

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462742

研究課題名(和文) 新生血管阻害剤を付加したセラミック微小球による新しい加齢黄斑変性に対する治療

研究課題名(英文) New therapy of wet-age related macular degeneraton using ceramic microparticle with anti angiogenic drug

研究代表者

三木 克朗 (Miki, Katsuaki)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：20602858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：セラミック微小球に付加する血管新生阻害剤はメトトレキサート、シスプラチンを選択した。薬物濃度は、tube formation assayにて、メトトレキサートは5 μ g/ml,シスプラチンは0.5 μ g/mlと決定した。レーザー誘発マウス加齢黄斑変性モデルにセラミック微小球を網膜内投与すると、PBS投与群と比較し脈絡膜新生血管を抑制する傾向にあった。

血管新生抑制剤付加したセラミック微小球の投与は今後検討している。

研究成果の概要(英文)：We selected two anti-angiogenesis drug as methotrexate and cisplatin. We checked the concentration of those drug of inhibition of angiogenesis using tube formaton assay.and those drug concentration determined 5 μ g/ml of methotrexate and 0.5 μ g/ml of cisplatin. We assessed the effect of embolization by ceramic microparticle by laser induced age related macular degeneration mouse model.Ceramic microparticle tend to inhibit the area of choridal neovasularizaton comparing control. We are trying the investigation of the effect of antiangiogenic effect by ceramic microparticle with anti-angiogenic drug by laser induced age related macular degeneration mouse model.

研究分野：加齢黄斑変性

キーワード：加齢黄斑変性 血管新生

1. 研究開始当初の背景

現在加齢黄斑変性 (AMD) は近年高齢化と生活の欧米化に伴い著しく発病率の増加を認め本邦における失明原因の第 4 位を占める疾患である。

AMD は眼球後方にある神経網膜の光学的、解剖学的、機能的中心に位置する黄斑部に異常な新生血管が発生して出血や細胞増殖を引き起こし、最終的に神経網膜の構造的、機能的破壊を招いて著しい視機能障害の原因となる。病態の根幹となる新生血管は、網膜内から発生する網膜新生血管と、網膜外側に存在する脈絡膜から発生する脈絡膜新生血管に分類される。

従来 AMD の治療法には、新生血管に対するレーザー光凝固、光線力学療法に加え組織破壊を伴わない血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) をターゲットにした抗 VEGF 療法の出現により黄斑部に多発する AMD への治療適応は拡大し、視機能を維持できる症例が増加した。

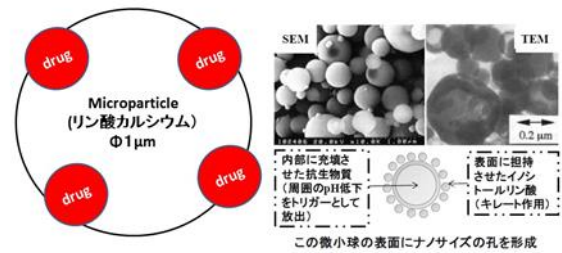
AMD に対する抗 VEGF 療法の治療成績は、視力が向上する症例が 40% 弱であり、また視機能維持のためには 1 年間に平均 5.5 回と頻回の再投与が必要である事である。糖尿病網膜による眼内新生血管は硝子体腔に発生するため、手術による完全除去が可能であり、寛解状態が維持できる。

しかし AMD は新生血管発生部位が黄斑部であり外科的切除が不可能である。また抗 VEGF 療法は、新生血管を完全消失する事が出来きない。抗 VEGF 療法の問題は、残存する新生血管からの滲出物による網膜障害を防ぐため頻回に抗 VEGF 療法が必要である為、患者側、医療側双方にとって物理的、経済的負担が大きい点にある。

本研究は、糸状菌 (*aspergillus fumigatus*) から産生される低分子物質フマギリン誘導体で様々な悪性腫瘍における血管抑制効果をもつ TNP470 を、血管塞栓効果を持つリン酸三カルシウム (β -tricalcium phosphate: TCP) セメントに組み合わせた新しい吸収性セラミック微小球 (calcium-phosphate ceramic microsphere) を使用する。吸収性セラミック微小球の特徴は、①直径約 $1\mu\text{m}$ と小さく毛細血管まで到達する事が可能であること、②局所的に薬物作用を発現させることにより TNP-470 の副作用であるふらつきや目眩を抑制することができる事、③ERP 効果 (enhanced permeability and retention effect: 下図) により微小球そのものが新生血管内に蓄積、閉塞するつまり chemoembolization する事 (Cancer Sci. 2010 Apr; 101(4): 984-90.) である。本研

