

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09669

研究課題名(和文) 瘢痕化定量技術と薬剤ナノ粒子化による組織移行性の高い濾過胞瘢痕抑制薬の開発

研究課題名(英文) Development of scarring quantification technology and nanoparticles for inhibition of bleb scarring with high tissue penetration

研究代表者

津田 聡 (Tsuda, Satoru)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60791093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：濾過手術後の瘢痕化を抑制し緑内障の手術成績を改善し失明患者を減少させるために、組織移行性に優れ低濃度で効果を示すナノ粒子化瘢痕抑制薬の開発を目標とした。本研究では、コルヒチンプロドラッグ化ナノ粒子がヒトテノン嚢線維芽細胞の増殖を抑制すること、マウス及びラットの濾過手術模倣モデル(結膜切開、マイトマイシンC塗布、強膜トンネル作成、結膜縫合)において濾過胞内部の α -SMA及びPicro-Sirius Red染色陽性の瘢痕組織の形成を大幅に抑制することが明らかとなった。コルヒチンプロドラッグ化ナノ粒子は線維柱帯切除術後の瘢痕抑制作用により、術後眼圧上昇を抑制し、手術成績を改善することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は本邦の中途失明原因第1位であり、患者数も増加中であるため解決すべき重要な眼疾患である。難治性緑内障には線維柱帯切除術等の濾過手術が施行されるが、半数の症例で、房水排出先である濾過胞が瘢痕化し眼圧の再上昇が起こる。術後早期の瘢痕化制御にはMitomycinC術中塗布が用いられるが、瘢痕化を継続的に抑制する治療にはアンメットメディカルニーズが存在する。本研究で見出されたコルヒチンプロドラッグ化ナノ粒子は、眼内への薬剤移行性を高めた薬剤ナノ粒子化技術であり、有効性及び安全性の高い瘢痕化抑制薬の実用化に資するものであり、緑内障の濾過手術の成績を改善し、失明患者数を低減させることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to inhibit scarring after filtration surgery, improve the outcome of glaucoma surgery, and reduce the number of patients with blindness, we aimed to develop a nanoparticle anti-scarring drug that has excellent tissue penetration and is effective at low concentrations. In this study, we demonstrated that colchicine prodrug nanoparticles inhibited the proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts and significantly inhibited the formation of α -SMA and Picro-Sirius Red staining positive scar tissue inside the filtration bleb in a mouse and rat filtration surgery mimicking model (conjunctival incision, mitomycin C application, scleral tunnel creation, and conjunctival suture). Colchicine prodrug nanoparticles are expected to inhibit postoperative intraocular pressure increase and improve surgical outcomes by inhibiting scarring after trabeculectomy.

研究分野：緑内障

キーワード：眼科 緑内障 濾過手術 瘢痕抑制 薬剤開発 ナノ粒子 眼圧

1. 研究開始当初の背景

本邦は超高齢社会を迎え、2040年には高齢者人口は約34%に達する。緑内障は中途失明原因第一位(28.6%)の疾患であり、有病率は70歳以上では10%を上回る。そのため高齢者が社会的・経済的に自立した生活を維持する上で、緑内障は解決すべき重要な疾患である。緑内障では眼圧下降治療がエビデンスの確立された治療であり、保存的治療で眼圧コントロールが不十分な場合には、眼圧下降手術が必要となる。線維柱帯切除術に代表される濾過手術は、濾過胞と呼ばれる、眼内の房水を結膜下に導き眼外へ排出するためのバイパスを作成し、強力な眼圧下降作用を有する標準的術式の1つである。しかし、非生理的な房水流出路であるため、創傷治癒による癒着が過剰に生じると、流出路の癒着が生じ、眼圧下降作用が低下する。そのため細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導する Mytomycin C (以下 MMC) の術中塗布が早期の癒着抑制のために用いられ、手術成績向上に寄与している(Kitazawa Y, et al. Arch Ophthalmol. 1991)。一方で、大規模多施設研究では、MMC 併用線維柱帯切除術後1年及び5年における眼圧16 mmHg未達の達成率は77.6%及び50.1%であり(Sugimoto Y, et al. Ophthalmology. 2015)。MMC 併用濾過手術でも眼圧コントロールが十分達成できていない症例が多数存在し、濾過手術成績をさらに向上する濾過胞癒着抑制薬のアンメットメディカルニーズがある。

