

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：23201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18460

研究課題名（和文）血中に存在するリポタンパク質の異所利用：加齢黄斑変性の点眼治療法開発に向けて

研究課題名（英文）Eye drop administration of recombinant serum lipoproteins for the treatment of age-related macular degeneration

研究代表者

村上 達也（Murakami, Tatsuya）

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：90410737

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：加齢黄斑変性に対する点眼治療薬を、高密度リポタンパク質（HDL）の変異体を用いて開発することを目指して、以下に示すように多角的に研究を進めた。薬物搭載HDL変異体について、ラット点眼後の搭載薬物の後眼部組織内分布をLC-MS/MSにより調べた。薬物濃度は、強膜>脈絡膜>網膜の順となり、硝子体からは検出されなかった。この結果から、搭載薬物の後眼部移行ルートは経強膜であることが示唆された。工業生産に利用可能な簡便なHDL作製法を開発した。HDL構成脂質のエタノール溶液とHDL構成タンパク質のウレア溶液を混合し、脂質膜の相転移温度で静置することにより、既存法と同等の収率でHDLが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性は加齢が最大のリスクファクターの難治疾患であり、我が国で第4番目の失明原因である（欧米では第1位）。現在の治療法（抗体医薬品の眼球内注射）は、患者への肉体的負担が大きく、また患者急増による医療従事者の労働負担も問題となっている。そしてもう1つの問題は、長期的にはこの治療法は有効ではない（耐性化）ことである。本研究は、患者自身が行える点眼治療の開発を目指すものである。今回、後眼部への薬物輸送ルートが解明され、工業生産に利用可能な新しい点眼剤作製法が見出された。いずれの成果も、HDLという血中に存在する物質の異所（眼表面）での医療応用という点で、学術的にも社会的にも意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：Toward the development of eye drops for the treatment of age-related macular degeneration using variants of high-density lipoprotein (HDL), we conducted research as described below.

After eye drop instillation of drug-loaded HDL variants to rats, the distribution of the drug in the posterior segment of the rat eyes (sclera, choroid, retina) and the vitreous body was investigated by LC-MS/MS. Drug concentrations were in the order of sclera > choroids > retina, and the drug were not detected in the vitreous body. These results suggest a trans-scleral route for the delivery for the drug by HDL variants to the posterior eye segment in rats.

A simple HDL preparation method that can be used for industrial production has been developed. By mixing an ethanol solution of HDL component lipid and a urea solution of HDL component protein and incubating the mixture at the phase transition temperature of the lipid membrane, HDL was obtained at a high yield comparable to that for the existing method.

研究分野：生物化学、薬物送達学

キーワード：加齢黄斑変性 高密度リポタンパク質 点眼剤

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(AMD)では、後眼部の脈絡膜(図1)に脂質代謝異常、異常な血管新生が生じ、網膜の機能が傷害されることで失明に至る。超高齢化社会を迎える我が国において、AMD患者数が激増することは避けられない。現在のAMD治療は、抗血管新生タンパク質を患者の硝子体に定期的に注射することであるが、患者の肉体的負担が極めて大きい。これに対して応募者は、京都大学眼科の須田らと共同で、血中で脂質輸送を担うタンパク質(高比重リポタンパク質, HDL)の変異体が、点眼によって後眼部へ効率良く薬物を送達し、かつ自身がAMD治療効果を示すことを見出した(Suda, K., *J. Control. Release*, 266, 301-309 (2017); 特許第6818264(京都大学支援); PCT/JP2015/086203(京都大学, JST支援)→2021年6月米国にて特許査定)。この結果は、応募者の以下に示す3つの着想に基づいている: ①HDL変異体に細胞親和性ペプチドを含ませることで(図1)点眼後の眼表面滞留性を増強できる、②HDLの小ささ(約10nm)は眼組織浸透に有利である、③HDLの生理機能(コレステロール排出促進、抗炎症、抗酸化作用等)はAMDに治療的に作用する。

