

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K19948

研究課題名(和文) 網膜への薬剤送達を目指したバリア突破型温度応答性スマートナノ点眼の開発

研究課題名(英文) Development of barrier-permeable temperature-responsive smart nano-eye-drops for drug delivery to the retina

研究代表者

田中 佑治(Tanaka, Yuji)

山梨大学・大学院総合研究部・特任准教授

研究者番号：40625513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：温度応答性生体親和性高分子ポリオキサゾリン(POx)修飾mRNAナノミセルを眼科分野に活用する目的で研究を開始した。ルシフェラーゼmRNAで様々な投与条件を検討したものの挑戦的課題としていた点眼として有効性は認められなかった。眼内注射のみ有効性が確認できたため、BDNFmRNA送達の神経保護効果を視神経挫滅モデルで検証したものの有効性は認められなかった。これらを踏まえてPOxのみに焦点を絞って活用方針を精査し、低眼圧症治療のための眼圧上昇剤開発に着手した。POxを用いることで過上昇した眼圧を眼表面を冷却しただけで非侵襲的に下方調節することを目指し、家兎にて有効な条件を見出して国際特許出願した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mRNA治療は研究開始当初臨床実績のない未開拓分野であったが、COVID19ワクチンとして世界中で活用され、今後は治療薬としての臨床研究の展開が期待される。本研究では小動物でmRNA治療の可能性を探索したが有効な活用例を見出すことができなかった。一方、mRNA創薬は飛躍的に進歩しているため、今後の挑戦的研究への活用が期待される。また、本研究では、mRNAキャリアの修飾剤として活用したオキサゾリン(POx)の眼圧上昇剤としての応用を検討した。POxは治験薬の実績のある安全な高分子で利活用が期待される。また対象となる低眼圧症は標準治療法がないため、眼圧上昇剤が実現すれば世界市場を独占できる。

研究成果の概要(英文)：Research was initiated to utilize polyoxazoline (POx)-modified mRNA nanomicelles, a temperature-responsive biocompatible polymer, in the field of ophthalmology. Various administration conditions were examined with luciferase mRNA, but no efficacy was observed as ophthalmic injection, which had been a challenging issue. Since only intraocular injection was found to be effective, the neuroprotective effect of BDNFmRNA delivery was tested in an optic nerve crush model, but no efficacy was observed. Based on these findings, we focused on the use of POx only and started the development of an intraocular pressure elevator for the treatment of hypotonia, aiming at non-invasive downward adjustment of excessive intraocular pressure by simply cooling the ocular surface using POx, and found effective conditions in house rabbits.

研究分野：トランスレショナルリサーチ

キーワード：温度応答性高分子 生体親和性高分子 オキサゾリン 眼科治療 mRNA 低眼圧症 眼圧上昇剤

1. 研究開始当初の背景

網膜は失明原因の大半（国内推定1000万人）に関連しており、先進的な治療方法の開発が盛んに行われている。本邦では世界に先駆けて他家iRPE細胞移植の臨床研究を実施している。他家移植は拒絶反応のリスクを伴うため、免疫抑制剤の使用を検討する必要がある。しかし、投与方法は全身の副作用のリスクを伴う内服に限定されており、再生医療のさらなる普及のために改良が必要である。また、広く普及している抗VEGF抗体などは失明リスクを伴う眼内注射が実施されている。そのため患者負担が少ない点眼の開発がアカデミア中心に古くから研究されてきた（図1上）。しかしながら、高難度の挑戦的課題であるため、本格的に開発に取り組む研究者は少



図1. 眼への投与方法の比較: 従来法 (上) と申請者らの過去の成果 (下) の特徴

く、依然として上市された薬剤はない。前述の様に申請者らは、世界で最も効率良く眼表面バリアを突破するキャリアフリーナノ点眼を開発したが（図1下）、実用化には、バリア突破能と科学的にトレードオフの関係にある水溶液中での安定性や、簡易性、汎用性等を同時に解決する必要性があった。本研究構想“温度応答性スマートナノ点眼”で、これまで実現できなかった上記の複数の課題（バリア突破能、分散安定性、汎用性、簡便性、安全性など）を同時に解決することを目指す挑戦的な研究である。本研究にて初めて網膜への点眼方法の実用化（上市）を見込める技術が誕生する可能性がある。

一方、眼内注射は、点眼と比較して眼表面バリアの障壁を回避できるため患部に直接作用させることができる。点眼よりも侵襲リスクがあるため患者自身で眼内注射することはできず、医師が実施する必要があるものの一般的に臨床では十分に受け入れられている。点眼が無効な後眼部の疾患や標的分子に対する投与方法として新規性があるため開発する意義はある。

