

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K12078

研究課題名(和文)自己集合性ペプチドを用いた硝子体再建術

研究課題名(英文)Vitreous reconstruction using a self-assembling peptide

研究代表者

坂口 裕和 (Sakaguchi, Hirokazu)

大阪大学・医学系研究科・招へい教授

研究者番号：80379172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：網膜剥離治療を行う際、硝子体が除去され、眼内に網膜復位材が注入される。現在臨床で使用されている網膜復位材には、ガスやシリコンオイルがあるが、それぞれに問題がある。さらに、網膜剥離治療により硝子体が除かれた眼は、加齢黄斑変性症等の治療薬の薬剤効果期間が硝子体のある眼に比べ短いことが問題となっている。我々は、自己集合性ペプチドゲルを眼内に充填することで、網膜復位効果を有し、さらには硝子体と同様以上の治療薬の薬剤効果期間を有することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在網膜剥離治療時に用いられている網膜復位材は、網膜の復位性しか考えられておらず、それ以外の機能も有する硝子体を除去した後に眼内に充填する物質としては、十分な物質ではない。そこで、本研究では、硝子体のその他の機能、特に薬剤を保持する機能を有する充填物の開発を行った。これは、網膜剥離後に、仮に加齢黄斑変性症等を発症しても、その治療に用いる薬剤の効果を減衰させず、最適な治療を受けることができることを示している。

研究成果の概要(英文)：When treating retinal detachment, the vitreous is removed and a retinal repositioning material is injected into the eye. For retinal repositioning materials, gas and silicone oil are used in clinical practice, but each has its own problems. In addition, eyes in which the vitreous has been removed by treatment of retinal detachment have a problem that the duration of drug efficacy of drugs for age-related macular degeneration is shorter than that of eyes with vitreous. We have confirmed that intraocular filling of self-assembling peptide gels has a retinal repositioning effect and a drug effect period similar to or longer than that of the vitreous body.

研究分野：眼科

キーワード：自己集合性ペプチド 網膜剥離 タンポナーデ効果 物質拡散制御性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己集合性ペプチド SPG-178 (Biomaterials. 2012 33(4):1044-1051) は、非動物由来の完全合成ペプチドである。このペプチドは、水中において自己集合して逆平行シート構造を形成する。このシートは片面に親水性アミノ酸、もう片面に疎水性アミノ酸が露出するように設計されている。水中では疎水面を隠すように集合し、両面に親水性アミノ酸が露出した分子集合体となる。この分子集合体が伸長し、ナノファイバーとなり、3次元網目構造を形成することで水溶液はゲル化する。そして、この網目構造を有することで、このゲルは物質の拡散を制御し得る。また、自己集合性ペプチドゲルは注射針からの吐出などの物理的刺激により、ゾル-ゲル転移するユニークな特徴を持っている。

今日、ハイドロゲルは医療分野において、様々な用途への応用が検討されている。例えば、コラーゲンやヒアルロン酸などの天然高分子やポリビニルアルコールや Tetra-PEG などの合成高分子からなるハイドロゲルは、網膜剥離治療時の硝子体除去後に用いられるタンポナーデ材への応用が検討されている。現在臨床で用いられている六フッ化硫黄などの長期滞留ガスは 2 週から 1 か月程度で消失し、より長期間留置可能なシリコンオイルは抜去手術が必要であり、また合併症も問題となっている。

さらに、これらの治療時に硝子体が除去された無硝子体眼において、加齢黄斑変性、糖尿病黄斑症に対する抗 VEGF 薬硝子体内投与療法の薬剤効果期間が有硝子体眼に比べ、短いことが問題となっている。この対策には、硝子体が持つ物質拡散の制御機能を再建させる必要がある。

タンポナーデ効果さらには、薬剤などをも含めた物質拡散の制御機能を有する形で、安全性が担保され、眼内留置も容易である物質を用いての硝子体再建術の開発が望まれている。

2. 研究の目的

これまで我々は、ニードルからの吐出によってゾル-ゲル転移するという特徴に着目し、中性領域で透明なゲルを形成する自己集合性ペプチド SPG-178 を用いて、硝子体再建材料の開発を行ってきた。そして、すでにその自己集合性ペプチドゲルの眼内安定性、安全性について確認してきた (Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017 1;58(10):4068-407)。また、我々は、in vitro において、その自己集合性ペプチドゲルと薬剤を、透明性を維持した状態で混合可能で、さらに薬剤の拡散を制御しうることも確認している。しかし、そのタンポナーデ効果、in vivo における薬剤拡散制御能力および、その薬剤拡散の制御による薬剤効果期間の持続性については未確認である。