究の目標は、AMD に対する、抗 VEGF 療法にかわる新しい機序により血管新生抑制剤である TNP-470 と、セラミック微小球という新しいバイオマテリアルによる薬物徐放効果と血管閉塞療法による化学的、物理的かつ非侵襲的な治療の開発を目的とする。(セラミック微小球は明治大学 生体関連材料研究室 相沢 守教授より寄与される。)

血管新生阻害剤を付加したセラミック微小球を用いて脈絡膜新生血管を塞栓する



2. 研究の目的

本研究は、加齢黄斑変性モデルマウスに対し、広域作用型新生血管抑制剤である TNP-470 (フマギリン誘導体: thalidomide) に chemoembolization 効果を持つ新しいバイオマテリアルである吸収性セラミック微小球を投与し、①新生血管退縮と②血管閉塞を目指した新たな治療法の確立が目的である。

3. 研究の方法

①血管新生阻害剤の選択、評価

当初血管新生抑制剤として使用する予定であった TNP470 は製造中止となったため、新たな新生血管抑制剤を付加する事を検討した。抗がん剤であり、細胞増殖を抑制するメトトレキサート、シスプラチン、また VEGF 発現に寄与している HIF (hypoxia induced factor) 抑制効果のあるジゴキシンの 3 剤を選択した。各々の薬剤における血管新生抑制効果の評価および適正濃度の決定を、HUVEC cell を用いた tube formation assay にて施行した。

②加齢黄斑変性モデルの作成

加齢黄斑変性モデルの作成は、C57 マウス、brown-norway ラットにて作成した。生後 4-8 週令の C57 マウス、brown-norway ラットを用いて作成した。対象動物 (マウス、ラット) に麻酔を施行、ミドリン P^R 点眼にて散瞳したのちに、スリットランプ下で眼底にレーザー光凝固施行した。(凝固条件: $100\mu\text{m}$, 0.1S, 100W) レーザー凝固後 14 日目に屠殺し、心臓よりフルオレセンデキストラン 1ml を注入し眼球摘出、摘出眼球を 10%ホルマリンに 3 時間固定し P B

Sにてリンスし脈絡膜を摘出し顕微鏡下に
て脈絡膜新生血管を確認した。

③セラミック微小球の新生血管閉塞効果の判定

セラミック微小球単独での新生血管閉塞効果を、加齢黄斑変性モデルマウスを用いて確認した。C57 マウスの眼内にレーザー照射と同時に、ガラスキャピラリーにて、レーザー照射部位近傍 (1/2 乳頭径以内に) PBS(コントロール群), セラミック微小球を網膜下に注入した。レーザー照射後 14 日目に上記の方法にて choroidal flatmount 作成し脈絡膜新生血管面積を WinRoof 画像処理ソフトウェア(三谷商事、福井、日本)にて測定し両群間の比較検討した。

4. 研究成果

1)血管新生阻害剤の選択、評価

上記に述べたように、血管新生阻害剤をメトトレキセート、シスプラチン、ジゴキシンの3剤の新生血管阻害剤を選択し、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC:Lonza)を用いた tube formation assay にて血管内皮増殖抑制効果を見た。方法は上記の薬剤を 0, 0.5, 2.5, 5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で細胞培養液(EGM2, Lonza)に溶解し、HUVEC をマトリゲル上で 12-16 時間培養し、tube formation の有無について検討した。結果は、メトトレキセートは 5 $\mu\text{g/ml}$ 、シスプラチンは、0.5 $\mu\text{g/mL}$ で tube formation の形成阻害を認めた。ジゴキシンは溶解し、培養中に再結晶化したために結果がでなかった。メトトレキセートは 5 $\mu\text{g/ml}$ 、シスプラチンは、0.5 $\mu\text{g/mL}$ の濃度でセラミック微小球に付加する事に決定した。

2)加齢黄斑変性モデルにおける脈絡膜新生血管の評価。

マウス、ラットに対し、レーザー照射後 14 日目で、モデル動物に対し麻酔下にてフルオレセインデキストランを心臓より注入し眼球摘出し、choroidal flatmount を作成し脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization:CNV)の発生率を検討した。CNV 発生率は 78%であった。また安定した CNV 面積を得るためには視神経乳頭より 1 乳頭径以上離れた部位にレーザー照射した。