2. 研究の目的

点眼は、眼局所的に薬剤を作用できる優れた薬剤投与方法である。しかしながら眼表面（角膜、結膜）のバリア機能により点眼剤の眼内移行率は0.1%以下に留められている。そのため、眼球奥底に位置し、失明原因の大半に関連する網膜には届かない。申請者らは、化合物の疎水性プロドラッグ化とナノ粒子化により眼内取込み率を10%程度（従来の100倍）まで改善した（JCR2011）。これは緑内障にも応用可能な画期的な成果だが（Sci Rep 2017）、汎用性の低さ、分散安定性の問題、有機溶媒の使用等の多くの課題があり実用化は現実的では無い。本研究では、実用化に向けた複数の課題の同時解決を目指し、上述の戦略を生かして『常温・低温の保存時には安定的に分散し、点眼後に体温に responding してバリア突破機能を獲得する』“温度応答性スマートナノ点眼”を新たに提案する（図2）。水中で複数の精密合成ポリマーと混和するだけで、様々な薬剤を簡易的に内包可能なナノサイズ

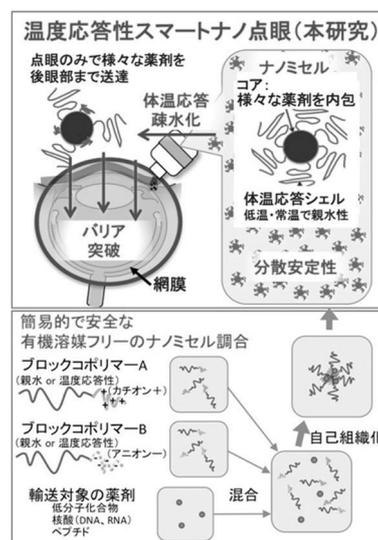


図2. 本研究開始当初開発を目指したバリア突破型“温度応答性スマートナノ点眼”の概要

ミセル（薬剤担体）

を開発することを目指した。特に、網膜に対する薬剤送達量が最大化する温度応答性ナノミセルの調合条件を見出して有効性を適切な病態モデルで検証することを目的とした。

また、点眼での実用化が困難な場合には、眼内注射等の他の投与方法の検討や要素技術を活用した新たな治療法の開発を検討することとした。

3. 研究の方法

() mRNAキャリア投与方法の検討

小動物（ラットまたはマウス）に対してケタミン・キシラジンを筋肉注射して麻酔した後、眼表面への点眼、前房または硝子体に注射した。点眼では、眼球表面に薬液を留めて5-15分間静置した後生理食塩水で洗浄した。ルシフェラーゼmRNAを用いた眼組織への取込み実験では、点眼24時間後にルシフェリンを同様に投与して高感度CCDカメラ（IVIS）で発光を確認した。取得画像データから定性的に比較した。

() 視神経挫滅モデルでの検証

マウスにケタミン、キシラジンを筋肉注射して麻酔した後に結膜を切開して視神経を縫合鑷子で挫滅し、5日後に安楽死してから眼球を摘出した。次に網膜を摘出・展開し、代表的な網膜神経節細胞（RGC）マーカーであるBrn3aとRbpmsを免疫染色して蛍光陽性細胞をカウントした。

() 家兎での眼圧制御検証実験

家兎にケタミン・キシラジンを筋肉注射して麻酔した後、正常眼の片目前房に試験液を注射した。眼圧測定は、麻酔前後、注射前後に未処置眼と処置眼双方をトノベット手持ち眼圧計で測定して差分を投与前、投与後で定量した。また、眼圧上昇が確認された条件にて、一旦眼圧を上昇させた後に氷水を用いて眼球表面を冷却し、眼圧の変動を確認した。

4. 研究成果

() 投与方法の検討

点眼実験

研究費申請時に予定していたナノキャリア3種類と、温度応答性ナノキャリア、そして対照として *in-vivo-jet* PEI にそれぞれルシフェラーゼmRNAを内包させてラットに点眼した。点眼回数の追加やmRNA投与量の増量等を検討したものの、用意したキャリア全てでルシフェラーゼタンパク質の発現を確認することができなかったため、点眼としての検証実験を終了した。

眼内注射実験

ラット眼に対して1種類のナノキャリア、新規キャリア、*in-vivo-jet* PEI、キャリアを用いないものの4種類を眼内注射した。すると、バックグラウンドの3倍以上の発光が検出される個体も認められ、その頻度は、ナノキャリア、*in-vivo-jet* PEI、新規キャリアの順で高かった。次に様々な病態モデルでの検証ができるマウスへの眼内注射を行った。しかしながら、未修飾ナノキャリア、温度応答性ナノキャリア、*in-vivo-jet* PEIを比較したが、ルシフェラーゼmRNAの導入は確認できたものの、mRNA導入量の差異は見出せなかった。

