

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09828

研究課題名（和文）ROCK阻害薬の形質転換抑制作用による眼内線維増殖制御と細胞移植治療への応用

研究課題名（英文）ROCK inhibitor for treating intraocular fibrosis by modulating epithelial-to-mesenchymal transition.

研究代表者

石川 桂二郎（Ishikawa, Keijiro）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：00795304

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、ROCK阻害剤をリポソーム化した薬剤の薬効薬理作用の検討を異なる動物モデルを用いて行った。リポソーム化した製剤は眼内での停留性が、非リポソーム化製剤と比較して有意に向上していた。また、眼内線維増殖抑制効果の検討においては、リポソーム化製剤は少ない眼内投与回数で長期間効果が持続することを確認した。また、眼内の線維化を反映するバイオマーカーであるペリオスチンという分子の眼内発現についても、同様にリポソーム化製剤で有意に抑制できていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

眼内線維増殖に対する薬剤は、未だ臨床応用されておらず新規治療薬開発が望まれている。今回の研究成果により、眼内線維増殖抑制が期待されるROCK阻害薬の臨床応用に向けて、リポソーム化修飾することで、頻回の眼内注射を避けることができる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, the pharmacodynamic properties of liposome-encapsulated ROCK inhibitors were investigated in different animal models. The liposome encapsulation showed significantly improved retention in the eye compared to the non-liposome drug. In addition, in the study of the inhibitory effect on intraocular fibroproliferation, the liposome-encapsulated ROCK inhibitor was found to be effective for a long period of time with fewer intraocular administrations. In addition, the intraocular expression of periostin, a biomarker that reflects intraocular fibrosis, was also significantly suppressed by the liposomal formulation.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜症 糖尿病網膜症 網膜剥離 形質転換 リポソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症 (DR) 加齢黄斑変性 (AMD) や増殖硝子体網膜症 (PVR) は、いずれも視力予後が不良な網膜疾患である。DR では特に、増殖糖尿病網膜症 (PDR) において、血管成分(病的血管新生)と線維成分(線維組織形成)を含む線維血管増殖組織(以下 PDR 増殖組織)が網膜面上に出現し、その収縮による牽引性網膜剥離が視力低下の原因となる。日本人に多い滲出型 AMD では網膜下に線維血管増殖組織が生じ、視機能が障害される。さらに、PDR、

