

脂質微粒子リポソームを用いた脳梗塞治療法の開発

福田 達也^{1,2}, 奥 直人^{2,3}

1. はじめに

脳梗塞は、死因別死亡率、および要介護に至る原因疾患の上位である脳血管障害の約6割を占める。その標準治療として、組織プラスミノゲン活性化因子 (tissue plasminogen activator: t-PA) 製剤を用いた血栓溶解療法が適用されており、速やかな血流再開は脳を一時的に障害から保護することができる。しかし、t-PAや外科的手術により血流を再開できたとしても、酸化ストレスや炎症による二次的な障害、脳虚血/再灌流障害が生じ、運動機能不全などの患者予後不良につながる。また、t-PAは投与開始が遅延するに伴い、副作用である脳出血や神経毒性を惹起することから、有効な治療可能時間 (therapeutic time window: TTW) は脳梗塞発症後4.5時間以内と限定されている。日本を含む限られた国においては、ラジカルスカベンジャーであるエダラボンが脳保護薬として認可されているが、世界的に用いられる脳保護薬は存在せず、上述したような問題を改善する新たな脳保護薬の開発が望まれている¹⁾。

脳への薬物送達においては、脳への物質輸送を厳密に制御する血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) を越える必要がある。しかし脳梗塞時には、種々の因子によって虚血巣周辺のBBBを構成するタイトジャンクションが傷害されることで、脳血管透過性が亢進することが実験等物およびヒトにおいて報告されている²⁾。筆者らはこの特殊な病

態に着目し、ドラッグデリバリーシステム (DDS) のキャリアである脂質微粒子リポソームを用いた脳梗塞部位への薬物送達と治療を試みてきた。本稿では筆者らの研究成果を中心に、リポソームをはじめとするナノ粒子を用いたDDSによる脳梗塞治療の有用性について紹介する。

2. 脳虚血/再灌流部位へのリポソームの集積

リポソームの脳虚血/再灌流部位における分布を解析するにあたり、脳梗塞モデルとして汎用される一過性中大脳動脈閉塞 (transient middle cerebral artery occlusion: t-MCAO) ラットを用いて検討を行った。本モデルは、中大脳動脈の起始部へとナイロン栓子を挿入することで物理的に脳虚血を、またそれを引き抜くことで再灌流を引き起こすことが可能である。虚血時間を1時間に設定し、蛍光標識したポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームを再灌流0, 1, 3, 6, または24時間後に尾静脈内投与し、それぞれ投与1時間後の脳スライス中の蛍光を観察した。なお、リポソームの脂質組成は、安定な組成として汎用されるジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)/コレステロール (Cho)/ジステアロイルホスファチジエタノールアミン (DSPE)-PEG2000 = 10/5/0.5 (mol%) とした。その結果、再灌流後早期 (0~3時間後) に投与したリポソームの集積が虚血側脳半球 (右脳) においてのみ認められた。一方、脳細胞死を可視化する2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) 染色を行ったところ、虚血/再灌流による目立った脳細胞死は再灌流3時間後以降に観察された。このことから、虚血/再灌流に伴うBBB破綻は、顕著な脳細胞死が生じる以前の早期から生じ、障害が拡大する前から、リポソームによる脳実質への薬物送達が可能であることが明らかとなった³⁾。また、再灌流直後に投与し、脳実質へ移行したリポソームがその24時間後においても蓄積しているようすが観察された。がん治療を目的としたナノDDSにおいては、腫瘍新生血管の透過性亢進とがん組織の未発達なリンパ系の構築に基づいたenhanced permeability and retention (EPR) 効果によるパッシブターゲティングが広く知られており、Doxil®のように実用化されている製剤や、臨床試験中の製剤も多く存在する。脳虚血/再灌流後の破綻したBBBの間隙を介した患部へのリポソーム集積も、がん組織におけるEPR効果と同様の機

¹ 徳島大学大学院医歯薬学研究部 (薬学域) 衛生薬学分野 (〒770-8505 徳島県徳島市庄町1丁目78-1)