ナノキャリアを用いたmRNAの導入は眼科分野でも基礎研究レベルにおいても新規で、分担研究者らは既製品よりも安全性の高い材料であることを報告しているため、動物実験に関しては、材料の新規性と有効性の検証に注力する方向から、ナノキャリア/mRNA導入による新しい治療法の検証に焦点を絞ることとした。

() 視神経挫滅モデルによる治療効果の検証

治療効果の検証に必要な動物モデルとして、マウスの視神経挫滅モデルを選択した。網膜神

経節細胞が細胞死を起こす病態モデルで、眼内注射で薬剤を直接網膜神経節細胞に届けることが可能で、細胞死抑制効果を発揮する薬剤や分子の探索が進められている。mRNA導入による神経保護効果の検証として、視神経挫滅モデルの準備を行なった。マウスの結膜を切開して鑷子で視神経を挫滅し、5日後に安楽死して網膜の病理学的な解析を行ない網膜神経節細胞が半減することを確認した。また、神経保護効果の正常コントロールとして、細胞死抑制効果が報告されているROCK inhibitorまたは生理食塩水を視神経挫滅後のマウス眼内に注射した。未処置眼に対する蛍光陽性細胞の割合は、Brn3a染色では、生理食塩水で54.3%であったのに対して、ROCK inhibitor 注射眼が66.5%、Rbpm染色では、生理食塩水で48.5%であったのに対して、ROCK inhibitor 注射眼が60.3%と、双方共にROCK inhibitor注射眼でRGC保護効果が認められ、神経保護効果を評価できることを確認した。しかしながら、RGCに対する神経保護効果が報告されているBdnfのmRNAを内包したナノミセルを上記の視神経挫滅モデルに注射したものの神経保護効果は認められなかった。

() 氷冷により下方調節可能な眼圧上昇剤の開発

()、()を踏まえて活用方針をP0xのみに絞って精査し、低眼圧症治療のための眼圧上昇剤の開発に着手した(図3)。低眼圧状態に至った際に、この眼圧上昇剤を注射することで眼圧を正常値まで回復させることを目的としている。過剰に眼圧が上昇した

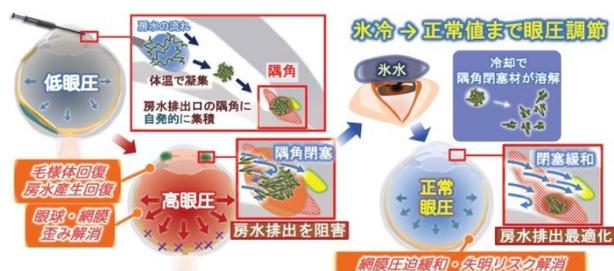


図3. 冷却で下方調節可能な眼圧上昇剤開発の概要

場合は急性緑内障による失明リスクがあるため、氷水で眼球表面を冷却するだけで安全域まで下方調節できる特性を付与することを目指した。2種類のP0x(温度応答性を有す生体親和性高分子と、同様の温度応答性を有す生体親和性高分子に別の水溶性を有す生体親和性高分子を化学結合した分子)を新規合成して、眼圧上昇効果を家兎実験で検証した。しかし、単独では成功率が著しく低く、適切な眼圧調整効果はほとんど得ることがなかった。条件によっては眼内が混濁する等の深刻な副反応が生じた。そこで、2剤を混合して双方の中間の性質を有す混合剤の調整を検証することとした。体温近辺(37)に設定した上で顕微鏡観察したところ、2剤の混合比を変更することで、薬液の粒子サイズと水溶液への分散性を制御できることを確認した。その後、様々な混合比で調整した混合剤を家兎眼に注射して眼圧測定等を行ったところ、5回中5回、注射1時間後には5 mmHg以上の眼圧上昇効果を確認した。この条件では、眼圧調節後の深刻な副反応は特に認められず、眼圧調節後、眼球の透明性は維持されていた。注射1時間後には5 mmHg以上の眼圧上昇が確認できた。しかし10 mmHg以上眼圧が過剰に上昇した際に、氷水を用いて冷却したものの5 mmHg以上眼圧が低下するまでに90分以上の冷却時間を要した。臨床的に高眼圧状態が長時間続くことは好ましくない。特に注射後から眼圧が上昇し始めるまでにタイムラグがあるため、仮に複数回投与が必要になった場合にリスクが大きくなる。氷水での冷却直後に眼表面温度を確認したところ、27 未満まで冷却することが困難であることが分かった。そこで相転移温度の目標を30 として後継事業のための準備として分子設計を開行い、合成計画を立案した。一方、前年度出願した国際特許の各国移行のためにJST国際特許出願支援に申請手続きを行い、各国移行についても支援が得られることになった。