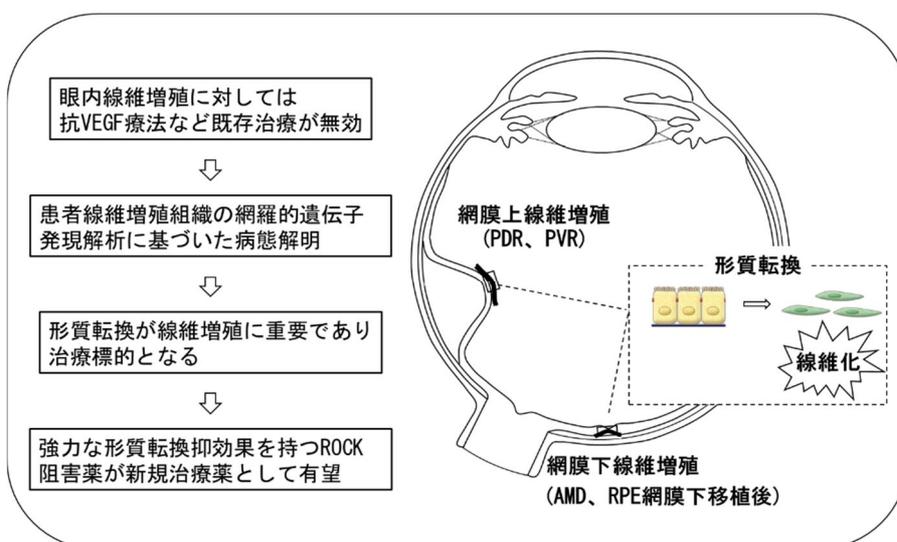


図 1. 眼内線維増殖に対する新規治療法開発を目指した研究の概要

AMDと同様の増殖組織形成は、手術侵襲に伴う術後眼内細胞増殖によるPVRでも認めるが、手術治療抵抗性で再発を繰り返すことが特徴である。つまり、これらの増殖性網膜硝子体疾患の病期が進行した状態でみられる眼内線維増殖はいったん生じると非常に難治で不可逆的な視機能障害の原因となるが、その病態メカニズムは不明な点が多く、治療法が無い。近年、DRやAMDの治療に抗VEGF療法が導入され、新生血管、血管透過性亢進に対しては効果を認め、眼科臨床で一定の成果をあげている。しかし、DRにおける網膜上線維血管増殖やAMDにおける網膜下線維化に対しては奏功せず、かえって線維化を促進し視機能を悪化させる場合がある。眼内線維増殖の分子機序は殆ど不明であるため、治療法が無いのが現状である。また、現在、AMDに対して網膜色素上皮細胞(RPE)移植の臨床試験が国内外で行われているが、移植後の細胞正着不全や、PVRなど眼内線維増殖に起因すると考えられる有害事象が報告され(NEJM. 2017)、今後、実臨床における使用に際し、解決すべき重要な課題である。以上のことから、増殖性網膜硝子体疾患の視力予後を改善させるためには、眼内線維増殖のより詳細な病態メカニズム解明に基づく、新規薬剤の開発が期待される。

2. 研究の目的

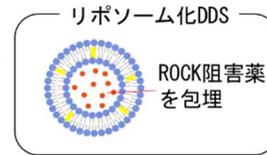
申請者らは、抗VEGF療法やステロイド治療などの既存の治療法に抵抗性の眼内線維増殖の病態解明と治療法開発を目指して継続して行ってきたプロジェクトである増殖組織のトランスクリプトーム解析を足掛かりとした線維増殖の発症進展機構の解明により、眼内線維化特異的に発現、機能する分子の同定と、眼内線維増殖制御には形質転換抑制による予防的治療が有効であることを明らかにした。この取り組みを通して、ROCK阻害薬が形質転換を効率的に抑制可能な薬剤であり、臨床応用に向けて最も有望な線維増殖抑制薬であると考え、実用化に向けた投与方法の最適化と適応拡大に向けた前臨床研究へ発展している(図1)。ROCK阻害剤は緑内障点眼として既に眼科臨床で用いられているが、点眼では網膜まで到達しないため、網膜疾患の治療へ応用するためには硝子体内投与が必要である。しかし、低分子化合物であるROCK阻害剤は、

硝子体腔内での半減期が非常に短いことより、頻回の硝子体内注射が必要となるため、その対策として効果持続のためのドラッグデリバリーシステム(DDS)の最適化が必要となる。我々は、眼内滞留性を向上させるために、リポソーム化製剤に着目し、薬学研究院の松永直哉准教授と共同でリポソーム化 ROCK 阻害薬の開発を行っている。また、臨床応用に向けた

ROCK阻害薬の臨床応用に向けた問題点(●)と本研究で期待される解決策

- 点眼では後眼部に到達しない、硝子体注射を行っても半減期が短い(約10時間)

⇒ リポソーム化DDSによる眼内滞留性の延長



- 治療を行う適応やタイミングが不明瞭(線維増殖が予測できない)

⇒ 線維増殖予測(病勢)バイオマーカーの同定

問題点として、線維増殖はいったん起きると不可逆的な障害をもたらすため、線維化予測に基づいた予防的な治療戦略が必要となるが、線維化を予測するバイオマーカーが無く、抗線維化薬投与の適応や時期が不明瞭である。また、現在、国内外で AMD に対して RPE 移植の臨床試験が行われているが、細胞懸濁液移植後の線維増殖や、移植した細胞が上皮細胞として正着し、網膜の恒常性を保つ機能を有するかどうか懸念されている。ROCK 阻害剤による上皮化促進作用がこれらの問題を解決できる可能性があり、移植治療の有効性、安全性を高めることが期待される。そこで、本研究では、**強力な形質転換抑制効果を有する ROCK 阻害薬をリポソーム化した新規製剤の臨床応用に向けた前臨床研究、適応を決定するためのバイオマーカーの同定、および網膜色素上皮移植治療の補助薬への応用の可能性について検討することである。**長期徐放化 ROCK 阻害剤の眼内線維増殖に対する薬効、薬理学的解析がなされ、将来的に臨床応用されれば、患者の視機能維持が期待され、その社会貢献ははかり知れない。また、新規治療により硝子体手術や抗 VEGF 薬硝子体注射件数を減少させることができる可能性があり、患者負担の軽減だけでなく、医療財政の観点からも有益となる。

3. 研究の方法

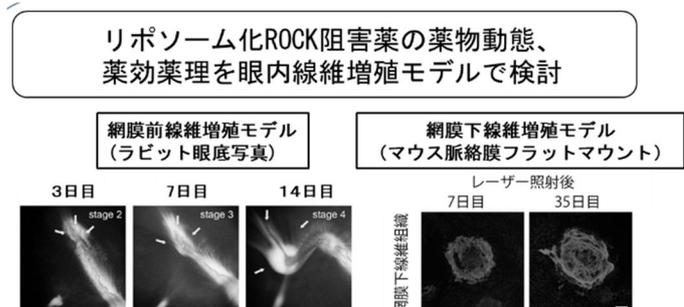
た基盤を構築することである。この目標に向け、研究期間内に以下のことを明らかにする。

