

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861474

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症に対する局所治療薬の開発

研究課題名(英文) The effect of periocularly administered candesartan-PLGA microparticles on diabetes-induced retinal inflammatory damage

研究代表者

福本 雅格 (Fukumoto, Masanori)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：40707957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアンジオテンシン受容体拮抗薬であるカンデサルタンを内包したPLGA粒子の眼周囲投与による糖尿病に起因する炎症の抑制効果を検討した。糖尿病による網膜血管透過性亢進及び、網膜血管への白血球接着亢進は、カンデサルタン投与により有意に抑制された。同様に、VEGF、ICAM-1及びMCP-1の発現亢進はカンデサルタン投与により有意に抑制された。このことから、カンデサルタンの局所投与が糖尿病網膜症治療に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was to determine whether periocular candesartan, an angiotensin II type1 receptor antagonist, -poly(lactic-co-glycolic acid : PLGA) microparticles alleviate diabetes-induced inflammation in Sprague Dawley rats. Treatment with periocularly administered candesartan-PLGA microparticles significantly decreased the permeability of the retinal microvessels. The number of adherent leukocytes was significantly reduced, together with retinal VEGF, ICAM-1 and MCP-1 in the diabetic+candesartan group compared with the diabetic group. The periocular administration of candesartan-PLGA microparticles inhibit diabetes-induced retinal inflammatory damage, indicating their potential usefulness in treating diabetic retinopathy.

研究分野：眼科

キーワード：糖尿病網膜症 局所投与 PLGA

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は本邦における成人の中途失明原因の第2位であり、毎年 3000~4000 名が失明しているとされる¹⁾。糖尿病網膜症の主たる病態は網膜血管障害に起因する網膜の浮腫、虚血、血管新生であり、従来、網膜光凝固術を基本として、進行した症例には硝子体手術を施行していた。しかし、網膜光凝固術は熱凝固による破壊的治療であり、硝子体手術も観血的治療であることから共に合併症の危険性がある。近年、血管内皮増殖因子(VEGF)が、糖尿病網膜症の病態形成に中心的な役割を果たしていることが示され²⁾、臨床においても抗 VEGF 抗体の硝子体内注射の有効性が示された³⁾。抗 VEGF 抗体療法は反復投与を必要とするが、脳梗塞の発症リスク増大や眼内炎の発症などの報告⁴⁾があり、継続性に問題があることが分かった。さらに、眼内の VEGF 濃度が上昇している既に病期が進んだ症例のみが対象となり、糖尿病網膜症の発症予防目的での使用は困難である。

レニン・アンジオテンシン系 (RAS) は昇圧作用を主たる効果とする循環ホルモンシステムであるが、臓器局所にもアンジオテンシン (A) 産生にかかわる構成成分が存在することが分かっている⁵⁾。本研究代表者は、大学院在学中に糖尿病網膜症動物モデルにおいて眼局所の RAS が亢進していることを報告した。さらに、その A 産生亢進による VEGF 発現増加は活性酸素生成酵素である NADPH オキシダーゼの活性化を介していたことから、糖尿病網膜症の病態に RAS による酸化ストレスの増大が関与していることを示した⁶⁾。

(図 1)

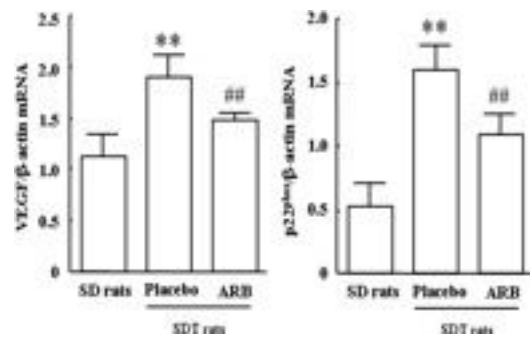


図 1. 自然発症糖尿病モデルラットの網膜で亢進している VEGF、活性酸素産生酵素である NADPH オキシダーゼのサブユニット (p22^{phox}) の遺伝子発現は、アンジオテンシン受容体拮抗薬により抑制された。

その後に行われた大規模臨床試験において、アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) であるカンデサルタンの経口投与が糖尿病網膜症の発症予防、進行抑制に効果がある⁷⁾⁸⁾ことが報告されたものの、これまでの基礎研究結果から期待されたほどではなかった。本研究代表者は、動物モデルと臨床試験での用量の違いがその理由と考える。臨床試験で用いられたカンデサルタンの経口投与用量は 32mg/日であるのに対し、糖尿病網膜症動物モデルでは 2~10mg/kg/day と文献により差はあるものの⁹⁾¹⁰⁾、その投与量には少なくとも数倍の開きがある。さらに、ラットに [¹⁴C] カンデサルタン 1mg/kg を経口投与した場合、血漿での最高濃度は 0.374 ± 0.057 μg/mL であったのに対し、眼球での最高濃度は 0.010 ± 0.001 μg/mL であった¹¹⁾ことから、網膜血液関門が眼内への薬物移行の障害となっていると思われる。そこで、網膜血液関門を介さず、網膜に高濃度のカンデサルタンを投与することが出来れば、臨床試験以上の結果が得られる可能性がある。