() 考察

本研究では眼表面バリアを透過するmRNAのキャリアを見出す挑戦を試みたが、研究期間内に使用し得る素材で実現するのは困難であることが明らかになった。ルシフェラーゼアッセイで

は、注射により眼表面バリアを機械的に通過して眼内にアクセスすることでmRNAの網膜への送達の達成を示唆するデータを得たものの、視神経挫滅モデルでは有効性を確認することができなかった。視神経挫滅モデルは急性障害モデルで傷害が大きい。眼内注射による網膜へのmRNA送達の可能性は残るため、高眼圧モデルや慢性疾患モデルの様な緩やかなモデルで検証の余地がある。一方、本研究ではこれらの研究結果を踏まえて、上記開発品の成分であるPOxの眼科分野への活用を検討する方針に転換した。低眼圧症治療を目的とした眼圧上昇剤の開発に着手し、正常家兎眼を100%の確率で眼圧を上昇できるPOxを新規開発することに成功した。この眼圧上昇剤は眼球表面を氷水で冷却することで眼圧を下方調節できるため、安全に眼圧を上方調節できる。臨床応用が実現すれば初の眼圧上昇剤として市場を独占できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kitahata Shohei, Ichikawa Hinako, Tanaka Yuji, Inoue Tatsuya, Kadonosono Kazuaki	4. 巻 24
2. 論文標題 Transient rho-associated coiled-coil containing kinase (ROCK) inhibition on human retinal pigment epithelium results in persistent Rho/ROCK downregulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100841 ~ 100841
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2020.100841	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 久保明香、大澤重仁、大塚英典
2. 発表標題 ジピコリルアミン亜鉛錯体とOEGユニットを含むランダム共重合体からなる拡散キャリアの機能評価
3. 学会等名 第69回高分子検討会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 東京理科大学 理学部第一部 応用化学科 助教 大澤 重仁 東京理科大学 理学部第一部 応用化学科 教授 大塚 英典
2. 発表標題 Random copolymer grafting oligo (ethylene glycol)s and zinc complexes with dipicolylamine to design polyplex loading plasmid DNA toward gene delivery
3. 学会等名 OKINAWA COLLOIDS 2019
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 東京理科大学 理学部第一部 応用化学科 助教 大澤 重仁 東京理科大学 理学部第一部 応用化学科 教授 大塚 英典
2. 発表標題 ジピコリルアミン亜鉛錯体とオリゴエチレングリコールをグラフトした高分子鎖の合成と遺伝子キャリアとしての機能評価
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 東京理科大学 理学部第一部 応用化学科 助教 大澤 重仁 東京理科大学 理学部第一部 応用化学科 教授 大塚 英典
2. 発表標題 ジビコリルアミン亜鉛錯体とOEGユニットを含むメタクリル酸ベースのランダム共重合体の合成と遺伝子キャリアとしての機能評価
3. 学会等名 第68回高分子年次大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 東京理科大学 理学部第一部 応用化学科 助教 大澤 重仁
2. 発表標題 Messenger RNA loaded polyplex micelles having hydrophobic core protective layer composed of thermo-switchable poly(oxazoline) for promoted gene expression
3. 学会等名 ACS Spring 2019 National Meeting & Exposition
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigehiro Osawa, Kensuke Osada, Kazunori Kataoka
2. 発表標題 Messenger RNA loaded polyplex micelles having hydrophobic core protective layer composed of thermo-switchable poly(oxazoline) for promoted gene expression
3. 学会等名 ACS Spring 2019 National Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 大澤重仁、長田健介、大塚英典、片岡一則
2. 発表標題 温度応答性ポリオキサゾリン鎖からなる疎水性保護層を有する核酸内包高分子ミセル
3. 学会等名 第28回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計5件

産業財産権の名称 温度制御により薬効解消可能な眼圧上昇剤	発明者 田中佑治 柏木賢治 大澤重仁	権利者 国立大学法人山梨大学、学校法人東京理科大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/39837	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 温度制御により薬効解消可能な眼圧上昇剤	発明者 田中佑治、柏木賢治	権利者 国立大学法人山梨大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-181848	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 包埋用ゲルでの生体試料の包埋を補助するための空間を備える医療用デバイス	発明者 田中佑治	権利者 国立大学法人山梨大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/010942	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 高分子金属錯体及びその製造法	発明者 大澤重仁、大塚英典、黒川颯介	権利者 学校法人東京理科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-230395	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 包埋用ゲルでの生体試料の包埋を補助するための空間を備える医療用デバイス	発明者 田中佑治	権利者 国立大学法人山梨大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-048434	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

山梨大学先端応用医学講座ホームページ https://abr.yamanashi.ac.jp/?page_id=40

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	大澤 重仁 (Osawa Shigehiro) (30780663)	東京理科大学・理学部第一部応用化学科・助教 (32660)	

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
---------	---------