そこで、本研究の目的を、タンポナーデ効果、薬剤の拡散制御性という硝子体本来が持つその機能を、自己集合性ペプチドを用いて再建させること、とする。

3. 研究の方法

(1) タンポナーデ効果の再建評価

正常家兎眼に対して 25 ゲージシステム硝子体切除術を施行後、網膜下に眼灌流液を注入することで、網膜剥離モデルを作成した (Nature Biomedical Engineering. 2017 1:0044)。その後、眼内を空気で置換した後、試験群としてペプチドゲルを硝子体腔内に完全充填し経過観察を行い、網膜復位性 (タンポナーデ効果) を評価した。また、対照群として、眼灌流液を充填し、同様に経過観察を行った。

(2) 物質拡散制御性の再建評価

正常家兎眼に対して 25 ゲージシステム硝子体切除術を施行し、硝子体の一部を切除した。その切除部に、bevacizumab を包埋したペプチドゲルを注入した。また対照群として、同様に一部の硝子体を除去し、bevacizumab のみ (未封入) を注入した。術 1、2、3 週間、3 か月後に、各群から硝子体腔内容物を摘出し、そこに含まれる bevacizumab 量を ELISA により定量することにより、自己集合性ペプチドゲルの薬剤保持性を評価した。

(3) 硝子体再建材への封入による薬剤への影響評価

細胞増殖抑制試験

ペプチドゲルに封入された Aflibercept の細胞増殖抑制能を検討した。ペプチドゲルに Aflibercept を 1, 2, 3, 4 週間封入後、Aflibercept を抽出した。その抽出 Aflibercept を添加し、3 日間ヒト血管細胞 HUVEC を培養した。培養後、細胞数を alamarblue assay により定量し、細胞増殖抑制能を評価した。

細胞遊走抑制試験

ペプチドゲルに封入した Aflibercept の細胞遊走抑制能を検討した。ペプチドゲルに Aflibercept を 1, 2, 3, 4 週間封入後、Aflibercept を抽出した。その抽出 Aflibercept を含む培地が入った well に FluoroBlok セルカルチャーインサートをセットし、そこへ HUVEC を播種し、培養した。翌日、インサートを通過した細胞数をカルセイン染色により定量し、細胞遊走抑制能

を評価した。

管腔形成抑制試験

ペプチドゲルに封入した Aflibercept の管腔形成抑制能を検討した。ペプチドゲルに Aflibercept を 1,2,3,4 週間封入後、Aflibercept を抽出した。その抽出 Aflibercept を含む培地で、Matrigel 上に HUVEC を播種し、培養した。翌日、細胞をカルセイン染色し、ハイスループレットイメージングシステム Operetta を用いて管腔面積を定量し、管腔形成抑制能を評価した。

4. 研究成果

(1) タンポナーデ効果の再建評価

網膜剥離モデルに充填されたペプチドゲル群は、眼底観察において、術翌日から網膜の復位が確認され、1 か月間網膜が再剥離することはなかった (図 1)。また、網膜視機能の評価する網膜電図検査においても、術前術後で変化は見られず、網膜視機能も維持されていることが確認された。一方、対照群 (眼灌流液) においては、術後、網膜の復位は得られず、網膜電図検査においても、術後視機能を失っていることが確認された。

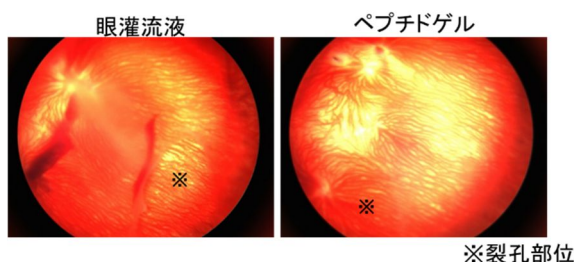


図 1 ペプチドゲルの網膜復位性 (タンポナーデ効果)

(2) 物質拡散制御性の再建評価

ペプチドゲル封入群と未封入群の経時的な硝子体内 bevacizumab 残存量は、術後 3 週間、3 か月において、封入群で、有意に多く bevacizumab が残存していることが確認された。よって、ペプチドゲルは、これまで確認されている in vitro での物質拡散制御性と同等に、in vivo においても、物質拡散制御性を有していることが確認された。