結膜下注射は、臨床において日常的に用いられる局所投与方法である。一方、ポリ乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) 粒子は、高い組織深達性とその中に封入した薬物の徐放効果¹²⁾¹³⁾で近年、注目を集めている。薬物の徐放

投与をすることで投与回数を減らすことができるため、患者の肉体的、精神的負担を減らすことが可能である。本研究代表者はマイクロ粒子化したARB の結膜下投与による糖尿病網膜症への影響を確認する事で、糖尿病網膜症の発症、進行を抑制する全く新しい点眼薬開発の可能性を示したいと考えた。

ARBの糖尿病網膜症に対する経口投与での効果は臨床で示されていることから、今回の研究にて局所投与による有効性が示される可能性は高いと考えた。

2 . 研究の目的

本研究ではアンジオテンシン受容体拮抗薬の眼局所投与による糖尿病網膜症に対する影響を明らかにし、糖尿病網膜症に対する新たな治療法の可能性を探る。

1)中江公裕,ほか：わが国における視覚障害の現況. 厚生省の指標,38(7):13-22,1991

2)Casey,r.,Li,W.W.:Factors controlling ocular angiogenesis.

Am.J,Ophthalmol.,124:521-9,1997.

3)Cunningham ET Jr et al: A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema.Ophthalmology 112:1747-57, 2005.

4) Tolentino M et al: Systemic and ocular safety of intravitreal anti-VEGF therapies for ocular neovascular disease. Surv Ophthalmol. 56(2):95-113,2011.

5) Nagai N et al: Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by blocking the angiotensin II type 1 receptor. Invest Ophthalmol Vis Sci 46(8):2925-31,2005.

6)Fukumoto M et al: Involvement of angiotensin II-dependent vascular endothelial growth factor gene expression via NADPH oxidase in the retina in a type

2 diabetic rat model. Curr Eye Res 33(10):885-91,2008.

7) Chaturvedi N et al:Effect of candesartan on prevention (DIRECT-Prevent 1) and progression (DIRECT-Protect 1) of retinopathy in type 1 diabetes: randomised, placebo-controlled trials. Lancet 18;372(9647):1394-402,2008.

8) Sjølie AK et al: Effect of candesartan on progression and regression of retinopathy in type 2 diabetes (DIRECT-Protect 2): a randomised placebo-controlled trial. Lancet 18;372(9647):1385-93,2008.

9)Miller AG et al: Candesartan attenuates diabetic retinal vascular pathology by restoring glyoxalase-I function. Diabetes. 59(12) :3208-15, 2010.

10)Gao BB et al : Angiotensin AT1 receptor antagonism ameliorates murine retinal proteome changes induced by diabetes. J Proteome Res. 8(12) : 5541-9, 2009.

11)医薬品インタビューフォーム プロプレス錠

12) Kawashima Y et al: Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods. Eur J Pharm Biopharm. 45: 41-48,1998.

13) Panyam J et al: Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. Faseb J. 16: 1217 - 1226,2002.

3 . 研究の方法

(1)糖尿病モデルの作成：ストレプトゾシン腹腔内投与により糖尿病ラットモデルを作成した。

(2)群作成：コントロール、糖尿病(DM)、DM+candesatan内包PLGA(DM+CAN-PLGA)の3群と

した。

(3) 血糖測定：血漿グルコース濃度は、グルコースオキシダーゼ法により測定した。

(4) 血圧測定：収縮期血圧(SBP)は、tail-cuff法により測定した。

(5) 薬剤投与：糖尿病ラット及びコントロールとした正常ラットの片眼に candesartan 370ug を含む PLGA 微粒子を結膜下投与し、対側眼に PLGA 微粒子のみを結膜下投与した。

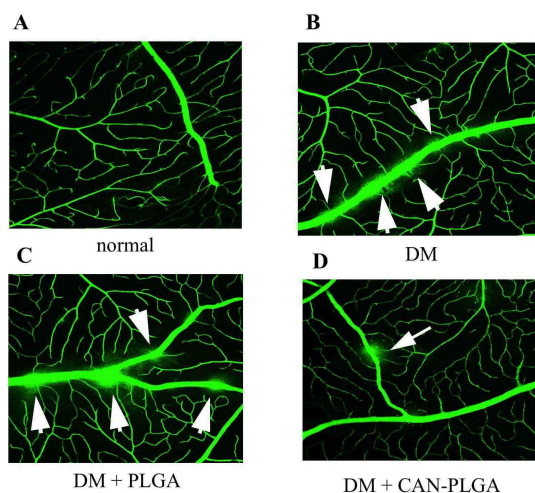
(6) 血液網膜関門の透過性：静脈内にエバンスブルーを投与した後、摘出網膜を共焦点レーザー顕微鏡で撮影し、評価した。