2. 研究の目的

この研究成果は京都大学とJSTによってその有望性が認められているところであるが、実際にそれを臨床応用に結びつけるには、まだ数多くの課題がある。例えば、この薬物キャリアによる薬物移行ルート、治療効果発現メカニズムは未解明である。また現状のキャリア作製法は時間と労力を必要とし、臨床試験サンプル製造に用いることは難しい。本研究では、世界初のAMD点眼剤の開発に向けて、異分野研究者と共にこれらの課題に取り組む。

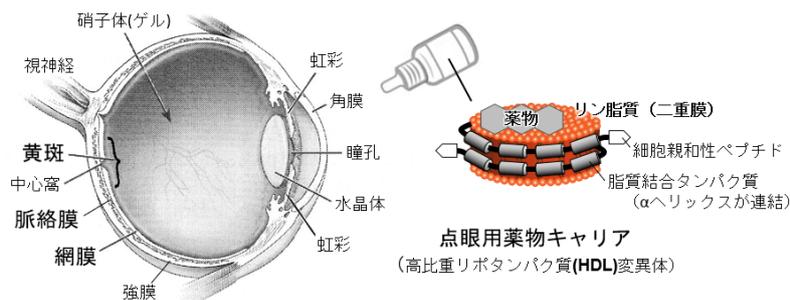


図1. 本研究の目的の概念図 ヒトの目の構造(左)と点眼用薬物キャリアの模式図(右)

3. 研究の方法

研究項目[1]

現状の方法(コール酸透析法)で作製したHDL変異体に薬物を内包させ、実験動物に点眼し、眼内の各組織中の薬物をLC-MS/MSで定量する。

研究項目[2]

後眼部薬物デリバリーに対する*in vitro*評価系を立ち上げ、発展研究の効率化を図る。眼表面(角膜)から後眼部に至る主要な成分(角膜細胞とコラーゲン)を用いて3次元組織を作る。

研究項目[3]

マイクロ流路デバイス(MFD)を利用して、HDL変異体の新しい作製法を開発する。MFDを使えば、原理的にはわずか数秒でHDLが得られる。

研究項目[4]

HDL変異体に抗血管新生化合物を内包させ、AMDモデルマウス(後眼部に新生血管を有する)を用いて前臨床試験を行う。

4. 研究成果

研究項目[1]

細胞膜透過ペプチドの1つであるペネトラチン(PEN)を融合したHDL変異体(Suda, K., *J.*

Control. Release, 266, 301-309 (2017)に、KUS121 (Ikeda, HO. *PLoS One* 15, e0229068 (2020))もしくは Pazopanib (Yafai, Y. et al., *Eur. J. Pharmacol.* 666, 12-18 (2011))を搭載させ、ラットに点眼した。点眼 30 分後に眼球を摘出し、後眼部の強膜、脈絡膜、網膜、そして硝子体を分画した。別の実験では、眼球の凍結切片を作製した。各分画組織から定法に従って薬物を抽出し、LC-MS/MS 分析した結果、前者 3 つで薬物を検出することができた。薬物濃度は、強膜>脈絡膜>網膜、の順となり、ちょうど眼球の外層から内層に向かって濃度が低下していたことから、点眼後の搭載薬物の後眼部移行は、角膜→強膜 (内部) →後眼部、もしくは結膜→(眼球周囲)→強膜→後眼部、であることが示唆された。

研究項目[2]

より生体組織の構造に近づけるため、当初の計画を変更して、角膜細胞とコラーゲンに線維芽細胞を加えてモデル角膜組織を作製することを試みた。コラーゲン粒子を粉砕し、PBS あるいは DMEM に 4°C で溶解させた。PBS の場合は 37°C に昇温してゲル化後に DMEM/10% FBS を添加し、DMEM の場合は同様にゲル化後に 10% FBS を添加するか、10% FBS 添加後にゲル化させた (図 2A)。線維芽細胞を DMEM/10% FBS に懸濁させ、コラーゲンと混合した。Transwell に混合液を添加し 37°C で培養を開始すると、コラーゲンゲル内で線維芽細胞は増殖したが、2 日後にはゲルの収縮が観察された (図 2B)。Transwell 内でゲルが収縮すると、ゲルと Transwell 壁との間に隙が生じ、被検サンプルの組織透過試験が行えなくなる。そこで溶媒、コラーゲン濃度と細胞播種数を種々検討した結果、20 日間収縮が目視で確認されない条件 (PBS, 1%, 10³ 個) を見出した。