- 1: 徐放化(リポソーム化)ROCK 阻害剤の眼内線維増殖抑制効果、薬物動態
- 2: 線維増殖予測、治療効果判定に有用なバイオマーカー分子の同定
- 3: 網膜色素上皮移植モデルにおける薬剤投与後の移植後細胞の正着効果

1. *In vivo*眼内線維増殖モデルへのリポソーム化ROCK阻害剤による線維組織形成と、網膜中の薬剤移行を検討

申請者は、マウスレーザー誘導性脈絡膜新生血管モデルの晩期で網膜下線維性瘢痕が形成され、疾患動物モデルとして有用であることを報告した。同モデルとウサギPVR(網膜前線維増殖)モデルを用いる(図3)。両モデルに対して、リポソーム化、非リポソーム化 ROCK 阻害剤を眼内注射し、経時的に眼底写真、OCT を撮像し、線維増殖組織形成の評価をし、同時にウサギ前房水の採取を行い、前房水中の ROCK 阻害剤濃度を Mass Spectrometry で測定する。レーザー照射後 35 日目のマウス、PVR 誘導後 21 日目のウサギの眼球

図 3. 研究方法の概要



を摘出し、フラットマウント、および切片を作成し、線維組織を Collagen 染色、FITC ラベルした ROCK 阻害剤で薬物分布を評価する。

2. *In vivo*モデル眼内のペリオスチン、テネイシンC発現変化を検討

これまでの研究で、ペリオスチンやテネイシン C が眼内線維増殖の際に特異的に発現し促進的な役割を果たすことを明らかにした。これらの分子は、線維増殖を反映する鋭敏なバイオマーカーとして用途が期待される。網膜前増殖モデル作成後、さらに ROCK 阻害剤投与後の、各時点での眼内液を採取し、ペリオスチン、テネイシン C 濃度を測定する。線維膜形成や網膜剥離などの状態との相関について解析し、眼内線維増殖や治療効果予測、効果判定に有用なバイオマーカーとなりうるかを検討する。

4. 研究成果

1：徐放化(リポソーム化)ROCK 阻害剤の眼内線維増殖抑制効果

Dutch ウサギを用いて増殖硝子体網膜症(PVR)動物モデルを作成。ウサギ PVR 眼に対して、BSS(コントロール)、リパスジル(Ripa)、リポソーム化リパスジル(Lipo-Ripa)を 0.1ml 硝子体注射した。その後、PVR 進行を経時的に観察し、PVR stage 分類を行った。Ripa 群では、コントロール群と比較して、注射後 7、14 日で PVR 進行が有意に抑制された。Lipo-Ripa 群ではコントロール群と比較して、注射後 7、14、21、28 日で PVR 進行が有意に抑制された。(図 4)

眼球を異なる時間で摘出し、硝子体、網膜に分離した。分離した各組織中のリパスジル濃度を、Mass-スペックメトリー(LC-MS/MS)で測定した。Lipo-Ripa 群の硝子体内リパスジル濃度は、Ripa 群と比較して 24 時間で 300 倍高く、72 時間で約 20 倍高い値で推移した。網膜は、それぞれの時間で、30 倍、10 倍高い値で推移した。(図 5)