本研究者らは、濾過胞癒着抑制の候補薬剤を複数見出し、「濾過胞を維持するための組成物」として知財(特開2018-83778)を有している(Yamamoto K, Tsuda S, et al. *Sci Rep.* 2019)。候補薬の1つであるコルヒチンは、チューブリン重合を阻害し微小管形成を抑制することで、細胞分裂を抑制すると共に、炎症細胞や線維芽細胞の遊走を阻害し、抗炎症作用を示す。TGF- β ・MCP-1・IL-8などの炎症性サイトカインも減少させ、細胞外基質の産生も抑制するなど、濾過胞癒着に関わる様々な機序を抑制する。実際にMMC 併用家兔濾過胞モデルでコルヒチンの眼局所投与による眼圧下降作用及び濾過胞形態維持効果が示された(Kokubun T, Tsuda S, et al. *PLoS One.* 2019)。しかし、長期に癒着を抑制するために使用するには、一般の点眼薬でも頻度の高い眼表面の副作用を低減することが重要であり、眼表面(角結膜)から癒着組織や眼内への移行性に優れ、低濃度で薬効を示す製剤が望ましい。分担研究者が有する薬剤のナノ粒子化技術は、粒子径が100~200nmであると、バリアとなる角膜上皮の透過性が高まり、眼内移行性が改善し(Baba K, Kasai H, et al. *J. Control. Release.* 2011)、20%程の低濃度でも通常の点眼剤と同等の薬効を有する(Ikuta Y, Kasai H, et al. *Sci Rep.* 2017)(図1)。

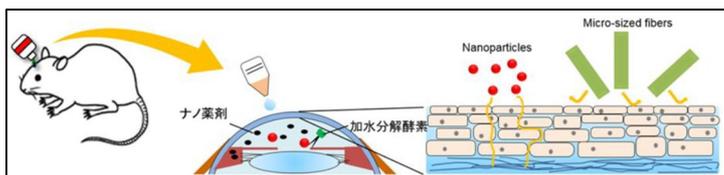


図1 ナノ粒子化による薬剤の眼内移行性の改善

以上より、知財を有する癒着抑制薬を、組織・眼内への薬剤移行性を高めるナノ粒子化技術で最適化し、有効性・安全性の高い癒着抑制薬の開発が可能であると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究者らのこれまでの癒着抑制薬の創薬研究成果に、ナノ粒子化技術を応用し、眼内及び癒着組織内への薬剤移行性を高めることで、より低濃度で薬効を有し、安全性の高い癒着抑制薬を、治療成績を向上させる革新的医薬品として開発することを目的とする。

3. 研究の方法

癒着抑制候補薬のナノ粒子化と細胞増殖抑制効果の検討

癒着抑制作用の知財を有する候補薬剤であるコルヒチンを、眼内で加水分解して作用するようにプロドラッグ化してナノ粒子を作成する。ナノ粒子化の際には再沈法を用いた。作成したプロドラッグ化ナノ粒子についてヒト線維芽細胞を用いた培養実験に用いて、細胞増殖抑制効果を評価した。

ナノ粒子化癒着抑制候補薬のヒトテノン囊線維芽細胞への作用の検討

まずヒトテノン囊培養細胞に複数の濃度条件のナノ粒子化癒着抑制候補薬を投与し、Alamar blue アッセイを行い、その細胞障害性を評価した。

次に TGF- β 刺激により活性化したヒトテノン囊培養細胞に対するナノ粒子化癒着抑制候補薬の細胞増殖抑制作用やアポトーシス誘導作用を BrdU 細胞増殖アッセイ及び TUNEL 法で評価する。また筋線維芽細胞への分化を SMA 染色、F-actin 染色、コラーゲンベース細胞収縮アッセイで評価する。さらに TGF- β の下流のシグナル伝達に及ぼす影響をウェスタンブロッティング法により評価した。

