

令和 3 年 10 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16924

研究課題名（和文）高比重リポタンパクを利用した後眼部疾患に対する点眼治療の開発

研究課題名（英文）The development of the novel treatment using recombinant high-density lipoprotein (HDL) for the light-threatening diseases of the posterior segment of the eye

研究代表者

須田 謙史 (Suda, Kenji)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70779157

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）：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。本研究では神経保護効果を有する薬剤（KUS剤）を含むHDLを点眼することにより、後眼部疾患の点眼治療を達成することを目的に、実験を行った。申請者はHDLにKUS剤を効率的に内包させることに成功し、また実験モデルマウスにKUS剤を含む再構成HDL変異体を点眼した結果、後眼部にKUSを送達可能であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、我が国の主要な失明原因は緑内障や網膜色素変性など後眼部に存在する網膜が障害される疾患である。緑内障には眼圧下降による予防治療が行われているが、病変の首座である網膜神経線維細胞や視神経に対する治療法は実現していない。網膜色素変性に至っては有効な治療法が確立されていない。これらの疾患に対する網膜神経保護療法の一つの選択肢として、近年VCP蛋白のATPase活性を調整するKUS剤を投与することで神経細胞を保護できることが明らかになってきた。現在、硝子体内の注射剤として医師主導治験を実施中であるが、失明の主原因となる上記疾患に対しては、長期投与が必要となるため、薬剤の点眼化が切望されている。

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) for the light-threatening diseases of the posterior section of the eye. For the achievement of neuroprotective therapy of glaucoma or retinitis pigmentosa, we incorporated valosin-containing protein (VCP) modulators, named by KUS, into recombinant HDL. As a result, we succeeded in preparation of a recombinant HDL mutant loaded with KUS. We also confirmed the delivery of the complex to the posterior segment of the eyes in experimental model mice.

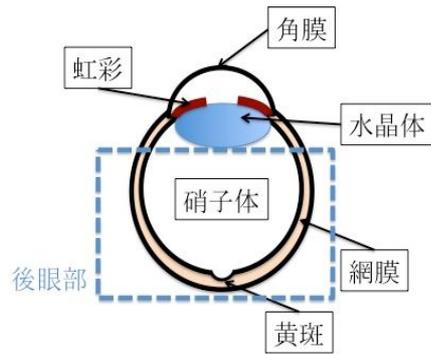
研究分野：眼科学

キーワード：後眼部疾患 緑内障 網膜色素変性 高比重リポタンパク 神経保護治療 ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

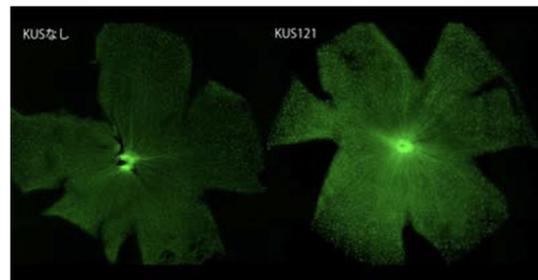
現在、我が国の主要な失明原因は緑内障、糖尿病網膜症、網膜色素変性、加齢黄斑変性であり、その全てが後眼部(図1)に存在する網膜が障害される疾患である。緑内障に対しては眼圧下降による予防治療が行われているが、病変の首座である網膜神経線維細胞や視神経に直接作用する治療法は実現していない。糖尿病網膜症や加齢黄斑変性に対しては昨今抗血管新生薬の硝子体内注射が行われているが、頻回の注射による通院・合併症等の患者負担が問題視されている。網膜色素変性に至っては、現在有効な治療法が確立されていない。

これらの疾患に対して、網膜神経保護療法の開発が進められている。網膜神経保護療法とは、上記疾患で見られる網膜の視細胞・神経節細胞の変性・脱落を防ぐことにより、視力や視野の悪化を予防する治療法である。現在眼科分野で実現している神経保護治療は存在しないが、近年、VCP 蛋白の ATPase 活性を調整する KUS 剤を投与することで神経細胞を保護できる(図2)ことが、京都大学医学部附属病院臨床研究総合センターの池田華子らの研究で明らかになってきた(Sci Rep, 4, 5970, 2014)。現在、硝子体内の注射剤として、その投与安全性および有効性を検討する医師主導治験を、眼難治疾患の一つである網膜中心動脈閉塞症患者対象に実施中である。しかし、失明の主原因となる上記疾患に対しては、長期投与が必要となるため、投与安全性や投薬のアドヒアランスを考えると、薬剤の点眼化が切望される。