(7) 血管新生促進因子の検討：網膜における血管内皮増殖因子(VEGF)、細胞間接着分子(ICAM-1)、Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP)-1 の mRNA 発現およびタンパク質発現を RT-PCR 法およびウェスタンブロット法によって測定した。

(8) 白血球接着：静脈内にコンカナバリンレクチンを投与した後、摘出網膜を蛍光顕微鏡で撮影し、網膜血管内壁への白血球接着を評価した。

4. 研究成果

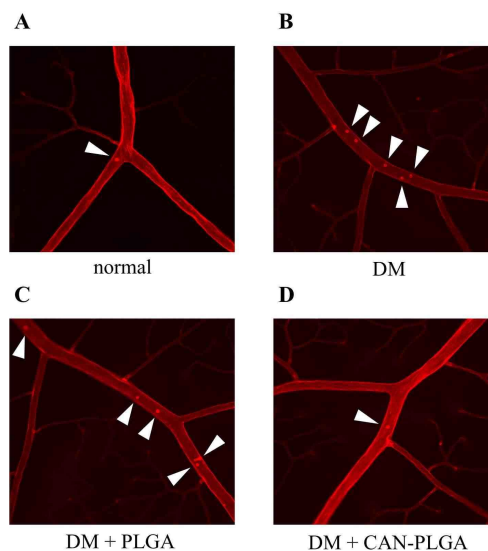
(1) カンデサルタン PLGA 微粒子眼局所投与による血液網膜関門の透過性への影響：



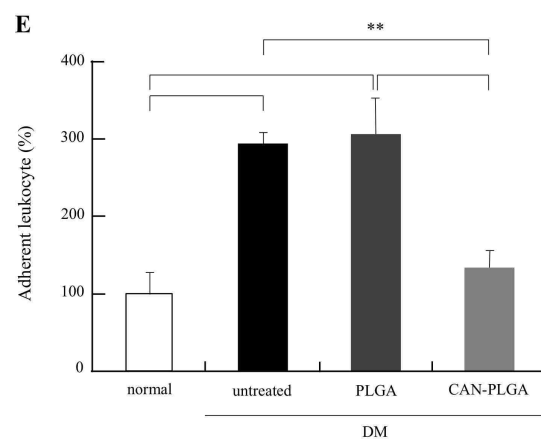
コントロール群の網膜では、エバンスブルーの蛍光は血管内に限定されている(A)。DM(B)とDM+ PLGA(C)ではエバンスブルーの蛍光の

漏れおよび拡散を認める。DM + CAN-PLGA(D)では血管透過性亢進が抑制されている。

(2) 糖尿病網膜症の白血球接着に対するカンデサルタン PLGA 微粒子眼局所投与の抑制効果



Flat mount 網膜におけるコントロール群(A)、DM(B)、DM + PLGA(C)、DM + CAN-PLGA(D)、白矢印は血管内壁への白血球付着を示している。



DM(B)、DM + PLGA(C)にて亢進した白血球接着は+ CAN-PLGAの投与により抑制されている(D)。付着白血球数の定量分析(E). (** $P < 0.01$)

(3) 炎症及び血管新生関連因子に対するカンデサルタン PLGA 微粒子眼局所投与の抑制効果

網膜での VEGF、ICAM-1、MCP-1 の mRNA 発現およびタンパク質発現は糖尿ラットにて有意に上昇したが、candesartan 投与にて有意に抑制された。(n=3; *P<0.05; **P<0.01).

(4)生理学的データ

DM 群、DM+CAN 群では血漿グルコース濃度に有意な差は認めなかった。3 郡間で収縮期血圧に有意な差は認めなかった。

(5)結論

糖尿病網膜症では眼局所での RAS の活性化が重要な役割を演じている。アンジオテンシン拮抗薬である candesartan の局所投与により網膜血管への白血球接着、血管透過性亢進及び炎症関連因子発現が抑制された。candesartan の徐放化局所投与は糖尿病網膜症の新たな治療法になる可能性が示唆された。

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0件)

[学会発表](計1件)

1.Fukumoto M, Takai S, Nakanishi T, Horie T, Morishita S, Oku H, Ikeda T. The Effect of Periocularly Administered Candesartan-PLGA Microparticles on Diabetes-Induced Retinal Inflammation Damage. The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Orlando, FL, USA, May 04-08, 2014.

[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

福本 雅格(FUKUMOTO, Masanori)

大阪医科大学、医学部、助教

研究者番号 40707957