ラット及びマウス濾過手術模倣モデルでの癒痕抑制作用の検討

ラット及びマウスに結膜切開、マイトマイシンC塗布、強膜トンネル作成、結膜縫合を行い濾過手術模倣モデルを作成した。術後1週間または1か月の給餌後、安楽死させたのちに眼球を摘出し、 α -SMA、ピクロシロウスレッド染色、CD45、CD31の組織学的染色を行った。

4. 研究成果

癒痕抑制候補薬のナノ粒子化と細胞増殖抑制効果の検討

コルヒチンの疎水性を高めるためにTML-OAc誘導体(疎水性置換基)を用いてプロドラッグ化を行い、その後、再沈法でナノ粒子化を行いColchicine x TML-OAcナノ粒子を作成した。ヒト線維芽細胞を用いた培養実験では、細胞増殖抑制効果が認められなかった。Colchicine x TML-OAcナノ粒子の加水分解物は細胞増殖抑制効果が認められたことから、ナノ粒子の加水分解が進行していないことが示唆された。

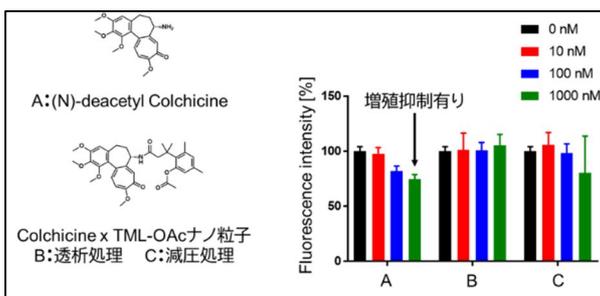


図2 Colchicine x TML-OAc ナノ粒子
右: Colchicine x TML-OAc ナノ粒子
左: ヒト線維芽細胞を培養した際の細胞増殖能を評価

そこで、過去に眼圧下降薬のナノ粒子化で実績のあるTML-OiBu-OBn誘導体を用いてプロドラッグ化とナノ粒子化を行い、Colchicine x TML-OiBu-OBnナノ粒子を作成した。ヒト線維芽細胞培養実験にて加水分解産物である(N)-deacetyl Colchicineと同等の細胞増殖抑制効果が認められた。

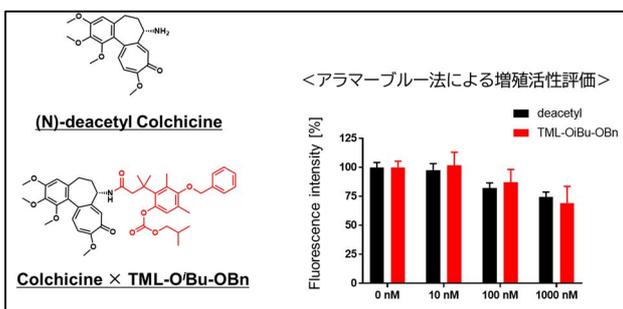


図2 Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子
右: Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子
左: ヒト線維芽細胞を培養した際の細胞増殖能を評価

ナノ粒子化癒痕抑制候補薬のヒトテノン囊線維芽細胞への作用の検討

Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子は、ヒトテノン囊線維芽細胞を用いたAlamar blueアッセイにおいて、 $0.75\mu\text{M}$ 以上の濃度では細胞障害性を有することが明らかになった。またヒトテノン囊線維芽細胞を用いたBrdU細胞増殖アッセイにより、TGF- β 1により活性化した場合に、Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子がより強い細胞増殖抑制効果を示すことが明らかになった(図3)。またTGF- β 1で活性化したヒトテノン囊培養細胞は強い α -SMA蛍光を示し、 $0.5\mu\text{M}$ のColchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子の併用処理により α -SMA発現は顕著に減少した。またColchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子併用処理により、F-actin染色で評価すると未処理および活性化ヒトテノン囊細胞とは異なる不規則な外観の肥大した細胞が著しく縮小した。またコラーゲンベース細胞収縮アッセイにおいても、Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子により、用量依存的にTGF- β 1増強収縮がほぼ完全に阻害された(図4)。

