

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名： バイオ医薬品局所徐放のための展開型ナノシート創出技術開発
3. 研究開発代表者：阿部 俊明
4. 研究開発の成果

(1) 医用材料決定：主に PEGDM、TEGDM、PLGA、PS、PMDS を用いて検討を行い、材料の特性に応じてシート化する技術を確立した。これらの材料がシートあるいはデバイス作製に関しての基材として十分有用であることを確認できたため、今後はこれらの材料および類似体を用いて研究を展開する。

(2) 展開・接着確認：ナノ厚のシートに関しては、昨年度、支持層および伸縮層を加えた 3 層構造による展開技術を確認できたため、本年度はマイクロ厚のシートの展開性を検討した。吸水性のシートであれば、水中での自己展開が期待できたため、PEGDM を用いてシート膜厚と展開時間の関係性を検討し、5 cm 四方のシートも作製したが、約 60 秒程度で自己展開することを確認した。また、筒状に捲回したシートをシリンジ針から水中に射出して展開可能であることも確認した。この成果は本年度特許申請を行った。PEGDM シートをラット結膜下に挿入し、組織表面への接着性を検討したところ、特別な接着機構無しで強膜上に接着することがわかった。これはシートが組織表面構造に対して十分追従できる柔軟性を備えているためであると考えられるが、高伸縮性、あるいはせん断応力、摩擦力が負荷される組織においては、シート表面への接着機構の導入が必要であると予想でき、必要に応じてシート表面の分子修飾を検討する。

(3) 分解速度確認：ラット結膜下にシートを移植し、分解性を確認したところ、PLGA は 1 週間程度で分解されたが、PEGDM、PS 等の非生分解性ポリマーは 1 ヶ月以上生体内に存在した。PEGDM に生分解性を付与するために、ゼラチン等の生体分子の導入を検討したところ、PEGDM と共重合化できる見通しが立った。今後、*in vitro*、*in vivo* での分解性の確認、分解時間の制御が必要になる。

(4) 薬剤活性：バイオ医薬品の代替として標識アルブミンを使用して、徐放方法を改良して徐放を確認したところ 2.5-10ug/ml/day の徐放が確認され、徐放改善が得られた。また、この徐放ではバーストが改善した。また、同様の方法で Ranibizumab の徐放ができることを確認した。異なる薬剤を含浸させたコラーゲン微粒子をシートに包埋することで、複数の薬剤の同時徐放が可能であることを確認した。

(5) 一方向性徐放技術確立：複数シートの積層化による一方向性徐放を検討中であるが、シート同士の均一な接着にまだ課題があり、引き続き検討を行う。

2) ナノシート生体内局所展開技術開発と動物モデルでの評価

(1) 動物を利用した局所展開の検討

上記の接着確認、分解速度確認の検討に併せて、各シートが結膜下で展開することを確認した。

(2) 動物モデルへの投与

①ラットでの網膜移行条件の検討を開始した。蛍光標識したアルブミンをロードしたシートを結膜下に移植したところ、3 週間後でも強膜上に蛍光が確認できた。蛍光標識アルブミンの眼内分布を予備的に評価したところ、網膜への移行が示唆されたが、測定方法に再検の余地があり、引き続き検討を行う。ウサギ結膜下に PEGDM シートの投与を行いアルブミンの眼球への移行を確認したが、1 週間では非常に微量の移行が予想された。これに関しても、測定方法等に再検の余地があり引き続き検討を行う。眼疾患モデル動物への投与はまだ行っておらず、上記模擬薬の網膜への移行が確認できた時点で開始する。

②一方、bFGF が徐放できるカプセルデバイスができた。TEGDM と PTMG を素材としたカプセルを

皮下に移植したが、ともに皮下組織に癒着組織を認めない。bFGF 徐放カプセルデバイスをラット皮下に移植したところ、TEGDM カプセルデバイスのほうが周囲により良好な血管の構築が予想され、コントロールに比較しても良好であることが確認できた。糖尿病ラットを作製し bFGF 徐放デバイス移植を行い、2 週間後に摘出して、膵島細胞移植をおこなった。現時点で、コントロールに比較して血糖が良好に維持されている。さらに今後は細胞移植のデバイスの最適化を行うために、まず膵島細胞移植に適した空間の確保をめざし 25mm(直径)x1.2mm(厚さ)のカプセルデバイスを再度作製した。カプセルサイズの変更後も bFGF の偽薬として用いた FD20 (FITC 標識デキストラン、平均分子量 20kDa) がデバイスから良好に徐放されていることを確認した。しかし、皮下投与ではデバイスサイズなどの影響などが考えられるためかプロトタイプと違う結果が予想された。この新しいタイプのデバイスが血管構築に良好であることが判明したら、膵島細胞移植を再度行いその効果を確認予定である。

③新生血管にかかわる網膜疾患のモデル動物の作製を試みてきたが、これまでのところ **epigenetic factor** にもかかわる可能性のある **non-histone DNA binding** 蛋白質が網膜新生血管発生にかかわる因子の候補として絞られてきた。ノックアウトマウスを購入し解析を開始するとともに、この遺伝子を網膜色素上皮に発現させるトランスジェニックマウスの作製を開始した。

(3) 特殊インジェクター開発

インジェクターに装着する針の形状を検討した。鋭針化したガラスキャピラリーを用いてシートの後眼部への移植を行ったところ、ある程度シートの送達が可能であることがわかった。より効率的にシートを送達するためには、粘性のある液体が有効であると予想され、針形状の最適化を含めて引き続き検討する。

3) 特許情報精査・申請、薬事相談

自己展開可能な薬剤徐放シートに関して特許出願を行った。また、3 層構造によるシート展開に関する特許に関しては PCT 出願を行った。さらに、バイオ医薬品皮下徐放デバイス（細胞移植治療用の皮下埋め込みデバイス）の国内出願を行なった。