

令和 4 年 4 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18378

研究課題名（和文）血管親和性生体ナノ材料を用いた加齢黄斑変性の点眼治療の開発

研究課題名（英文）Development of eyedrop treatment of age-related macular degeneration by high-density lipoprotein

研究代表者

須田 謙史（Kenji, Suda）

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）：血管に親和性の高い生体ナノ材料を用いて、加齢黄斑変性のための点眼治療法を開発することを目指す。AMD治療の現状は、硝子体内に抗体医薬を注射するという極めて侵襲性の高いものであり、代替治療が強く求められている。そこで本研究では、申請者が点眼剤として独自に開発してきた高密度リポ蛋白質（High-density lipoprotein; HDL）変異体に血管内皮に発現するCD13を認識するNGRペプチドを修飾し、疾患モデルマウスに点眼することで治療効果を評価した。その結果、加齢黄斑変性モデルマウスにおいてNGRなしのHDL変異体に対して有意な治療効果を有することを確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、後眼部での異常な血管新生がその病態である。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1）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）の構築が待たれており、本研究の成果が患者および医療者の負担を軽減することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We aim to develop an eyedrop treatment method for age-related macular degeneration (AMD) using bio-nanomaterials that have a high affinity for blood vessels. The current state of AMD treatment is extremely invasive, injecting antibody drugs into the vitreous, and alternative treatment is strongly required. Therefore, in this study, we modified NGR peptide that recognizes CD13 expressed on the vascular endothelium into a high-density lipoprotein (HDL) mutant that the applicant independently developed as an eyedrop, and evaluated the therapeutic effect of its instillation by AMD mouse model. As a result, it was confirmed that the HDL mutant with NGR had a significant therapeutic effect compared to HDL mutant without NGR.

研究分野：眼科学

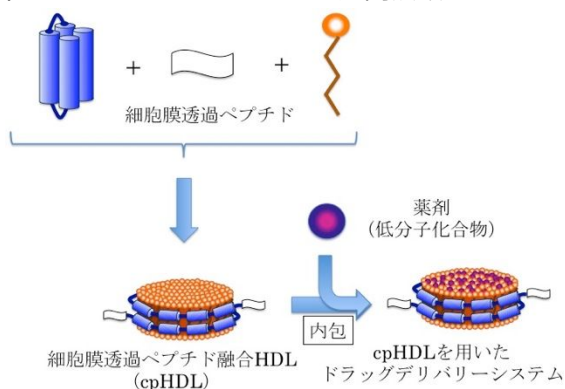
キーワード：加齢黄斑変性 高密度リポ蛋白質 CD13 点眼 ドラッグデリバリー

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来により、後眼部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。AMD 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、AMD 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 AMD 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。

また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1）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 製剤の論文報告例はあるものの、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。

一方、我々は後眼部に対する点眼治療を確立するため、**高密度リポタンパク（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疎水性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 HDL 変異体を種々作製し、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 HDL 変異体（cpHDL, 図1）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 HDL 変異体を AMD モデルマウスに1週間点眼したところ、HDL 変異体と内包薬剤の両方の効果で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 誌に査読原著論文として掲載された。



【図1】HDL 変異体を用いた DDS の開発

## 2. 研究の目的

我々は加齢黄斑変性に対する点眼治療の実現性をより高めるために血管に親和性の高い改変型 cpHDL を用いた点眼剤 (NGR-cpHDL) の開発を目的に研究を行った。NGR-cpHDL とは血管内皮に発現する CD13 を認識する NGR ペプチドを遺伝子工学の技術を用いてアポタンパクに修飾した cpHDL である。この NGR-cpHDL を用いることで点眼の治療効果が増幅するのか、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。

## 3. 研究の方法

### (1) NGR-cpHDL 作製条件の最適化

NGR-cpHDL は NGR ペプチドを有する変異型 apoA-I、リン脂質、及び内包薬剤である低分子化合物を混淆することにより作製するが、内包薬剤の性質によって混淆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) NGR-cpHDL の物性評価