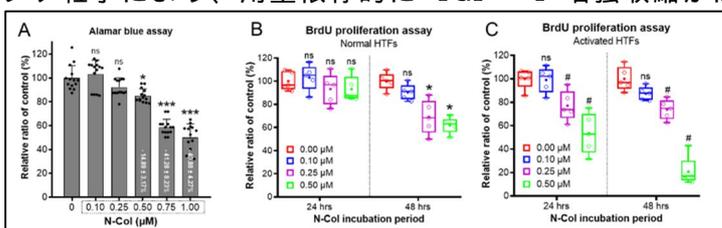


図3 Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子のヒトテノン囊細胞での細胞増殖抑制作用
A: Alamar blue アッセイによる細胞障害性の評価
B: 通常条件下でのヒト線維芽細胞を培養した際のBrdU細胞増殖アッセイ
C: TGF- β 1で培養ヒト線維芽細胞を活性化した際のBrdU細胞増殖アッセイ

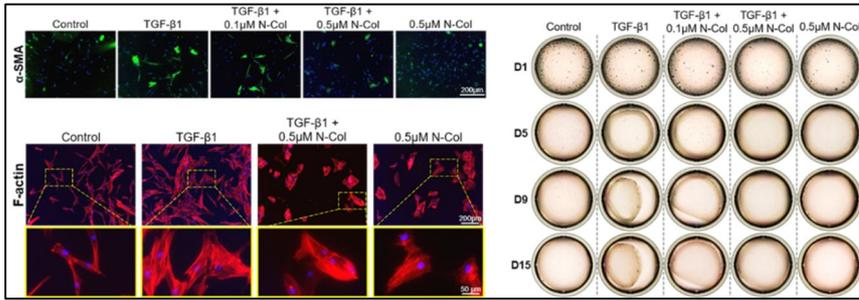


図 4 TGF- β 1 活性化ヒトテノン嚢細胞での Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子の効果
 左上: α -SMA 染色。Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子 (N-Col) で α -SMA 発現減少。
 左下: F-actin 染色。N-Col 処理で肥大した細胞が著しく縮小した
 右: コラーゲンベース細胞収縮アッセイ。N-Col 用量依存的に TGF- β 1 増強収縮を阻害。

次に、TGF- β 1 刺激により活性化したヒトテノン嚢培養細胞において、Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子処理により、Ki67 発現が 71.5% 減少したが、通常条件培養下のヒトテノン嚢培養細胞ではその作用は認められなかった。また TUNEL 法では、TGF- β 1 刺激により活性化したヒトテノン嚢培養細胞は、アポトーシス細胞が 426.7%、通常条件培養下のヒトテノン嚢培養細胞では 179.3% と大幅に増加し、通常のヒトテノン嚢線維芽細胞よりも活性化ヒトテノン嚢線維芽細胞に対して細胞周期停止とアポトーシスレベルの作用を強く認めた (図 5)。

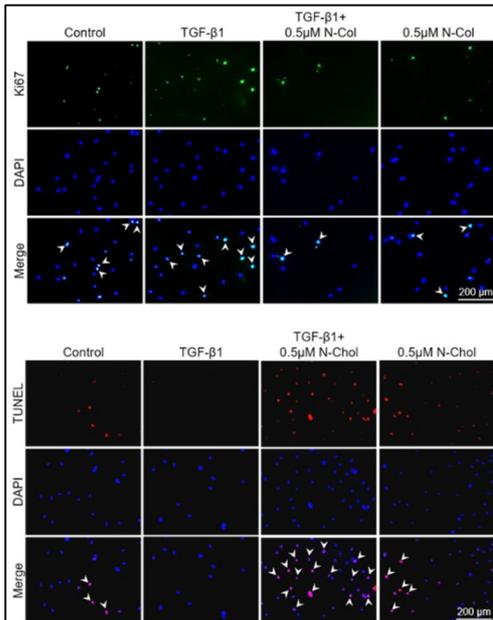


図 5 Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子の細胞増殖抑制及びアポトーシス誘導作用

上: Ki-67 染色。TGF- β 1 刺激下では、Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子 (N-Col) 処理で Ki67 発現が顕著に減少
 下: TUNEL 法。N-Col 処理では、特に TGF- β 1 刺激下でアポトーシス細胞が増加