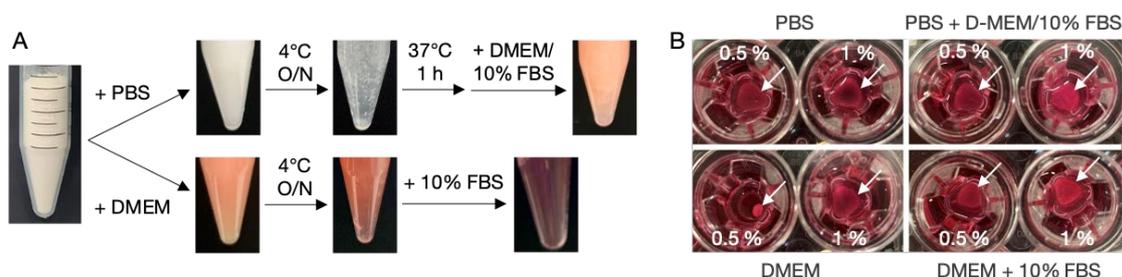


図 2. モデル角膜組織の作製 A. コラーゲン溶解条件の検討 B. Transwell を用いるコラーゲンゲル中での線維芽細胞の培養 (図中の数字はコラーゲン濃度(vol/vol)、矢印は収縮したゲルを指す)

平行して、角膜上皮細胞層の分化誘導を試みた。Transwell 内に播種したヒト角膜上皮細胞 HCE-T を 1 日培養液中で培養した後、Transwell をその底部のみが培養液に浸るように引き上げた (air-liquid interface culture)。これにより気相に曝された HCE-T 細胞表面の分化が誘導され、tight junction が形成される。この形成の程度を経上皮電気抵抗 (TEER) 測定により調べたところ、培養 6 日目まで顕著な抵抗値の上昇は見られなかった。既報では培養 4-5 日目まで 4 倍程度の上昇が観察されていることから、実験手技の習熟を含めた再検討が必要だと考えられる。

研究項目[3]

MFD による迅速な HDL 作製を目指して実験を開始した。MFD を用いることにより、脂質のエタノール溶液と脂質結合タンパク質 (apoA-I) が流路内で microvortex 混合され、効率良く HDL が生成する。コントロールとして、両溶液をマクロチューブ内でボルテックス混合し、ゲルろ過分析で HDL 形成を調べたところ、意外なことに HDL が高効率で生成することがわかった。そこでこの反応を詳細に調べることにした。

まずこの生成効率に及ぼす、(1) ボルテックス時間、(2) 混合後の静置温度、(3) 混合後の静置時間、(4) 脂質/タンパク質混合モル比 (L/P) の効果を調べた (図 3)。するとボルテックス混合はむしろ HDL 生成を阻害すること、静置温度は脂質の相転移温度 (ここでは 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) の 25°C)、混合後 6 時間で生成は飽和に達すること、L/P = 100 の時に最大となること、がわかった。