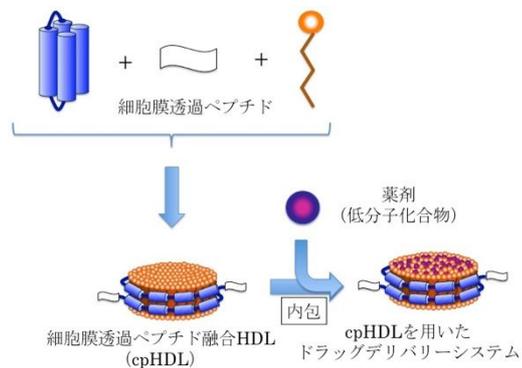
【図1】眼球の断面図

一方、我々は後眼部に対する点眼治療を確立するため、高比重リポタンパク(HDL)を用いたドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発を行ってきた。HDLは「善玉コレステロール」として知られているが、その構成要素はコレステロールやリン脂質などの脂質成分と、脂質をとりまくアポタンパクである。その脂質成分が構成する二重膜に薬剤を内包させることで、ドラッグキャリアとしてHDLを用いる研究が抗がん剤治療の分野で行われるようになってきた。我々は遺伝子工学の技術を用いてアポタンパクに細胞膜透過ペプチドを融合し、さらにモデル薬剤として蛍光色素を含んだ改変型HDLを種々作製し、実験動物マウスに点眼して効率良く後眼部へ蛍光色素を送達できる改変型HDL(cpHDL, 図2)を見出した。さらに実際に血管新生抑制効果を持つ薬剤を内包させた改変型HDLを加齢黄斑変性モデルマウスに1週間点眼したところ、病変部位を抑制することに成功した。以上の技術に関しては特許取得しており、2017年にJournal of Controlled Release誌に査読論文として掲載された。



【図2】KUS 剤の神経線維保護効果

我々は、加齢黄斑変性や糖尿病網膜症といった後眼部の血管新生を原因とした疾患のみならず、緑内障や網膜色素変性などの神経保護を必要とする疾患に対して点眼治療を実現するために、前述のKUS剤と改変型HDLを用いた点眼剤(HDL_KUS)の開発に着手した。神経保護剤を含んだHDLの点眼が後眼部疾患に治療効果を与えるのか、臨床応用するにあたって安全性は問題ないのか、という点が本研究の学術的「問い」である。



【図3】改変型HDLを用いたDDSの開発

2. 研究の目的

本研究では、神経保護剤を内包した HDL の点眼治療が実現可能かを検証するために、下記の内容の達成を目指した。

(1) HDL_KUS の作製条件の検討

HDL 変異体に薬剤を内包させるための作製法には様々あるが、KUS 剤を内包させるためにどのような方法が最適かを探索する。

(2) in vitroモデルを用いたHDL_KUSの治療効果の評価

KUS剤による神経保護のメカニズムは小胞体ストレスに伴う細胞死を抑制することにあると考えられている (*Sci Rep*, 4, 5970, 2014)。今回我々は、HDL_KUSが小胞体ストレスによる細胞死を抑制するかを始めに検討した。

(3) in vivoモデルを用いたHDL_KUSの後眼部移行性評価

KUS剤に関しては、これまで多様な後眼部疾患の動物モデルを用いて神経保護効果を示すことを明らかにしてきた (*Neural Regen Res* 12, 1252-1255, 2017、*Sci Rep*, 6, 31184, 2016、*Heliyon*, 2, e00096, 2016、*Sci Rep*, 4, 5970, 2014) が、これらの疾患モデルマウスを使用した治療効果判定実験を行う前にKUS剤が点眼で後眼部に十分量到達しているかどうかを検討した。

3. 研究の方法

(1) HDL に薬剤を内包させるための手段としては、pre-label 法、post-label 法があり、どちらの手法で内包可能かを検討した。また蛋白や脂質の構成要素と内包薬剤の比率などを検討した。

(2) 小胞体ストレス誘導剤 (ツニカマイシン) を負荷した HeLa 細胞に HDL_KUS を添加し、1 日間培養した後に細胞形態を観察したり、WST 解析を行ったりすることで小胞体ストレスからの保護効果を評価した。

