

令和4年9月26日

報道機関 各位

新たに開発した多細胞性実験系「プチ網膜関門」の活用にて 網膜への高分子薬物の移行を促すルートを発見

■ ポイント

- 網膜疾患の治療には核酸やタンパク質・抗体などの“大きい”サイズの薬を眼の中へ投与する方法が執られている。
- 今回の研究成果から、タンパク質へ 19 アミノ酸から成るパスポートペプチド、Ang2 を付加することで、循環血液へ投与後、網膜へのタンパク質移行が促されることを実証した。
- 循環血液と網膜とを隔てる内側血液網膜関門の *in vitro* 多細胞性球状体「プチ網膜関門」を活用した実験を通じ、Ang2 結合分子がこの関門を積極的に通過するメカニズムを見出した。
- Ang2 パスポート発見を契機に網膜への薬物デリバリー材料デザインが進むと期待され、本研究を通じて新たに開発された「プチ網膜関門」はその評価に有用である。

■ 概要

富山大学学術研究部 薬学・和漢系(薬学) 薬剤学研究室の山本 雄大 大学院生 (当時) と赤沼 伸乙 准教授、細谷 健一 教授らの研究グループは、循環血液中に投与しても網膜へと移行しないタンパク質を、細胞膜透過ペプチドの一つである Ang2 を付加させて網膜へと促進的に移行させることに成功しました。この移行が非特異的なものではないことを示すため、同研究グループは、循環血液と網膜とを直接隔てる内側血液網膜関門を構成する 3 種類の細胞を活用し、新規培養実験系「プチ網膜関門」を構築しました。本実験系を活用して Ang2 結合物質の輸送を評価した結果、この輸送へのクラスリン介在性トランスサイトosisの関与が示唆されました。

今回発表する研究成果は、循環血液へ投与して網膜へと薬を作用させる、いわゆる血管に「打つ目薬」の研究開発を、ハードとソフトの両面から加速させるものと期待されます。本研究成果は、令和4年(2022年)9月20日(火)に、“*Journal of Controlled Release*”にオンライン掲載 (Vol. 351, Page 8-21 (2022); DOI#: 10.1016/j.jconrel.2022.09.019) されました。

■ 研究の背景

循環血液と網膜とを直接隔てる関門として、網膜毛細血管内皮細胞を実体とする内側血液網膜関門 (inner BRB) があります。この関門によって網膜内の環境は一定に保たれているものの、薬を網膜へとデリバリーする上でこの関門の突破が課題となっています。

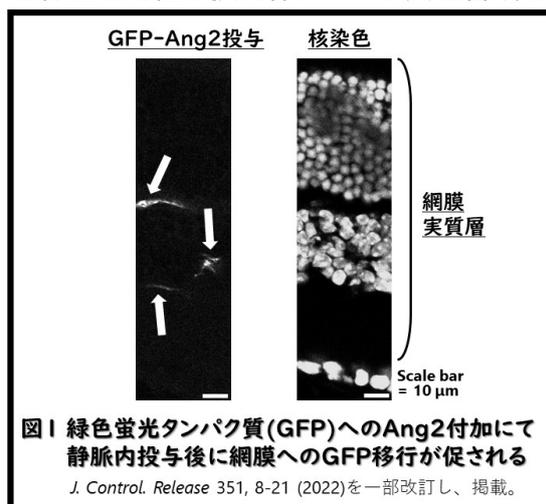
非特異的な網膜移行を制限している inner BRB を薬が通過し、網膜へと到達するためには、この関門に存在する“網膜への透過を許可する機構”に薬が認識される必要があります。

糖尿病性網膜症などの網膜疾患においては核酸やタンパク質・抗体といった高分子を薬として使用していますが、これら高分子は特別な事情が無い限りは inner BRB を通過出来ません。そのため、これら高分子医薬品を循環血液へ投与後に網膜へと到達させるためには、inner BRB に存在する“網膜への透過を許可する機構”に認識させるための工夫を施す必要があります。

■研究の内容・成果

① 細胞膜透過ペプチド Ang2 付加による末梢から網膜へのタンパク質の促進的送達

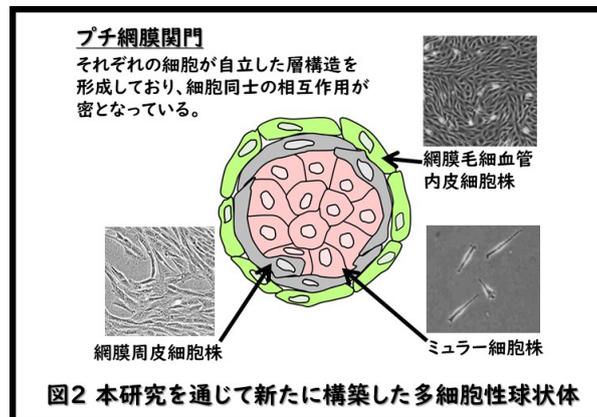
細胞膜透過ペプチドは何らかの理由にて細胞膜表面・形質膜の透過性を示すことが知られています。その中で、Ang2 は 19 アミノ酸で構成されているペプチドで、血管内皮細胞に対し透過性を示すことが報告されてきています。Inner BRB は網膜毛細血管内皮細胞を実体としていることから、この Ang2 を付加することで網膜への薬物移行を促進出来ると考えられました。そこで、緑色蛍光タンパク質 (GFP) に Ang2 を付加した組み換え体タンパク質を合成し、マウスへの投与試験を行いました。その結果、Ang2 を付加した GFP の静脈内投与時には、網膜組織内において GFP 由来の蛍光が検出されました (図 1)。同投与量にて Ang2 を結合していない GFP を静脈内投与した場合には、網膜において GFP 由来の蛍光は検出されなかったため、Ang2 は付加することで末梢投与では網膜へ移行しないタンパク質を、網膜へと移行させるパスポートとなり得ることが示唆されました。



