては、金属配位結合を利用することによって薬物を高分子と複合化させ、薬物を新生血管部位へターゲティングする。平成 12 年度では、薬物を修飾するための金属キレート残基をもつ水溶性高分子を作製した。用いた水溶性高分子はデキストランあるいはプルランである。これらの高分子とジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA) 無水物とをジメチルホルムアミド中で反応させることによって、金属キレート DTPA 残基を導入した高分子を調製した。反応条件を変えることで DTPA の導入率を変化させることができた。血管新生抑制作用をもつ IFN を DTPA 残基導入デキストランあるいはプルランと亜鉛の存在下、混合することによって IFN-高分子複合体を作製した。溶液の混合前後の液体クロマトグラフィーを測定したところ、金属イオンを介して IFN と DTPA 残基導入高分子との間に複合体が出来ていることを確認した。予備的に、IFN と高分子との複合体を網膜に新生血管をもつモデルウサギに静脈内投与したところ、複合体が網膜の新生血管部位へ蓄積していることがわかった。遊離 IFN 投与の場合には、ほとんど新生血管部位への蓄積は見られなかった。

平成 13 年度

本研究の目的は、加齢性黄斑変性症あるいは糖尿病網膜症などの疾患に対する薬物治療として、血管新生の抑制作用をもつ薬物、例えばインターフェロン (IFN) - β を新生血管へターゲティングするためのドラッグデリバリーシステム (DDS) を開発することである。方法としては、金属配位結合を利用することによって薬物を高分子と複合化させ、薬物を新生血管部位へターゲティングする。薬物 (IFN) を修飾するための金属キレート残基をもつ水溶性高分子を作製した。用いた水溶性高分子はデキストランあるいはプルランである。これらの高分子とジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA) 無水物とをジメチルホルムアミド中で反応させることによって、金属キレート DTPA 残基を導入した高分子を調製した。スペルミン、スペルミ

ジンなどをカルボジジイミダゾールを用いて水溶性高分子の水酸基と結合させ、それぞれのキレート残基を導入した高分子を調製した。反応試薬の添加量、反応時間などの反応条件を変えることで金属キレート残基の導入率を変化させることができた。血管新生抑制作用をもつ IFN をキレート残基導入デキストランあるいはプルランと亜鉛の存在下、混合することによって IFN-高分子複合体を作製した。溶液の混合前後の液体クロマトグラフィーを測定したところ、いずれの高分子誘導体においても、金属イオンを介して IFN と金属キレート残基導入高分子との間に複合体が出来ていることを確認した。これらの IFN と高分子との金属配位複合体をマウスの静脈内に投与した後の肝臓での IFN の生物活性を調べた。その結果、スperlミンを導入した高分子誘導体が、もっとも高い活性を示した。予備的に、IFN と高分子との複合体を網膜に新生血管をもつモデルウサギに静脈内投与したところ、複合体が網膜の新生血管部位へ蓄積していることがわかった。遊離 IFN 投与の場合には、ほとんど新生血管部位への蓄積は見られなかった。

平成 14 年度

前年度、前々年度の 2 年間にわたる研究成果によって、薬物の新生血管部位へのターゲティングのための水溶性高分子にはデキストランが最適であることがわかった。そこで、デキストランにジエチレントリアミノペンタ酢酸 (DTPA) をキレート残基として導入した。この DTPA 導入デキストランを亜鉛の存在下、インターフェロン (IFN) - β と水溶液状態で混合した。これらの混合物を網膜に新生血管をもつウサギモデルに静脈内投与を行った。新生血管部位における IFN の蓄積量を ELISA によって定量したところ、遊離 IFN の静脈内投与に比較して、有意に IFN 活性の高いことがわかった。このことは、金属配位結合を利用してデキストランと複合化させることにより、IFN を網膜下新生血管部位へターゲティングできることを示している。新生血管の状態を蛍光物質の血管からのもれを眼底カメラにより検出、定量化することにより調べた。その結果、複合体の投与により、蛍光物質のもれが抑制され、IFN の作用により新生血管が消失、治療効果が認められた。遊離 IFN 投与ではこのような治療効果は見られず、期待通りの IFN のターゲティング効果が実験的に確認、証明された。血管新生モデルをレーザー照射法あるいは bFGF 徐放法の両方にて作製し、その両モデルについての治療実験を行ったが、いずれのモデルにおいても、金属配位結合法による IFN のターゲティングによる有効な治療効果が認められた。