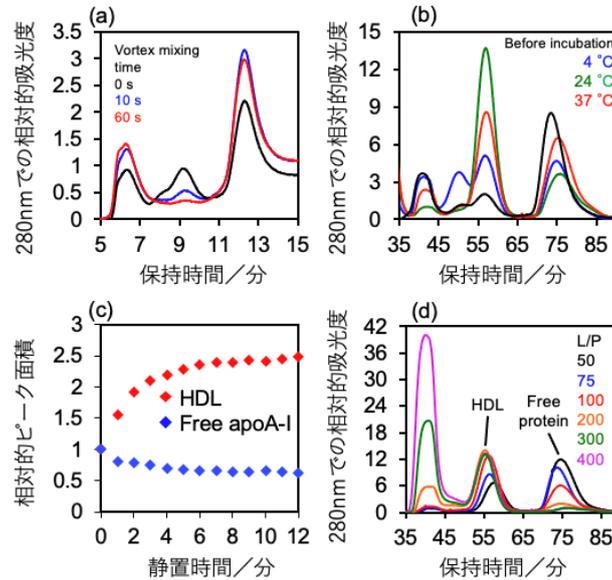


図 3. 新しい HDL 作製法の条件最適化 (a) ボルテックス混合時間とゲルろ過分析における HDL ピーク強度(~9 min) の関係 (b) 静置温度とゲルろ過精製における HDL ピーク強度(~55 min)の関係 (c) 静置時間とゲルろ過分析における HDL ピーク面積の関係 (d) 混合時の脂質/タンパク質モル比(L/P)とゲルろ過精製における HDL ピーク強度(~55 min)の関係

われわれは apoA-I (凍結乾燥品) を溶解する際、尿素を用いている。図 3 の結果に対する尿素の寄与を調べるために、0-4 M 尿素存在下、ボルテックス混合無し、25°C で 15 時間静置、L/P=100 の条件で反応を行った (図 4A)。すると HDL 精製効率は尿素濃度に大きく依存し、2 M で最大となることがわかった。この条件での収率を HDL 作製の従来法 (コール酸透析法) のそれと比較すると、それぞれ 73 ± 3 vs 68 ± 9 % (protein basis)、 70 ± 1 vs 71 ± 12 % (lipid basis)であった。この結果を受けて、本方法をウレア法と名付けた(Fukuda, R. et al., *Biochemistry* 59, 1455 (2020))。

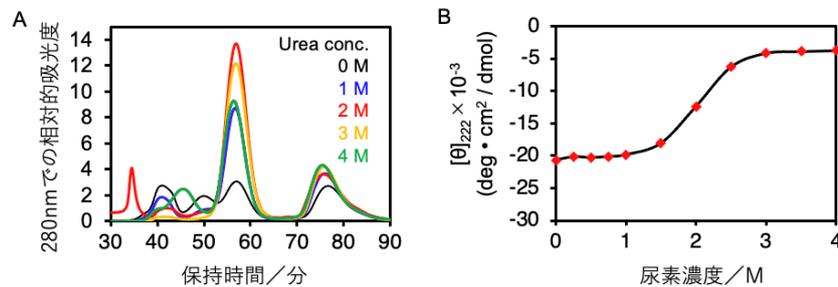


図 4. 新しい HDL 作製法における尿素の役割 A. 尿素濃度とゲルろ過精製における HDL ピーク強度(~55 min)の関係 B. apoA-I のウレア変性極性

メカニズムに関する知見を得るため、apoA-I のウレア変性曲線を調べた (図 4B)。すると変性中点でのウレア濃度は 2 M と求まり、この濃度は最適条件濃度と一致した。このような一致は apoA-I 変異体でも確かめられた。すなわち、約半数の apoA-I タンパク質が変性していることがウレア法での HDL 形成に重要であることがわかった。apoA-I は脂質と反応して HDL を形成する際、大きな構造変化を経て、 α -ヘリックス含量を増加させることが知られている。一方、コール酸透析法での知見から、HDL 生成はエンタルピー駆動であり、エンタルピー減少は apoA-I タンパク質における α -ヘリックス形成に由来する。従って、ウレアにより部分的に変性状態とすることでこのエンタルピー減少度が大きくなったために、HDL 生成につながったと考えられる。一方でわれわれの反応条件では、2M 以上のウレアの存在は、生成物である HDL を不安定化したことから、ウレア変性転移中点濃度の意義は、エンタルピー減少と HDL 不安定化の最適なバランスにあると考えられる。

最後に、疎水性薬物の同時内包も可能かどうか、all-trans retinoic acid を使って調べた。比較対象として、コール酸透析法で作製した HDL を各種薬物溶液と混合し、ウレア法での静置時間と同じ間反応させて薬物内包 HDL を作製した。すると 1 粒子あたりの内包薬物分子数は両者で同程度であった。したがって、ウレア法は HDL 作製と HDL への薬物内包を同時に達成すること