さらに、ウェスタンブロット法によりヒトテノン嚢線維芽細胞でタンパク質レベルの発現を評価したところ、TGF- β 1 と Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子を併用した場合は、TGF- β 1 単独群と比較して Col-I と α -SMA の発現を減少させた。Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子のみで処理した場合は、Col-I、フィブロネクチン、 α -SMA のタンパク質レベルに変化は見られなかった。また細胞生存については、Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子で処理した活性化ヒトテノン嚢線維芽細胞では p-ERK1/2 比がダウンレギュレーションされ、Bax:Bcl-2 比がアップレギュレーションされたが、通常培養条件下では、Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子は Bax:Bcl-2 比をわずかに誘導しただけであった。さらに、切断されたカスパーゼ 3 陽性細胞は、Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子のみで処理した細胞よりも、TGF- β 1 と Colchicine x TML-OiBu-OBn ナノ粒子で処理した場合に著しく増加した (図 6)。

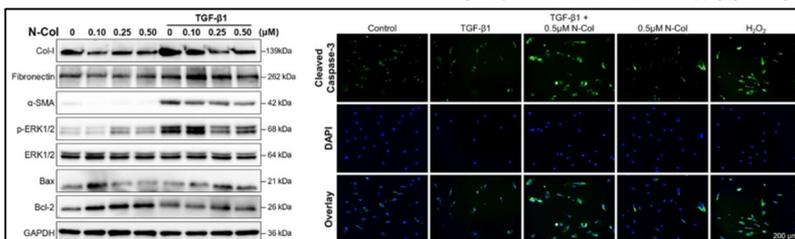


図6 ウェスタンブロット法による Colchicine × TML-OiBu-OBn ナノ粒子の抗線維化及び抗アポトーシス作用

左: TGF- β 1 と Colchicine × TML-OiBu-OBn ナノ粒子 (N-Col) を併用すると、TGF- β 1 単独群と比較して Col-I と α -SMA が減少。N-Col のみで処理すると、Col-I、フィブロネクチン、 α -SMA のタンパク質発現に変化は認められなかった。また N-Col で処理した活性化 HTF では pERK1/2 比がダウンレギュレーションされ、Bax:Bcl-2 比がアップレギュレーションされた。通常培養条件下では、N-Col は Bax:Bcl-2 比をわずかに誘導した。
右: cleavedCaspase-3 陽性細胞は、TGF- β 1+N-Col 処理で著しく増加した。

ラット及びマウス濾過手術模倣モデルでの癒痕抑制作用の検討

ラット及びマウスに結膜切開、マイトマイシン C 塗布、強膜トンネル作成、結膜縫合を行い濾過手術模倣モデルを作成したところ (図 7)、強膜トンネルの周囲に結膜・テノン嚢組織の癒痕化を形成することを確認した。術後 1 週間または 1 か月の給餌後、安楽死させたのちに眼球を摘出し、 α -SMA、ピクロシリウスレッド染色、CD45、CD31 の組織学的染色を行ったところ、 α -SMA を用いた IHC-IF 染色により、Colchicine × TML-OiBu-OBn ナノ粒子治療によりプレブ内での発現が抑制されることが明らかとなった。また Picro-Sirius Red 染色により、コラゲン増殖抑制効果も明らかとなった。