③セラミック微小球の新生血管閉塞効果の判定

セラミック微小球の新生血管塞栓効果を見るべく、セラミック微小球単独群(PBSに溶解)。コントロール群(PBSのみ)の2群間で比較検討した。

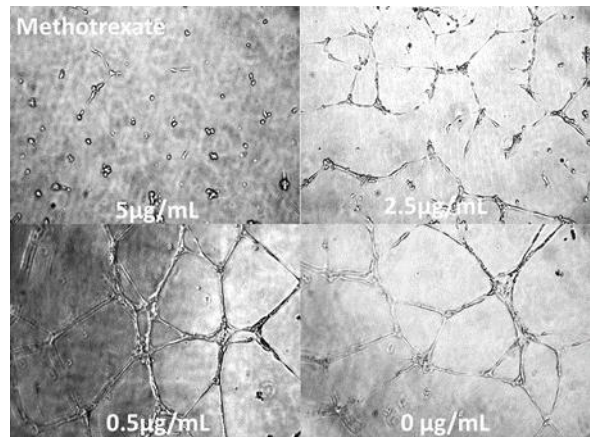
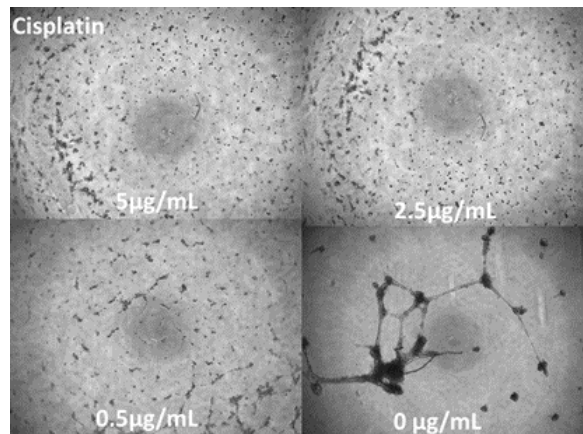
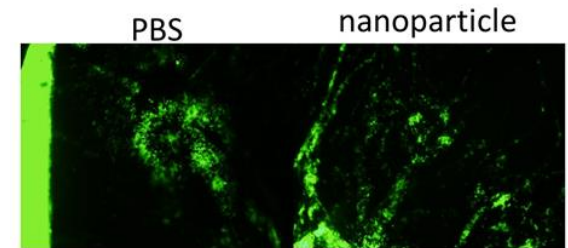
C57 マウスにレーザー照射と同時にセラミック微小球単独群、PBS群のみに混入したものを 1 μl レザー照射部位の網膜下に注射した。レーザー照射後 14 日目に choroidal flatmount 作成し CNV 面積を測定した。

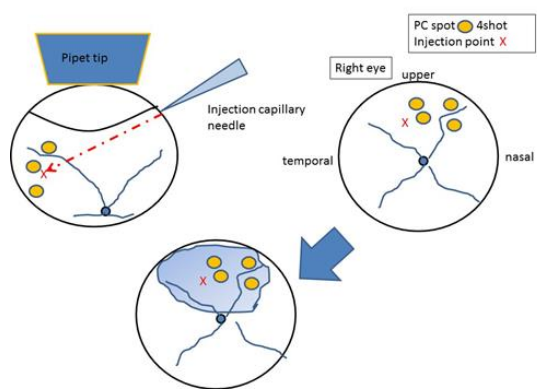
コントロール群は $3332 \pm 124 \mu\text{m}^2$, セラミック単独群は $2832 \pm 224 \mu\text{m}^2$ と減少する傾向にあるも有意差はなかった。

④セラミック微小球の生体内での動態

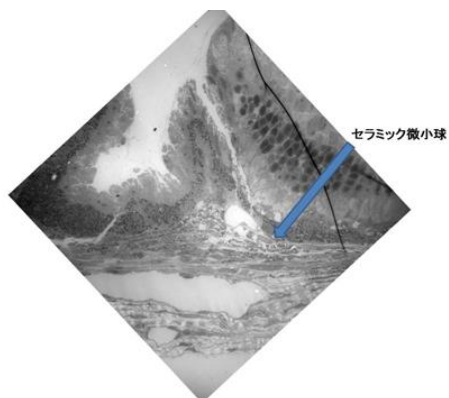
C57 マウスの眼球にレーザー照射と同時にセラミック微小球単独を網膜下注射施行した。レーザー照射後 3 日 7 日 14 日 60 日で眼球摘出し光学顕微鏡、電子顕微鏡で観察した。照射後 3 日目でセラミック微小球が、網膜色素上皮内に取り込まれており、レーザー照射部位に集積しており、照射後 7 日目でも同様の所見がみられた。照射後 60 日目ではセラミック微小球の融解が見受けられた。

レーザー照射後14日目の脈絡膜新生血管





D



5. 主な発表論文等 現在作成中

〔産業財産権〕

○出願状況 (なし)

国内外の別 :

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 克朗 (MIKI, Katsuaki)

関西医科大学 医学部 助教

研究者番号 : 20602858

(2) 研究分担者

相澤 守 (AIZAWA, Mamoru)

明治大学 理工学部 応用科学

研究者番号 : 10255713

高橋 寛二 (TAKAHASHI, Kanji)

関西医科大学 医学部 教授

研究者番号 : 60216710

江本 精 (EMOTO Makoto)

国際医療福祉大学、保健医療学部、教授

研究者番号 : 80258540