ができ、HDL 製剤の工業生産に適した方法であることがわかった。

このウレア法は、MFD を含む特殊な装置を必要としないという利点があるが、一方で、適用できるリン脂質に制限があることもわかった。具体的には、DMPC もしくはより相転移温度の低いリン脂質でしか HDL が生成しない。HDL 点眼による AMD マウスモデル治療では、DMPC よりも脂肪鎖長の長い DSPC (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)の方が優れることがわかっている。したがって、引き続き MFD の開発を進める必要があると考えている。

ここでコール酸ミセル法およびウレア法における HDL 生成メカニズムを振り返ってみる。いずれの方法でも、用いるリン脂質の相転移温度で反応を行うことが重要である。DSPC の相転移温度は 55°C と、DMPC の 24°C よりもかなり高い。相転移温度ではリン脂質膜は液晶とゲルの混合状態として存在し、その境界には欠陥が存在する。HDL 生成反応の起点は、その欠陥への apoA-I の挿入とされている。しかし HDL 生成は高温では不利である。実際、コール酸透析法に従って DSPC で HDL を作製する際、反応液の 55°C 静置時間を 30 分間に短縮している（通常は終夜）。特殊な混合を可能にする MFD の流路設計と加熱条件の最適化により、*in situ* 生成する DSPC 粒子と apoA-I の反応性を改善し、このトレードオフの解消を目指したい。

研究項目[4]

血管新生阻害化合物として、SRPIN803 (Morooka, S. et al., Mol. Pharmacol. 88, 316 (2015))を用いた。2 種類の HDL 変異体に SRPIN803 を内包させ、AMD マウスモデル（後眼部脈絡膜にレーザー照射によって血管新生を誘導したマウス）に 1 日 2 回、1 週間点眼した。マウス眼球を摘出し、後眼部脈絡膜の新生血管を蛍光免疫染色で可視化し、そのエリアを定量的に解析した（図 5）。この結果、SRPIN803 単独に比べて、SRPIN803 内包 HDL 変異体は、エリア値をより強く減少させた。すなわち、HDL 変異体点眼の優位性が SRPIN803 を用いても実証された。