² 静岡県立大学大学院薬学研究院医薬生命化学講座 (〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田52-1)

³ 帝京大学薬学部 (〒173-8605 東京都板橋区加賀2-11-1)

Development of a new therapy for ischemic stroke by use of liposomal drug delivery system

Tatsuya Fukuta^{1,2} and Naoto Oku^{2,3} (¹Department of Pharmaceutical Health Chemistry, Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima University, Shomachi 1, Tokushima 770-8505, Japan, ²Department of Medical Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, ³Faculty of Pharma-Science, Teikyo University, 2-11-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910399

© 2019 公益社団法人日本生化学会

構により生じていると考えられる。

3. リポソーム化脳保護薬による脳虚血／再灌流障害の治療

脳保護薬としてエリスロポエチン（EPO）の代謝体であるアシアロエリスロポエチン（AEPO）をリポソームに搭載し、脳虚血／再灌流障害に対する有効性を検討した。AEPOは神経細胞や脳血管内皮細胞の表面に発現するEPO受容体に結合し、下流のシグナルを活性化することで脳保護効果を示す。糖タンパク質であるAEPOはリポソーム内水相に封入することも可能であるが、リポソーム表面へ外挿することで、脳実質へ移行した後の速やかな受容体への結合と薬効発揮が期待できる（図1A）。また、AEPOは血中半減期がきわめて短いことが問題とされていたが、DSPC/Cho/DSPE-PEG2000=10/5/0.5（mol%）で構成されたPEGリポソームのPEG末端に修飾することで、血中滞留性と患部への移行性が有意に向上した。t-MCAOラットに対して、虚血／再灌流後にAEPOリポソームを投与し、その24時間後における脳保護効果をTTC染色により評価したところ、対照のPBS投与群、遊離のAEPO投与群と比較して、脳細胞傷害を有意に抑制した（図1B）。一方、AEPOを修飾していないPEGリポソームを投与した場合には治療効果が認められなかったことから、脳組織へ到達したAEPOが薬理効果を発揮することで脳保護効果を発揮し

たことが明らかとなった。さらに、AEPOリポソームの脳内挙動を観察したところ、虚血側脳半球において脳血管への結合（図1C）、そして神経細胞周辺への顕著な集積が認められた（図1D）。脳虚血に応答してEPO受容体の脳血管内皮細胞や神経細胞表面での発現が亢進することから、リポソーム表面のAEPOは受容体への結合による脳保護効果のみならず、虚血／再灌流部位への標的化因子として機能することが示唆された。また、脳梗塞患者が要介護に至る一因として半身麻痺などの運動機能不全があげられる。t-MCAOラットに対してAEPOリポソームを投与し、虚血／再灌流7日後まで運動機能を評価したところ、対照群と比較して運動機能不全の有意な改善効果が認められ、AEPOリポソームの脳保護薬としての有用性が示された^{3,4)}。

また筆者らは、脳保護効果が知られる低分子医薬品のリポソーム製剤を構築し、脳梗塞治療へ応用してきた。一つは、免疫抑制剤として上市されているカルシニューリン阻害剤タクロリムス、もう一つは、くも膜下出血術後の脳血管攣縮およびこれに伴う脳虚血症状の改善に用いられるRhoキナーゼ阻害剤ファスジルである。詳細は割愛させていただくが、いずれのリポソーム製剤も、虚血／再灌流後に生じる炎症などを抑制することで高い脳保護効果を示すことを明らかとした^{5,6)}。脂質二分子膜で形成され内水相を有するリポソームは、化学結合などを利用した薬物の脂質膜表面への修飾や、脂質膜中あるいは内水相への封入が可能である。実際に、さまざまなタンパク質製剤や低分