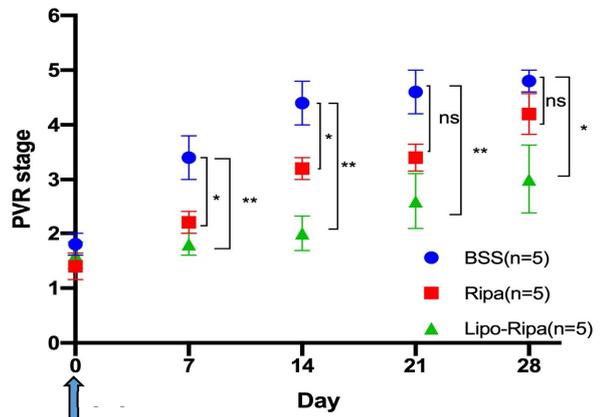


図 4. PVR 進行抑制の検討

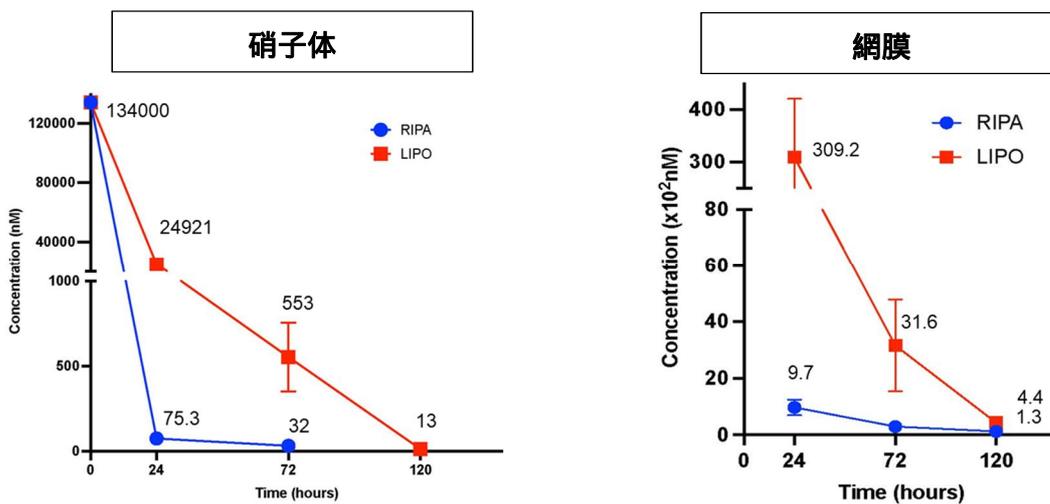


図 5. 硝子体と網膜のリパスジル濃度

2：線維増殖予測、治療効果判定に有用なバイオマーカー分子の同定

ウサギ PVR 作成後、7 日、14 日で眼球摘出を行い、単離した硝子体液、網膜中のペリオスチン、TGF-beta2 濃度を測定した。ペリオスチンは、PVR 眼内で高濃度であった。また、その濃度は、Lipo-Ripa 群で有意に低下していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishikawa Keijiro, Akiyama Masato, Mori Kenichiro, Nakama Takahito, Notomi Shoji, Nakao Shintaro, Kohno Ri-ichiro, Takeda Atsunobu, Sonoda Koh-Hei	4. 巻 234
2. 論文標題 Drainage Retinotomy Confers Risk of Epiretinal Membrane Formation After Vitrectomy for Rhegmatogenous Retinal Detachment Repair	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 20 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajo.2021.07.028	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 Mori Kenichiro, Ishikawa Keijiro, Fukuda Yosuke, Ji Rui, Wada Iori, Kubo Yuki, Akiyama Masato, Notomi Shoji, Murakami Yusuke, Nakao Shintaro, Arakawa Satoshi, Shiose Satomi, Hisatomi Toshio, Yoshida Shigeo, Kannan Ram, Sonoda Koh-Hei	4. 巻 -
2. 論文標題 <i>TNFRSF10A</i> downregulation induces retinal pigment epithelium degeneration during the pathogenesis of age-related macular degeneration and central serous chorioretinopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddac020	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 該当する

1. 著者名 Kubo Yuki, Ishikawa Keijiro, Mori Kenichiro, Kobayashi Yoshiyuki, Nakama Takahito, Arima Mitsuru, Nakao Shintaro, Hisatomi Toshio, Haruta Masatoshi, Sonoda Koh-Hei, Yoshida Shigeo	4. 巻 10
2. 論文標題 Periostin and tenascin-C interaction promotes angiogenesis in ischemic proliferative retinopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66278-1	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Rui ji, Ishikawa K, Mori K, Naoya Matsunaga, Wada I, Nakama T, Nakao S, Shigehiro Ohdo, Sonoda KH;
2. 発表標題 Effects of Liposome-encapsulated Ripasudil on Proliferative Vitreoretinopathy
3. 学会等名 The 14th Joint Meeting of Japan-China-Korea Ophthalmologists, Fukuoka, Japan,
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rui Ji1, Keijiro Ishikawa1, Kenichiro Mori1, Naoya Matsunaga2, Iori Wada1, Takahito Nakama1, Shintaro Nakao1, Shigehiro Ohdo2, Koh-Hei Sonoda1
2. 発表標題 Effects of Liposome-encapsulated Ripasudil on Proliferative Vitreoretinopathy
3. 学会等名 第125回 日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	松永 直哉 (Matsunaga Naoki) (10432915)	九州大学・薬学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	武田 篤信 (Takeda Atsunobu) (40560313)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	中尾 新太郎 (Nakao Shintaro) (50583027)	独立行政法人国立病院機構九州医療センター(臨床研究センター)・その他部局等・客員研究員 (87105)	
研究分担者	村上 祐介 (Murakami Yusuke) (50634995)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	

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