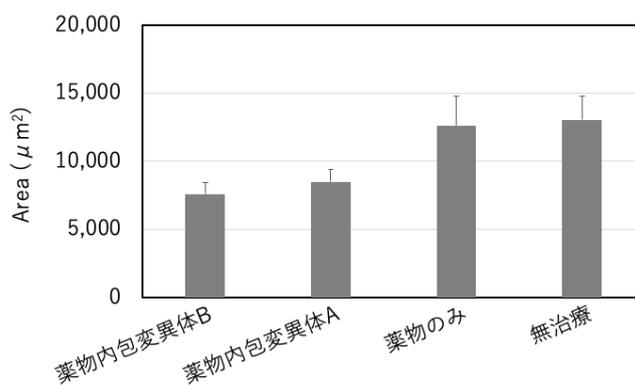


図 5. SRPIN803 内包 HDL 変異体点眼の AMD マウスモデルに対する治療効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Omomo, S.; Fukuda, R.; Miura, T.; Murakami, T.; Ikoma, T.; Matano, Y.	4. 巻 84
2. 論文標題 Effects of the Peripheral Substituents, Central Metal, and Solvent on the Photochemical and Photophysical Properties of 5,15-Diazaporphyrins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemPlusChem	6. 最初と最後の頁 740-745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cplu.201900087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kim, H.; Nobeyama, T.; Honda, S.; Yasuda, K.; Morone, N.; and Murakami, T.	4. 巻 1861
2. 論文標題 Membrane fusogenic high-density lipoprotein nanoparticles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Acta - Biomembrane 2019, 1861, 183008.	6. 最初と最後の頁 183008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamem.2019.06.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda, R.; Saito, M.; Shibukawa, S.; Sumino, A.; Nakano, M.; Murakami, T.	4. 巻 59
2. 論文標題 Urea-assisted reconstitution of discoidal high-density lipoprotein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1455-1464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.0c00075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda, R.; Murakami, T.	4. 巻 43
2. 論文標題 Potential of lipoprotein-based nanoparticulate formulations for the treatment of eye diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 596-607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00858	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda, R.; Umeyama, T.; Tsujimoto, M.; Ishidate, F.; Tanaka, T.; Kataura, H.; Imahori, H.; Murakami, T.	4. 巻 161
2. 論文標題 Sustained photodynamic effect of single chirality-enriched single-walled carbon nanotubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carbon	6. 最初と最後の頁 718-725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbon.2020.02.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Omomo, S.; Fukuda, R.; Miura, T.; Murakami, T.; Ikoma, T.; Matano, Y.	4. 巻 84
2. 論文標題 Effects of the Peripheral Substituents, Central Metal, and Solvent on the Photochemical and Photophysical Properties of 5,15-Diazaporphyrins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemPlusChem	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cplu.201900087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nobeyama, T.; Mori, M.; Shigyou, K.; Takata, K.; Pandian, G.N.; Sugiyama, H.; Murakami, T.	4. 巻 3
2. 論文標題 Colloidal stability of lipid/protein-coated nanomaterials in salt and sucrose solutions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemistrySelect	6. 最初と最後の頁 8325-8331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/slct.201801180	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 2件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 福田 亮介、齊藤 実央、島 瑠美奈、角野 歩、村上 達也
2. 発表標題 ディスク状脂質ドラッグキャリアの作製・保存法の開発
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 実央、福田 亮介、角野 歩、村上 達也
2. 発表標題 ディスク状脂質ドラッグキャリアの1ステップ作製法の確立とその形成メカニズム
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobeyama, T.; Shigyo, K.; Nakatsuji, H.; Sugiyama, H.; Hamada, T.; Murakami, T.
2. 発表標題 Deformation and formation of Lo phase domains on cell-sized liposome with membrane-adhesive plasmonic nanoparticles
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷 美沙季、延山 知弘、福田 亮介、加藤 康夫、野村 泰治、村上 達也
2. 発表標題 植物細胞とリポタンパク質ドラッグキャリアの相互作用に関する基礎的研究
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 実央、福田 亮介、角野 歩、村上 達也
2. 発表標題 脂質 / タンパク質ドラッグキャリアの1ステップ作製
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上 達也
2. 発表標題 細胞内ドラッグデリバリーシステムを基盤とする光細胞工学
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田 亮介、齊藤 実央、角野 歩、村上 達也
2. 発表標題 ナノリポタンパク質製剤の簡便作製法の確立
3. 学会等名 2018年度高分子学会北陸支部研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田 亮介、島 瑠美奈、角野 歩、村上 達也
2. 発表標題 Lyophilization of Nano-Lipo Eye Drops and Its Effects on the Physicochemical Properties
3. 学会等名 The 5th Toyama-BaseI Joint Symposium on Pharmaceutical Research and Development（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上 達也
2. 発表標題 High-Density Lipoprotein Mutant Eye Drops for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration
3. 学会等名 The 5th Toyama-BaseI Joint Symposium on Pharmaceutical Research and Development（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 延山 知弘、執行 航希、中辻 博貴、杉山 弘、濱田 勉、村上 達也
2. 発表標題 Manipulation of Model Lipid Rafts on Cell-Sized Liposomes by Using Plasma Membrane-Adhesive Gold Nanorods
3. 学会等名 The 5th Toyama-BaseI Joint Symposium on Pharmaceutical Research and Development (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齊藤 実央、福田 亮介、角野 歩、村上 達也
2. 発表標題 One Step Reconstitution of Lipid/Protein-Drug Carrier
3. 学会等名 The 5th Toyama-BaseI Joint Symposium on Pharmaceutical Research and Development
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 薬物デリバリーキャリアおよびこれを用いる医薬組成物	発明者 村上達也, Sawangrat Kasirawat, 他5名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-36022	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>研究室ホームページ https://www.pu-toyama.ac.jp/BR/murakami/ 富山県立大学 村上研究室HP https://www.pu-toyama.ac.jp/BR/murakami/index.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	池田 華子 (Ikeda Hanako) (20372162)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	高田 耕児 (Takata Koji) (40530621)	富山県産業技術研究開発センター・その他部局等・主任研究員 (83205)	
研究分担者	安田 佳織 (Yasuda Kaori) (70707231)	富山県立大学・工学部・講師 (23201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関