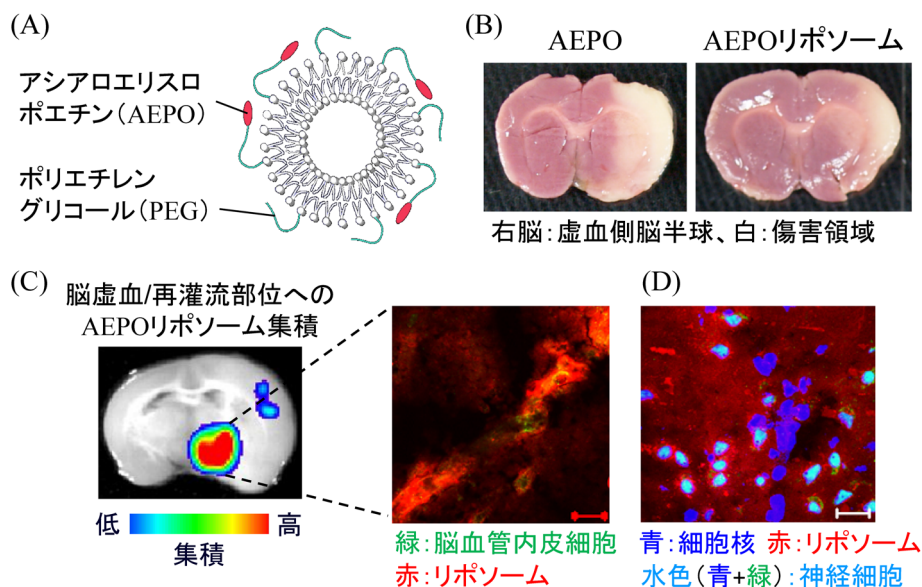


図1 AEPOリポソームの脳虚血／再灌流部位への集積と脳保護効果

(A) AEPOリポソームの模式図。(B) AEPOリポソームによる脳虚血／再灌流障害の抑制効果。AEPOリポソームは1時間の虚血、再灌流直後に静脈内投与し、その24時間後に脳保護効果を評価した。(C, D) AEPOリポソームの虚血／再灌流部位への集積。蛍光イメージングにてAEPOリポソームの集積が認められた脳切片に対して組織免疫染色を行い、脳血管内皮周辺(C)、および神経細胞周辺(D)におけるリポソーム分布を共焦点顕微鏡により観察した。文献3, 4より改変して引用。

子化合物のDDSキャリアーとしてリボソームを用いた例が近年多く報告されている。エダラボンに次ぐ脳保護薬としてこれまでに開発されてきた候補化合物は、脳への非特異的な分布による副作用や、BBBの存在に起因する低薬効などが問題となり、臨床応用が困難とされてきた。そのため、脳梗塞部位への選択的な薬物送達を可能とするリボソームDDSは、従来脳梗塞に対する有効性が報告されてきた種々の候補化合物に適用できる可能性がある。

4. 血栓溶解剤t-PAとリボソーム化脳保護薬の併用療法

臨床の脳梗塞治療における問題点として、脳虚血/再灌流障害に加え、t-PA血栓溶解療法の適用患者の限定があげられる。t-PA製剤は世界的に用いられる唯一の脳梗塞急性期の治療薬であり、外科的手術でも除去できない血栓にも適用可能である等の利点もある。ゆえに、t-PA処置により誘発される脳出血の抑制や有効なTTWの延長は、適用患者の増加につながり、脳梗塞患者の予後改善につながることが期待される。脳梗塞時のBBBの透過性亢進は、再灌流後のみならず、脳虚血時においても生じることが報告されている⁷⁾。そのためt-PAによる血流再開前の虚血時から、リボソームによって患部へ脳保護薬を効率的に送達できれば、虚血/再灌流障害の抑制のみならず、t-PAの上