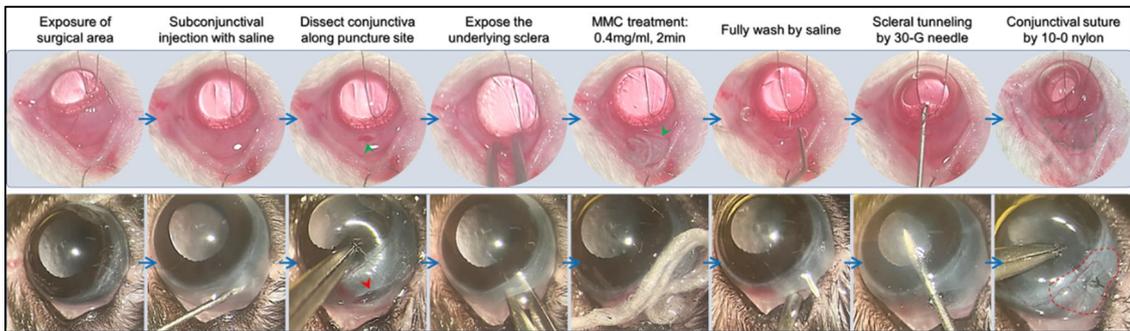


図7 濾過手術模倣モデル

上: ラット
下: マウス

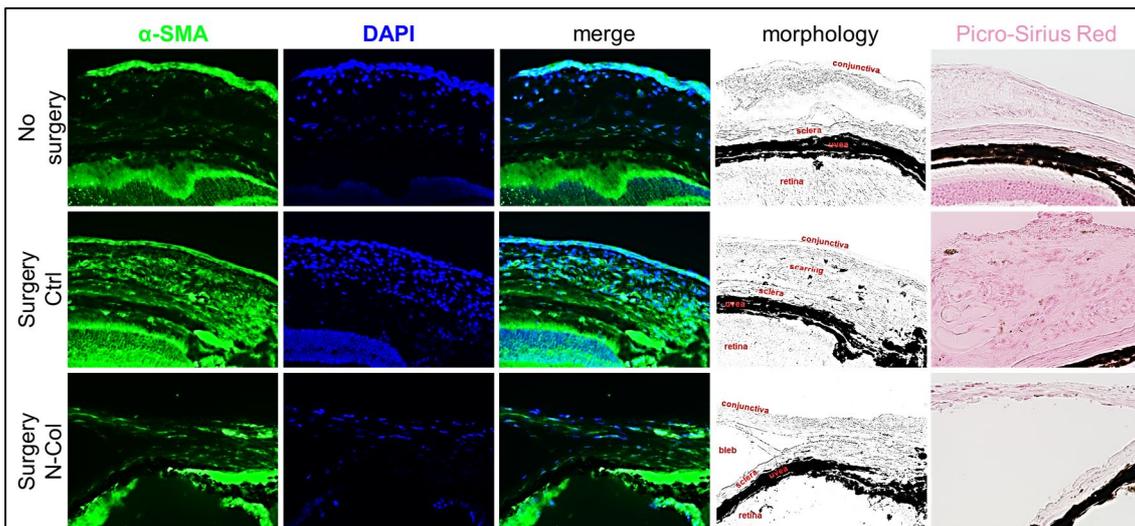


図7 濾過手術模倣モデルにおける Colchicine × TML-OiBu-OBn ナノ粒子の癒痕抑制作用
本モデルによりテノン嚢の増殖が確認され、Colchicine × TML-OiBu-OBn ナノ粒子 (N-Col) によりテノン嚢の増殖が抑制された

以上の結果は、本コルヒチンプロドラッグ化ナノ粒子 (Colchicine × TML-OiBu-OBn ナノ粒子) が濾過手術後のテノン嚢線維芽細胞の増殖を抑制することで、濾過胞内部の過剰な癒痕化を抑制し、濾過手術の成績を向上させる可能性を示すものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yoshida Masaaki, Kokubun Taiki, Sato Kota, Tsuda Satoru, Yokoyama Yu, Himori Noriko, Nakazawa Toru	4. 巻 64
2. 論文標題 DPP-4 Inhibitors Attenuate Fibrosis After Glaucoma Filtering Surgery by Suppressing the TGF- /Smad Signaling Pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 2~2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.64.10.2	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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 癬痕形成抑制剤、線維芽細胞増殖抑制剤及びナノ粒子 の製造方法	発明者 中澤徹ほか	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/ 9703	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	中澤 徹 (Nakazawa Toru) (30361075)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	笠井 均 (Kasai Hitoshi) (30312680)	東北大学・多元物質科学研究所・教授 (11301)	
研究分担者	小関 良卓 (Koseki Yoshitaka) (80780634)	東北大学・多元物質科学研究所・助教 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	佐藤 孝太 (Sato Kota) (50732327)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	
研究分担者	國分 太貴 (Kokubun Taiki) (30646443)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	途中退職し本プロジェクトから脱退した

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