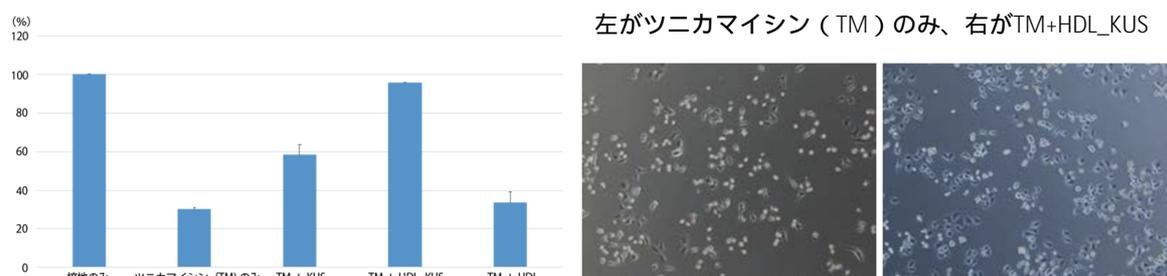
(3) KUS 剤の後眼部移行性評価には、今回は 2 つの手法を選択した。一つ目は LS/MS/MS を用いた組織内 KUS 量の定量である。HDL_KUS を動物モデルマウスに 5 μ l 点眼した 30 分後に眼球摘出し、網膜、硝子体をそれぞれ分けて採取、ホモジナイズした後メタノール/アセトニトリルで KUS を抽出し MALDI-TOF/TOF-MS で定量を行った。二つ目は MS imaging による組織内 KUS の検出で、上記と同様の手法で摘出した眼球を凍結切片にし、眼球内の KUS の分布を観察した。

4. 研究成果

(1) HDL 変異体への KUS 剤内包にあたっては post-label 法を採用し、蛋白 / 脂質のモル比で 1 : 200 の HDL 変異体に対して 1 変異体あたり 10 分子の KUS 剤が内包可能であることを確認した。また粒子径も約 15nm と HDL としても合理的なサイズであることを確認した。

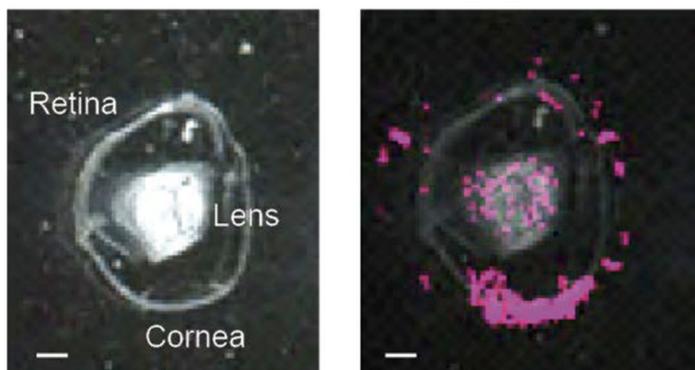
(2) 小胞体ストレス下の HeLa 細胞に HDL_KUS を添加したところ、KUS 剤や HDL 変異体単体を投与した群と比較して細胞死が抑制されていることがわかった (図 4)。

【図 4】小胞体ストレス下培養細胞における保護効果

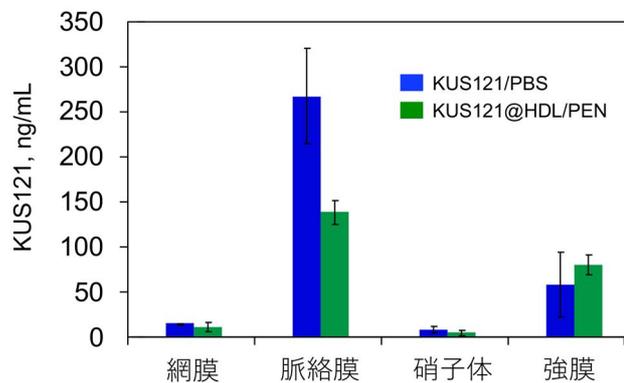


(3)HDL_KUS を点眼した眼球の硝子体や網膜からは微量ながらも KUS 剤が検出された。しかし、その組織内濃度は緩衝剤に溶解した KUS 剤を点眼した群と比較すると低かった(図 5)。点眼後の眼球の凍結切片を MS imaging で観察したところ、前眼部で KUS 剤の濃度が高かったが後眼部にも移行していることが確認された(図 6)。

【図 5】 HDL_KUS 点眼後の MS imaging



【図 6】 HDL_KUS 点眼の後眼部移行



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	
研究協力者	池田 華子 (Ikeda Hanako)	京都大学大学院・医学研究科眼科学・特定准教授	

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