

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2016

課題番号：16H06909

研究課題名（和文）生体ナノ材料を用いた加齢黄斑変性の新規治療法の開発

研究課題名（英文）The development of novel treatment of age-related macular degeneration using high-density lipoprotein

研究代表者

須田 謙史（Suda, Kenji）

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：70779157

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,100,000円

研究成果の概要（和文）：申請者は、「善玉コレステロール」の別名で知られる高比重リポタンパク（HDL）の再構成変異体を、疾患部位まで効率良く薬剤を送達するための担体として用いるドラッグデリバリーシステムの開発を行ってきた。本研究では薬剤を含むHDLを点眼することにより、加齢黄斑変性の点眼治療を達成することを目的に、実験を行った。HDLに効率よく取り込ませることができる薬剤を探索した結果、塩酸パゾパニブを見出した。加齢黄斑変性のモデルマウスに塩酸パゾパニブを含む再構成HDL変異体を点眼した結果、病変部位を抑制させることに成功した。

研究成果の概要（英文）：We have developed the novel drug delivery system using mutated forms of recombinant high-density lipoprotein (HDL), which is famous for anti-atherogenic property. For the achievement of less-invasive therapy of age-related macular degeneration, we searched for anti-angiogenetic drug that can be encapsulated into recombinant HDL. As a result, we succeeded in preparation of a recombinant HDL mutant loaded with pazopanib hydrochloride. We also confirmed the therapeutic potential of the complex in laser-induced choroidal neovascularization model mice.

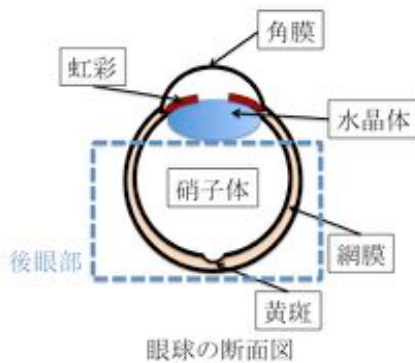
研究分野：眼科

キーワード：点眼ドラッグデリバリーシステム 高比重リポタンパク 加齢黄斑変性

1. 研究開始当初の背景

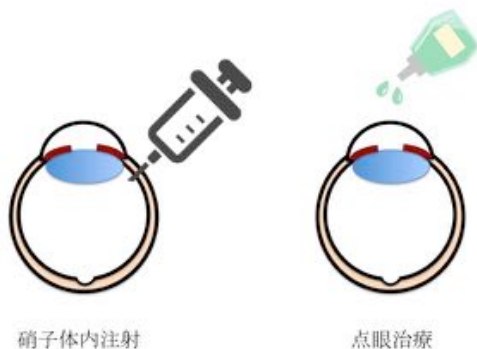
高齢化社会の到来により、後眼部（図1）を病変部位とする疾患が急増することが予想されている。加齢黄斑変性や糖尿病網膜症は、我が国における失明原因の多くを占めており（糖尿病網膜症は第二位、加齢黄斑変性は第四位）、後眼部での異常な血管新生がその病態である。特に加齢黄斑変性の全世界での患者数は1億人を超え、日本では現在70万人とされており、今後急速に増えることが予想されている。

【図1】眼球の断面図



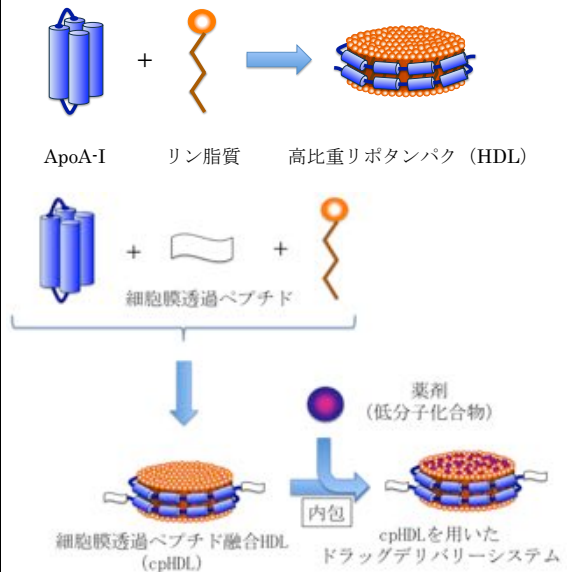
既存の治療方法としては、定期的に医師が患者の眼球内に投与する（硝子体内注射、図2左）というものであり、注射回数の増加が医療者側の労働負担・患者側の通院負担また注射による感染のリスクなど、多大な社会コストがかかっているのが現状である。そのため点眼投与（図2右）によるドラッグデリバリーシステム（DDS）の構築が待たれているのが現状であるが、点眼投与を目的とした低分子化合物の血管新生阻害 DDS 製剤は既に存在するものの、臨床治験にて点眼投与で後眼部の血管新生病変に対する有効性を証明できたものは未だ存在しない。