記問題点の改善が期待される。筆者らは、t-PAを用いた血流再開を再現可能な脳梗塞モデルとして、光増感反応により脳血管内に血栓を形成可能なphotochemically induced thrombosis (PIT) 法によるMCAOラットを導入し、リボソーム製剤とt-PAの併用療法の検討を行った。まず、粒子径約100nmの蛍光標識PEGリボソームをPIT法による血栓形成後に静脈内投与し、一定時間後の脳内分布を観察することで、虚血時に投与したリボソームの患部への送達を評価した。その結果、虚血による顕著な脳細胞死が生じる以前の時間帯から、虚血側脳半球におけるリボソーム集積が認められ、さらにその集積量は経時的に増加した。同様の結果が、栓子法によるt-MCAOラットを用いた場合でも得られており⁸⁾、t-PAによる血流再開前から、リボソームによる脳梗塞部位への薬物送達が可能であることが示唆された。

そこで、脳保護薬としてRhoキナーゼ阻害剤ファスジルを用い、t-PAとの併用効果を検討した。脳梗塞時にはRhoキナーゼが活性化し、血管内皮細胞の傷害や炎症細胞の浸潤が生じること、またt-PAにより生じたプラスミンがRhoキナーゼを活性化し、脳出血に関与するmatrix metalloproteinase (MMP)-2、-9の活性化やBBBの破綻が促進される。ゆえに、ファスジルによるRhoキナーゼ阻害は、脳保護のみならず、t-PAが誘発する脳出血の抑制につながることが

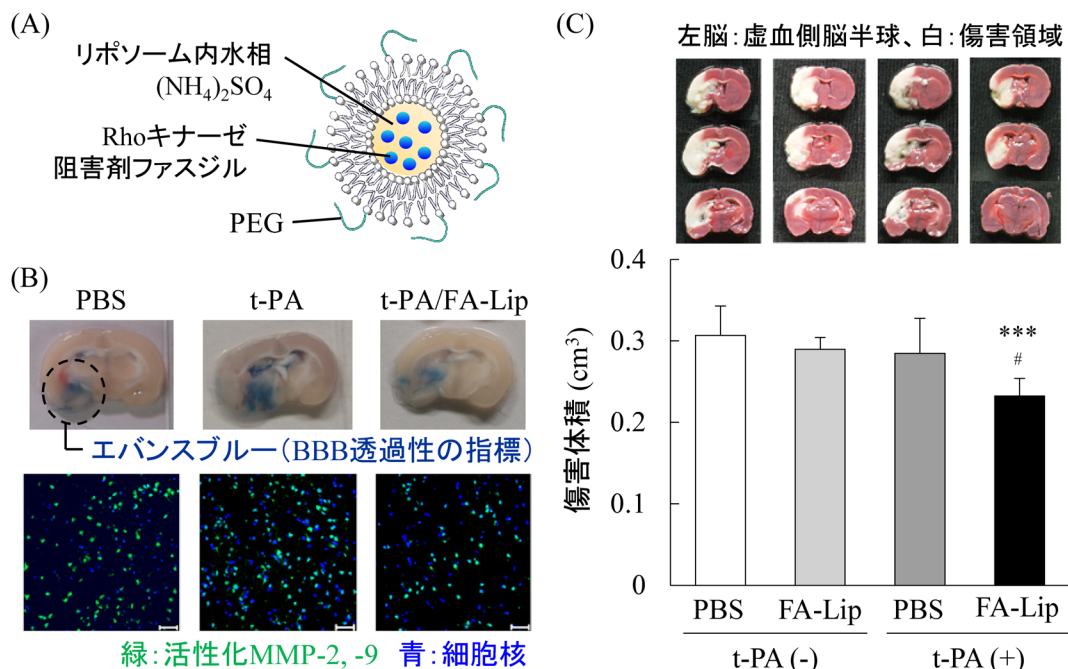


図2 血栓溶解剤t-PAとリボソーム化脳保護薬の併用による脳梗塞治療

(A) リボソーム化ファスジル (FA-Lip) の模式図。(B) エバンスブルーを用いたBBB透過性 (上図) と、脳切片におけるMMP-2、-9活性 (下図, *in situ* zymography) の評価。FA-Lip, t-PAはそれぞれ梗塞1, 3時間後に投与し、梗塞開始24時間後にそれぞれの評価を行った。(C) t-PA/FA-Lip併用療法の脳保護効果。梗塞24時間後に脳を摘出し、TTC染色により治療効果を評価した。*** $P < 0.001$ vs. PBS (t-PA(-)), * $P < 0.05$ vs. FA-Lip (t-PA(-)), PBS (t-PA(+))。文献9より改変して引用。

