

平成21年 5月18日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390471

研究課題名（和文） 加齢黄斑変性に対する血管内皮増殖因子を標的としたドラッグデリバリーシステムの開発

研究課題名（英文） Development of New Drug Delivery Systems to Target Vascular Endothelial Growth Factor in Age-Related Macular Degeneration

研究代表者

小椋 祐一郎（OGURA YUICHIRO）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70191963

研究成果の概要：加齢黄斑変性は成人失明の主要原因である。これまで光線力学的療法が標準的な治療法であったが最近、抗血管内皮増殖因子（VEGF）療法の有効性が欧米で示され、国内でも治療の選択肢となってくるが、4～6週間ごとの硝子体内注射を必要とするため合併症が懸念される。注射回数を減らして有効濃度を保てるようなドラッグデリバリーシステムの開発のため、ゼラチンハイドロゲルシートを作製したところ、ポリイオンコンプレックスを形成して抗体を結合できることがわかった。また siRNA を産生するプラスミドをマウスの静脈内に大量投与すると網膜内に導入可能であることがわかった。VEGF 発現に関与している ICAM-1 の発現を抑える siRNA 導入で培養細胞における ICAM-1 の発現を抑制することができた。今後、大型動物における抗 VEGF 抗体の徐放試験、siRNA 導入試験を進めていく。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2007年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼細胞生物学・加齢黄斑変性

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は高齢者の失明の主要原因であり、有効な治療法の開発は高齢者の失明防止の観点から社会的意義も非常に大きい。現在、光線力学的療法（PDT）が国内における標準的な治療法であるが、海外で有効性が示された抗血管内皮増殖因子（VEGF）療法が国内でも認可され、より有効な治療法として期待されるが、薬剤の半減期に関連して4～6

週間ごとに眼内に薬剤を注射する必要があり、薬剤だけでなく注射手技に関連する合併症の危険が懸念される。そのため、薬剤投与回数を減らして、薬剤の有効濃度を長期に保てるようなドラッグデリバリーシステムの開発が望まれるが、低分子量の薬剤と違い、抗体やサイトカインの徐放には製造段階での加熱処理は薬剤失活の原因となり開発の壁となっている。

2. 研究の目的

抗体やサイトカインを眼内に徐放できる新しいドラッグデリバリーシステムを開発することである。

3. 研究の方法

(1) ゼラチンハイドロゲルシートの作製：等電点4および9のゼラチンを37度で蒸留水に溶解して10%水溶液を作り、グルタルアルデヒド溶液の濃度を変えて添加した後、速やかにプリプロピレンシート上に流したものを4度に冷却して表面にゼラチンハイドロゲルの薄膜を形成させ、そのまま加湿環境で14時間静置してゼラチンを架橋させる。その後、37度のグリシン溶液中で残存したグルタルアルデヒドに由来する反応基を中和させたものを洗浄して凍結乾燥によりゼラチンハイドロゲルシートを得た。

(2) 抗体、サイトカインのゼラチンハイドロゲルへの結合性試験：ゼラチンハイドロゲルへの抗体やサイトカインの結合性を、ゼラチンの等電点の違い、グルタルアルデヒドの濃度（架橋率）によって検討した。

(3) 培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞へのsiRNA導入実験：siRNA導入可能かどうか検討するために、糖負荷によるICAM-1の発現亢進を抑制できるかどうかICAM-1特異的siRNAを培養網膜色素上皮細胞に導入して検討した。

(4) マウスへのプラスミドsiRNAの導入試験：hydrodynamics-based transfection techniqueを用いてマウスに静脈内大量投与を行い、網膜内にプラスミドが導入可能かGFP発現プラスミドで確認した。次に、ICAM-1特異的siRNAを組み込んだプラスミド導入により、STZ誘発糖尿病マウスにおけるICAM-1の発現亢進を抑制できるか検討した。

4. 研究成果

(1) ゼラチンハイドロゲルの乾燥シートを作製した。水溶液に浸してもゲルシートとして手術操作に耐える強度を確認した。グルタルアルデヒドの濃度を上げると架橋率が上昇し含水率低下、生体での分解性が低下することがわかった。

(2) 塩基性サイトカインでは酸性（等電点4）のゼラチンで作製したシートに有為に結合した。等電点が6-8の抗体においてはいずれのゼラチンにも結合可能であることが確認できた。ゼラチンハイドロゲルの架橋率を上げると、シートに結合させたサイトカインは放出が緩徐になり長期に徐放できること

が確認できた。

(3) 培養血管内皮細胞に糖負荷を行うとICAM-1の発現が亢進したが、ICAM-1特異的siRNAを導入することによりこの発現が抑制できることを確認した。また、siRNAの導入は蛍光標識siRNAを用いて確認した。導入による細胞毒性も認めなかった。