【図2】後眼部へのドラッグデリバリーシステム（DDS）



一方これまで我々は、高比重リポタンパク（HDL）の変異体が低分子薬物のためのDDSにおいて有用であることを示してきた（*Nanomedicine (Lond)* 2010;5(6): 867-79; *ACS Nano* 2013;7(10):8908-16; *Biomater. Sci.* 2015;3(5):712-5）。HDLはリン脂質二重膜とapoA-I蛋白質からなり、遺伝子工学的にapoA-Iに細胞膜透過ペプチドを融合させたHDL（cpHDL、図3）を用いることで悪性腫瘍細胞内への効率的な制がん剤送達を達成した。

【図3】細胞膜透過ペプチド融合HDL



細胞膜透過ペプチドは細胞に高い親和性を示すため、点眼されたcpHDLは眼表面から吸収されやすくなることが容易に予想できる。またcpHDLの大きさは抗体と同程度の10nmであるため、眼組織を浸透することができる。さらに加齢黄斑変性の主座となる網膜色素上皮細胞にはHDLのレセプターであるクラス1スカベンジャーレセプターが多く局在している。以上のことから、cpHDLが加齢黄斑変性に対する点眼DDSに応用できる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、加齢黄斑変性の病変部位へ効率良く薬物を送達するシステムを構築し、加齢黄斑変性患者のための点眼治療法を開発するために、下記の内容の達成を目指した。

- (1)血管新生抑制効果を有する低分子化合物を内包したcpHDLの作製
- (2)加齢黄斑変性モデルマウスを用いる薬物内包cpHDLの点眼による前臨床試験

3. 研究の方法

(1)点眼による後眼部への薬剤送達に最適化した再構成 HDL 変異体に、内包可能な薬剤を探索した。cpHDL は変異型 apoA-I、リン脂質、及び内包薬剤である低分子化合物を混濁することにより作製するが、内包薬剤の性質によって混濁する際の手順や条件や緩衝液の種類、場合によっては添加剤の併用などの条件検討を行った。

(2)作製した cpHDL の粒子径、形状を透過型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡で評価した。

(3)薬剤を内包した再構成 HDL 変異体を加齢黄斑変性の動物モデルであるレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルマウスに1週間1日2回点眼した後、脈絡膜新生血管の面積を定量することで点眼治療の効果を評価した。

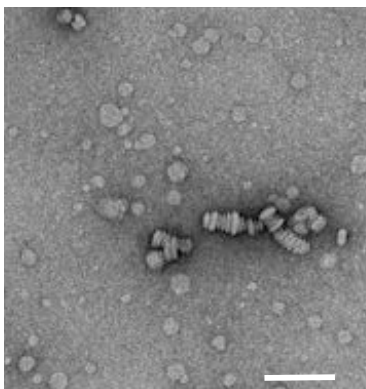
(4)薬剤を内包した再構成 HDL 変異体の安全性を確認するため、ヒト角膜培養細胞を用いて安全性試験を行った

4. 研究成果

(1)今回内包を試した中で最も効率的に内包できたのは塩酸パゾパニブであった。薬剤を内包していない cpHDL に対して塩酸パゾパニブ溶液を添加し、30分加熱することで内包することが可能であった。薬剤内包の確認は密度勾配遠心による精製および超高速液体クロマトグラフィーによる薬剤濃度定量により行った。

(2)塩酸パゾパニブを内包した cpHDL に酢酸ウラン染色を行った後、透過型電子顕微鏡を用いて観察したところ、粒子径は 10-20nm であることが確認できた (図4)。この粒子径は再構成 HDL のサイズとして矛盾しない大きさであった。