期待される。リポソーム化ファスジル (FA-Lip) は、リポソーム内外水相の硫酸アンモニウム濃度勾配を利用したリモートローディング法により作製し、リポソームの脂質組成はジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)/Cho/DSPE-PEG2000=10/5/1 (mol%) とした (図2A)。AEPO リポソームの調製時にはDSPCを基本脂質としていたが、FA-Lip調製時には、リポソーム内水相からのファスジルのリリースを考慮し、相転移温度がDSPCと比較して低いDPPCを用いた。ヒトにおいてはt-PAのTTWは4.5時間であるが、PIT法によるMCAOラットでのTTWは梗塞2時間後程度であることがTTC染色の検討から同定されたため、FA-Lipおよびt-PAの投与時間をそれぞれ梗塞1, 3時間後に設定した。なおラットにおけるTTWは、文献を参照に、梗塞24時間後に摘出した脳スライスのTTC染色の結果から、有意な脳保護効果が認められるt-PAの投与時間とした⁹⁾。t-PA処置は、虚血側脳半球においてBBBの透過性亢進と、広域にわたるMMP-2, -9活性の増大を引き起こした一方、FA-Lipの虚血時投与によってそれらが顕著に抑制された (図2B)。さらに、t-PA/FA-Lip併用療法は、梗塞24時間後において各単独投与群と比較して有意に高い脳保護効果を示した (図2C)。また、t-PAの投与時間を梗塞3時間後から4.5時間後にした場合、また、FA-Lipの投与をt-PAと同時に梗塞3時間後に行った場合にもt-PA/FA-Lip併用群は対照群と比較して梗塞24時間後における脳細胞傷害を有意に抑制し、2時間程度であるTTWを少なくとも2倍に延長できる可能性を示した¹⁰⁾。筆者らは、t-PAの投与が虚血部位へのリポソーム集積を向上させるという結果を得ており¹¹⁾、これによりリポソームに内封されたファスジルの患部への移行量が増加することで、高い脳保護効果を発揮したと考察している。以上の結果より、FA-Lipとt-PAの併用療法は、t-PAにより誘発される脳出血の抑制と、TTWの延長を可能とすることが明らかとなり、脳梗塞治療における問題の改善につながる事が示唆された。

5. ナノ粒子を用いた脳梗塞治療

筆者らの知見を中心に、脂質微粒子リポソームを用いた脳梗塞治療について紹介したが、他の研究チームによるナノ粒子を用いた近年の報告をいくつか紹介する。主なアプローチとして、ナノ粒子表面への脳梗塞部位標的化リガンドの修飾によるアクティブターゲティングが報告されている。Agullaらは、虚血巣周辺にてヒートショックプロテイン (HSP) 72が高発現することを見だし、抗HSP72抗体をPEGリポソームに修飾することで、高い標的化能を発揮できることを明らかにした¹²⁾。またZhaoらは、脳血管内皮細胞に高発現するトランスフェリン受容体 (TfR) に対する標的化ペプチド (HAIYPRH) と、*in vivo* フェージ