作製した NGR-cpHDL の粒子径・表面電荷などの物性を動的光散乱式の粒度分布・ゼータ電位分析装置で評価し、粒子の構造安定性をゲル濾過クロマトグラフィー、透過型電子顕微鏡などで検討した。

### (3) NGR-cpHDL の安全性試験

NGR-cpHDL を培養角膜上皮細胞(HCE-T)に添加し、角膜上皮細胞の障害作用がないか、生存細胞数を LDH 試験、WST-8 試験などを用いて検討した。

### (4) in vitro モデルを用いた NGR-cpHDL の治療効果の評価

NGR ペプチドを付与することにより血管新生が抑制されるメカニズムの解析をヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて検討した。具体的には、血管新生増殖因子(VEGF)を負荷した HUVEC 細胞に NGR-cpHDL を添加、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血管新生抑制効果を評価した。内包薬剤の HUVEC 取り込み定量、LPS 刺激等による炎症誘導モデルに対する抗炎症作用の評価も並行して検討した。

### (5) in vivo モデルを用いた NGR-cpHDL の治療効果の評価

血管新生阻害薬(Pazopanib)を搭載した NGR-cpHDL を作製した後、AMD の疾患モデルマウスに対する点眼実験を行った。実験動物(マウス)の眼底に麻酔下でレーザーを照射することにより脈絡膜血管新生を誘発し、作製した点眼剤を 2 回/日で 1 週間点眼した後に眼球摘出・免疫染色を行い、脈絡膜血管新生の面積を測定することで血管新生抑制効果を評価した。NGR ペプチドを有さない cpHDL 点眼剤と治療効果を比較評価した。

## 4. 研究成果

### (1) NGR-cpHDL 作製条件の最適化

NGR-cpHDL 調整は cpHDL 作製プロトコルをわずかに改変して行った。

cpHDL 作製の際に歯脂質とタンパク質の混合後、室温で一晩透析を行っていたが、脂質とタンパク質の混合後、55 °C から(室温に)放冷しつつ一晩透析をすることで最適化することができた。

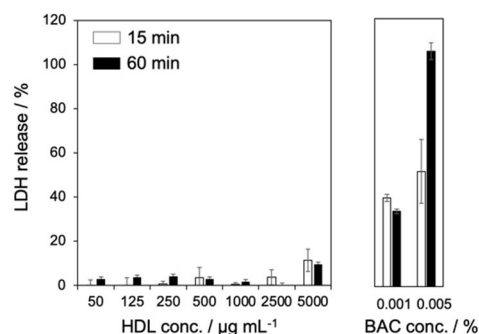
### (2) NGR-cpHDL の物性評価

作製した NGR-cpHDL の粒子径は 7nm 程度であり、リン酸緩衝液に溶解した状態で 1 ヶ月間 4 下で保存したところ、粒子径と成分組成は不変であることを確認した。

### (3) NGR-cpHDL の安全性試験

LDH 試験では 5mg/mL の濃度ではやや角膜傷害性を認めたものの、市販の点眼剤に包含されている塩化ベンザルコニウムと比較するとその傷害性は弱かった。WST-8 試験では 5mg/mL 以下の濃度では角膜毒性は無視できる程度であった。

Cell line: HCE-T cell  
Medium: DMEM/Ham's F12, 10 ng/mL EGF, 5 µg/mL insulin  
Seeding density: 1x10<sup>5</sup> cells/mL  
NGR-cpHDL conc.: 0-5000 µg protein/mL  
Benzalkonium chloride (BAC) conc.: 0.001, 0.005%



【図 2】 NGR-cpHDL の角膜毒性評価

### (4) in vitro モデルを用いた NGR-cpHDL の治療効果の評価

NGR-cpHDL の HUVEC 細胞への取込試験では cpHDL と比較して取り込み量が増加することが観察された。抗炎症活性試験では cpHDL とは明らかな差を認めなかった。

### (5) in vivo モデルを用いた NGR-cpHDL の治療効果の評価

AMD 疾患モデルマウスに対する治療効果は cpHDL と比較して NGR-cpHDL が顕著に強かった。一方で NGR-cpHDL 点眼群の比較では血管新生阻害薬搭載の有無で有意差を認めなかった。

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	

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