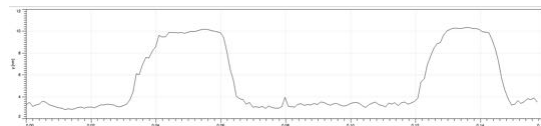
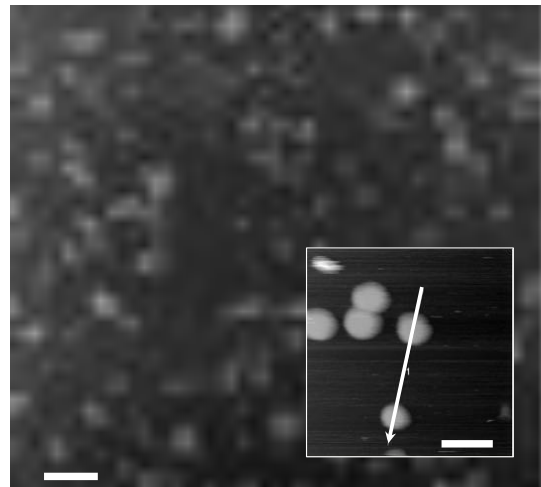
【図4】透過型顕微鏡で観察した cpHDL



また粒子形状を確認するため、原子間力顕微鏡を用いて観察を行ったところ、cpHDL の形状は直径 15~30nm に対して高さ約 7nm

の円盤状であることがわかった (図5)。この結果は、人工的に作製した薬剤内包 cpHDL が再構成した野生型 HDL と類似の構造を有することを示唆している。

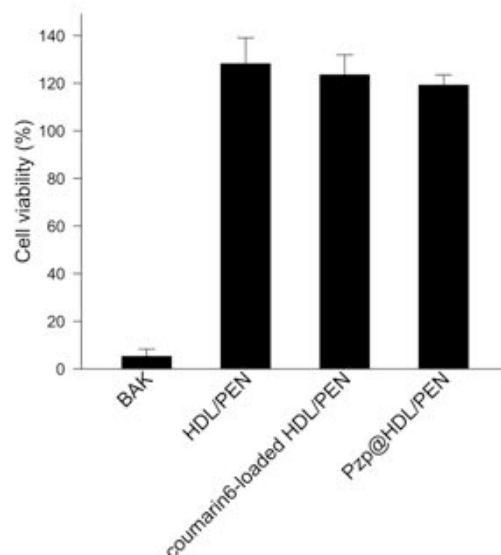
【図5】原子間力顕微鏡で観察した cpHDL



(3)塩酸パゾパニブを内包した再構成 HDL 変異体の点眼群はコントロール群と比較して有意に脈絡膜新生血管を退縮させることがわかった。注目すべきは、薬剤を内包しない cpHDL の点眼のみでも無点眼群と比較して有意の治療効果を認めた点である。

(4)安全性試験の結果、薬剤内包 cpHDL の角膜毒性は認めなかった。

【図6】角膜毒性試験



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 須田謙史、村上達也、後藤謙元、吉村長久。HDL 変異体を用いた後眼部ドラッグデリバリーシステムの開発。第 55 回日本網膜硝子体学会総会。2016 年 12 月 2 日。ベルサール渋谷ガーデン (東京都渋谷区)。

(2) 須田謙史、村上達也、後藤謙元、辻川明孝。HDL 変異体による後眼部ドラッグデリバリー治療の評価。第 121 回日本眼科学会総会。2017 年 4 月 9 日。東京国際フォーラム (東京都千代田区)。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：高密度リポタンパク質およびその細胞親和性ペプチドを融合した高密度リポタンパク質の点眼による後眼部薬物デリバリー
発明者：須田謙史、村上達也、吉村長久、後藤謙元
権利者：同上
種類：特許

番号：PCT/JP2015/86203

出願年月日：2015 年 12 月 25 日

国内外の別：国際出願

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須田 謙史 (SUDA, Kenji)

京都大学医学部附属病院眼科・医員

研究者番号：70779157

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

村上 達也 (MURAKAMI, Tatsuya)

富山県立大学工学部医薬品工学科・教授