ディスプレイ法により見いだされた虚血部位の神経細胞標的化ペプチド (CLEVSRKNC) という、二つのペプチドをPEGリポソーム表面に修飾した複標的化リポソームを報告している。治療薬剤を搭載した複標的化リポソームは、それぞれのペプチドを単独で修飾したリポソームに比べて有意に高い脳梗塞部位への集積性を示すとともに、高い脳保護効果を発揮した。二つのリガンドを修飾することで、リポソームが脳血管内皮細胞上に高発現するTfRへ結合した後、トランスサイトosisによってBBBを突破し、さらには神経細胞へと効率的にリポソームが送達されたためであると考察している¹³⁾。一方、生体内で細胞間情報伝達を担っており、リポソームと同様に脂質二分子膜から構成される細胞外微粒子、エクソソームを応用した例もある。間葉系幹細胞由来エクソソーム (MSC-Exo) は抗炎症効果を有し、かつBBBを透過できると報告されていたが、脳への標的性が不十分であるとされていた。Tianらは、脳虚血後にBBBで高発現する $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対する標的化リガンドcyclic-RGDをMSC-Exoに修飾することで、脳梗塞部位への標的性を付与し、さらには抗炎症効果を有するクルクミンをcyclic-RGD修飾MSC-Exoに封入することで、MSC-Exo単独と比較して、有意に高い抗炎症効果を発揮するナノ粒子の構築に成功している¹⁴⁾。エクソソームがBBBを突破するメカニズムはいまだ不明な点が多いが、脳への転移性を有するがん細胞由来のエクソソームがBBBを突破する際に関与するmicroRNAや受容体が明らかとされつつある^{15, 16)}。今後こうした知見が蓄積され、BBB突破に関与する因子をリポソームに組み込むことで、脳梗塞部位へのより効率的な薬物送達を可能とするDDSの開発が期待される。

6. おわりに

本稿では、脂質微粒子リポソームを用いた脳梗塞治療について解説した。脳梗塞時のBBBの透過性亢進はヒトにおいても生じると報告されていることから、リポソームを用いた治療法はヒトへの応用も期待できる。リポソームなどのナノ粒子を用いた脳梗塞治療に関する研究は近年展開され始めたばかりである。今後、DDSを用いた治療戦略の有用性が蓄積されるとともに、筆者らの知見が、新たな脳保護薬開発に向けた一助となることを祈念している。

文 献

- Moretti, A., Ferrari, F., & Villa, R.F. (2015) Neuroprotection for ischaemic stroke: Current status and challenges. *Pharmacol. Ther.*, **146**, 23–34.
- Latour, L.L., Kang, D.W., Ezzeddine, M.A., Chalela, J.A., & Warach, S. (2004) Early blood-brain barrier disruption in human