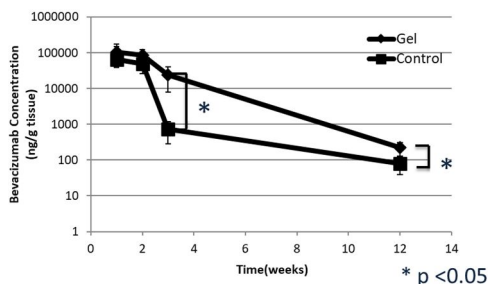


図 2 in vivo におけるペプチドゲルの拡散制御性

(3) 硝子体再建材への封入による薬剤への影響評価

細胞増殖抑制試験

1,2,3,4 週間ペプチドゲルに封入された Aflibercept の血管内皮細胞増殖抑制能は、未封入の Aflibercept 活性と同等の活性を持つことが確認された (図 3)。

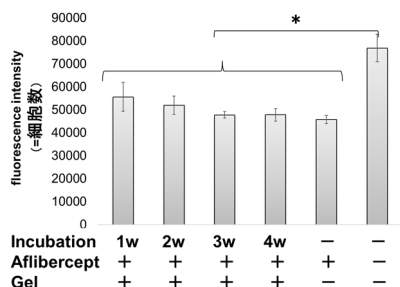


図 3 ペプチドゲル封入後の細胞増殖抑制能

細胞遊走抑制試験

1,2,3,4 週間ペプチドゲルに封入された Aflibercept の血管内皮細胞遊走抑制能は、未封入の Aflibercept 活性と同等の活性を持つことが確認された (図 4)。

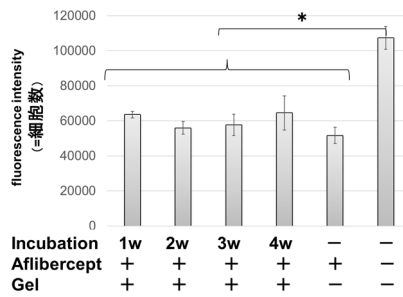


図 4 ペプチドゲル封入後の細胞遊走抑制能

管腔形成抑制試験

1,2,3,4 週間ペプチドゲルに封入された Aflibercept の血管内皮細胞管腔形成抑制能は、未封入の Aflibercept 活性と同等の活性を持つことが確認された (図 5)。

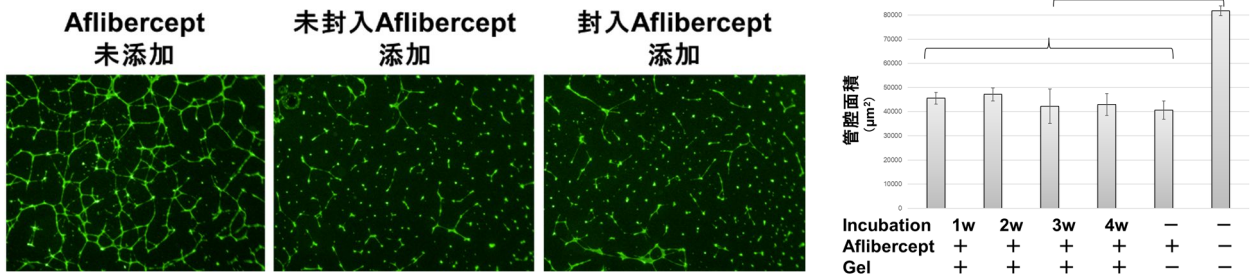


図 5 ペプチドゲル封入後の管腔形成抑制能

より、ペプチドゲルに封入された Aflibercept は封入後 1 か月においても、その薬効を有することが確認された。よって、自己集合性ペプチドゲルは、Aflibercept の薬効に影響を及ぼすことなく、徐放可能なゲルであることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 坂口裕和、上杉晃司、橋本尚憲、西田幸二
2. 発表標題 新規人工硝子体としての自己集合性ペプチドゲルのアフリヘルセプト徐放性能評価
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂口裕和
2. 発表標題 硝子体再建術 – 網膜剥離治療と薬物徐放 –
3. 学会等名 第15回日本バイオマテリアル学会関西ブロック若手研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂口裕和、上杉晃司、橋本尚憲、西田幸二
2. 発表標題 新規人工硝子体としての自己集合性ペプチドゲルのアフリヘルセプト徐放性能評価
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂口裕和
2. 発表標題 International Symposium 2; Premium vitreous body implantation.
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂口裕和
2. 発表標題 網膜硝子体疾患 プレミアム硝子体を用いた新たなサージカル、メディカル治療の可能性
3. 学会等名 (ベータ)の会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirokazu Sakaguchi
2. 発表標題 Treatment of retinal detachment using a self-assembling peptide gel
3. 学会等名 2019 Vail Vitrectomy(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019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	西田 幸二 (Nishida Kohji) (40244610)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	

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