② 新規 *in vitro* 実験系「プチ網膜関門」確立と Ang2 付加分子透過様式の解明

この GFP などの高分子に Ang2 を付加することで網膜への移行性が向上するのは、inner BRB を積極的に通過するためと考えられました。この点を実証するためには、inner BRB を模倣した *in vitro* 実験系が有用ですが、これまで高分子の経細胞的 inner BRB 輸送を評価するための実験系はありませんでした。

そこで、本研究グループが保有する、inner BRB の実体である網膜毛細血管内皮細胞と、血管内皮細胞をサポートする網膜周皮細胞とミユラー細胞 (グリア細胞の一種) それぞれの細胞株を混合し、低吸着性培養器上にてインキュベートすることで多細胞性球状体・スフェロイド「プチ網膜関門」を作りました。このスフェロイドは中心にミユラー細胞が配置され、その中心核を網膜周皮細胞が覆い、スフェロイドの最外殻層は網膜毛細血管内皮細胞によって構成されている、多細胞層構造を有していました (図 2)。また、各種モデル薬物・化合物を用いた検証から、*in vitro* プチ網膜関門への取り込みは『循環血液から網膜への分子機構を



介した薬物分布』を反映することが示唆されました。本プチ網膜関門を活用して、Ang2 結合分子の輸送を解析した結果、クラスリン介在性トランスサイトーシスという、関門細胞における化合物輸送特性がその輸送に関与することが明らかとなりました。この結果は、関門を透過することが出来ない高分子・薬物に対してパスポートとなる Ang2 を付加することで、関門に存在する分子ゲートを通じて網膜へとこれら高分子・薬物を到達させることが可能であることを示唆しており、新たな循環血液から網膜への薬物送達ルートとしての活用が期待されます。

■今後の展開

この明らかにしたトランスサイトーシスという関門通過様式の起点となるのは、関門の表面に存在する受容体などの係留ボラード・ビットになります。この係留を担う分子機構は、より選択的かつ効率的な網膜への薬物デリバリーの実現に繋がると考えられます。本研究を通じ見出した Ang2 という薬物パスポートを起点に、新規 *in vitro* 実験系であるプチ網膜関門を活用することで本分子機構を解明することで、糖尿病網膜症を始めとした網膜疾患時に有効な高分子薬物のデザインに繋がっていきたいと考えています。また、この *in vitro* プチ網膜関門の活用にて、網膜を対象とした生体模倣システム (microphysiological system; MPS) の構築が加速し、それを利用した網膜疾患治療薬のスクリーニングと創出が促されていくものと期待されます。

【用語解説】

● 内側血液網膜関門 (inner BRB):

網膜毛細血管内皮細胞が、網膜周皮細胞やミュラー細胞などの周辺細胞によってサポートされることで形成する、循環血液と網膜とを直接隔てる関門組織である。網膜において視覚を担う神経細胞は多層構造を示しており、網膜毛細血管はその 2/3 の層にて観察される。そのため、この関門が視覚に与える影響は大きいと考えられている。

● 細胞透過ペプチド:

細胞膜透過性を示す 19-30 アミノ酸から成るペプチド。細胞膜は脂質二重層にて構成されており、ペプチドを含めた水溶性の物質は一般的には通過しにくい。一方、細胞透過ペプチドは、細胞膜にポア (穴) を形成したり、エンド・トランスサイトーシスを始めとした固有のメカニズムを利用したりすることで、細胞膜を透過する特性を有する。

【論文詳細】

論文名:

Newly-established *in vitro* inner BRB spheroids to elucidate retinal Ang2-linked substance transfer

著者:

Yudai Yamamoto, Shin-ichi Akanuma, Hideki Kon, Hiroki Endo, Yoshiyuki Kubo, Ken-ichi Hosoya

掲載誌:

Journal of Controlled Release

本研究は、日本学術振興会・科学研究費補助金（基盤研究(B): JP22H02780、基盤研究(C): JP19K07160 など）、公益財団法人 薬学研究奨励財団および公益財団法人 富山第一銀行 奨学財団の支援を受けて実施されました。

本研究に関連して申告すべき利益相反はありません

【本発表資料のお問い合わせ先】

富山大学学術研究部 薬学・和漢系(薬学) 薬剤学研究室

准教授 赤沼 伸乙 Email: akanumas@pha.u-toyama.ac.jp

教授 細谷 健一 Email: hosoyak@pha.u-toyama.ac.jp

〒930-0194 富山県富山市杉谷 2630

TEL: 076-434-7506 (研究室)

FAX: 076-434-5172