- focal brain ischemia. *Ann. Neurol.*, **56**, 468–477.
- 3) Ishii, T., Asai, T., Oyama, D., Fukuta, T., Yasuda, N., Shimizu, K., Minamino, T., & Oku, N. (2012) Amelioration of cerebral ischemia-reperfusion injury based on liposomal drug delivery system with asialo-erythropoietin. *J. Control. Release*, **160**, 81–87.
 - 4) Ishii, T., Asai, T., Fukuta, T., Oyama, D., Yasuda, N., Agato, Y., Shimizu, K., Minamino, T., & Oku, N. (2012) A single injection of liposomal asialo-erythropoietin improves motor function deficit caused by cerebral ischemia/reperfusion. *Int. J. Pharm.*, **439**, 269–274.
 - 5) Ishii, T., Asai, T., Oyama, D., Agato, Y., Yasuda, N., Fukuta, T., Shimizu, K., Minamino, T., & Oku, N. (2013) Treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury with PEGylated liposomes encapsulating FK506. *FASEB J.*, **27**, 1362–1370.
 - 6) Fukuta, T., Asai, T., Sato, A., Namba, M., Yanagida, Y., Kikuchi, T., Koide, H., Shimizu, K., & Oku, N. (2016) Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by intravenous administration of liposomal fasudil. *Int. J. Pharm.*, **506**, 129–137.
 - 7) Simpkins, A.N., Dias, C., Leigh, R., Benson, R.T., Hsia, A.W., Latour, L.L., Luby, M., Lynch, J.K., Merino, J.G., Nadareishvili, Z., et al.; National Institutes of Health Natural History of Stroke Investigators. (2016) Identification of reversible disruption of the human blood-brain barrier following acute ischemia. *Stroke*, **47**, 2405–2408.
 - 8) Fukuta, T., Ishii, T., Asai, T., Sato, A., Kikuchi, T., Shimizu, K., Minamino, T., & Oku, N. (2015) Treatment of stroke with liposomal neuroprotective agents under cerebral ischemia conditions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **97**(Pt A), 1–7.
 - 9) Umemura, K., Higo, K., Sakata, T., Yuki, S., Iwata, K., & Yamaguchi, K. (2008) Effects of alteplase, a thrombolytic agent, in a rat photothrombotic cerebral artery occlusion model. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, **36**, 245–250.
 - 10) Fukuta, T., Asai, T., Yanagida, Y., Namba, M., Koide, H., Shimizu, K., & Oku, N. (2017) Combination therapy with liposomal neuroprotectants and tissue plasminogen activator for treatment of ischemic stroke. *FASEB J.*, **31**, 1879–1890.
 - 11) Fukuta, T., Yanagida, Y., Asai, T., & Oku, N. (2018) Co-administration of liposomal fasudil and tissue plasminogen activator ameliorated ischemic brain damage in occlusion model rats prepared by photochemically induced thrombosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **495**, 873–877.
 - 12) Agulla, J., Brea, D., Campos, F., Sobrino, T., Argibay, B., Al-Soufi, W., Blanco, M., Castillo, J., & Ramos-Cabrer, P. (2013) *In vivo* theranostics at the peri-infarct region in cerebral ischemia. *Theranostics*, **4**, 90–105.
 - 13) Zhao, Y., Jiang, Y., Lv, W., Wang, Z., Lv, L., Wang, B., Liu, X., Liu, Y., Hu, Q., Sun, W., et al. (2016) Dual targeted nanocarrier for brain ischemic stroke treatment. *J. Control. Release*, **233**, 64–71.
 - 14) Tian, T., Zhang, H.X., He, C.P., Fan, S., Zhu, Y.L., Qi, C., Huang, N.P., Xiao, Z.D., Lu, Z.H., Tannous, B.A., et al. (2018) Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy. *Biomaterials*, **150**, 137–149.
 - 15) Tominaga, M., Kosaka, N., Ono, M., Katsuda, T., Yoshioka, Y., Tamura, K., Lötvall, J., Nakagama, H., & Ochiya, T. (2015) Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nat. Commun.*, **6**, 6716.
 - 16) Kuroda, H., Tachikawa, M., Yagi, Y., Nurdin, A., Miyauchi, E., Watanabe, M., Uchida, Y., & Terasaki, T. (2019) Cluster of differentiation 46 is the major receptor in human blood-brain barrier endothelial cells for uptake of exosomes derived from brain-metastatic melanoma cells (SK-Mel-28). *Mol. Pharm.*, **16**, 292–304.

著者寸描

●福田 達也 (ふくた たつや)



徳島大学大学院医歯薬学研究部 (薬学域) 衛生薬学分野助教。博士 (薬学)。

■略歴 2013年静岡県立大学薬学部 (6年制) 卒業。17年同大学院博士課程 (4年制) 修了 (医薬生命化学講座)。博士 (薬学) 取得。14年4月から17年3月まで日本学術振興会特別研究員。17年4月より現職。

■研究テーマと抱負 リポソームDDSを応用した脳梗塞やがんの治療法の開発研究に従事している。今後は、生体内に存在する細胞の膜タンパク質機能や外部刺激などを利用した、新たな薬物送達法を確立していきたいと考えている。

■ウェブサイト <http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/esi/>

■趣味 マラソン, 登山。

●奥 直人 (おく なおと)



帝京大学薬学部特任教授, 静岡県立大学名誉教授。薬学博士。

■略歴 1975年東京大学薬学部卒業, 80年同大学院博士課程修了。米国留学後83年摂南大学薬学部講師, 87年助教授, 91年静岡県立大学薬学部助教授, 98年教授。2018年より現職。

■研究テーマと抱負 リポソームDDS研究。