(4) GFP発現プラスミドのマウスの静脈内に大量投与した網膜の切片を蛍光顕微鏡で観察した結果、網膜内にプラスミドが導入されることが確認された。また、STZ誘発糖尿病マウスにおけるICAM-1の発現をELISAで確認し、ICAM-1特異的siRNAを徐放可能なプラスミド導入によりこの発現亢進が抑制されることが確認された。

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6件）

- ① Sato R, Yasukawa T, Hirano Y, Ogura Y. Early-onset macular holes following ruptured retinal arterial macroaneurysms. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 246: 1779-1782, 2008, 査読有
- ② Takase A, Yasukawa T, Kato A, Ogura Y. Suppressive effect of short-interfering RNA on hyperglycemia-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 on cultured vascular endothelial cells. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 246: 989-992, 2008, 査読有
- ③ Yasukawa T, Wiedemann P, Hoffmann S, Kacza J, Eichler W, Wang YS, Nishiwaki A, Seeger J, Ogura Y. Glycooxidized particles mimic lipofuscin accumulation in aging eyes: a new age-related macular degeneration model in rabbits. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 245: 1475-1485, 2007, 査読有
- ④ Tokoro M, Yasukawa T, Okada M, Ogura Y, Uchida S. Copper foreign body in the lens without damage of iris and lens capsule. Int Ophthalmol. 27: 329-331, 2007, 査読有

⑤ Yasukawa T, Tabata Y, Kimura H, Kunou N, Ogura Y. Development of drug-delivery systems to the posterior segments of the eye. *Expert Rev Ophthalmol.* 2: 197-211, 2007, 査読有

⑥ Yasukawa T, Ogura Y, Kimura H, Sakurai E, Tabata Y. Drug delivery from ocular implants. *Expert Opin Drug Deliv.* 3: 261-273, 2006, 査読有

[学会発表] (計 8 件)

① Yasukawa T, Wiedemann P, Hirata M, Takase A, Ogura Y. Fundus autofluorescence in a rabbit age-related macular degeneration model induced by simulation of lipofuscin accumulation. 26th meeting of the Club Jules Gonin, Sep. 10-13, 2008, St. Moritz, Switzerland

② Yasukawa T, Tokoro M, Sakurai E, Yoshida M, Ogura Y. Long-term outcome of radiation therapy for exudative age-related macular degeneration in Japanese patients. World Ophthalmology Congress (WOC) 2008, June 28-July 2, 2008, Hong Kong, China

③ Hirano Y, Sakurai E, Matsubara A, Ogura Y. Suppression of ICAM-1 in Murine retina by plasmid interfering RNAs. 2008 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, May 1, 2008, Fort Lauderdale, USA

④ Yasukawa T, Nishiwaki A, Wiedemann P, Takase A, Yafai Y, Eichler W, Bringmann A, Ogura Y. Three-dimensional spheroid culture system redifferentiates retinal pigment epithelial cells independent of number of passages. 2008 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, May 1, 2008, Fort

Lauderdale, USA

⑤ Yasukawa T, Wiedemann P, Hirata M, Takase A, Kunou N, Kimura E, Eichler W, Ogura Y. Fundus autofluorescence in a rabbit model of age-related macular degeneration induced by subretinal implantation of imitation lipofuscin. SOE The 16th congress of the European Society of Ophthalmology, June 9-12, 2007, Wien, Austria

⑥ Yasukawa T, Wiedemann P, Takase A, Nishiwaki A, Hirata M, Kacza J, Yafai Y, Eichler W, Seeger J, Ogura Y. Drusen formation in a three-dimensional culture system of retinal pigment epithelial cells. 2007 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, May 7, 2007, Fort Lauderdale, USA

⑦ Yasukawa T, Wiedemann P, Kacza J, Yafai Y, Eichler W, Hoffmann S, Seeger J, Ogura Y. Drusen in aging eyes: a masterpiece of retinal pigment epithelium. 25th meeting of the Club Jules Gonin, Oct. 15-20, 2006, Cape Town, South Africa

⑧ Yasukawa T, Wiedemann P, Kacza J, Takase A, Seeger J, Ogura Y. In vitro observation system for basal functions of retinal pigment epithelium. 2006 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, May 1, 2006, Fort Lauderdale, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小椋 祐一郎 (OGURA YUICHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70191963

(2) 研究分担者

吉田 宗徳 (YOSHIDA MUNENORI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

授

研究者番号：60273447

櫻井 英二 (SAKURAI EIJI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30305528

安川 力 (YASUKAWA TSUTOMU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

授

研究者番号：00324632

(3) 連携研究者

なし