

氏 名	奥 田 吉 隆
(ふ り が な)	(おくだ よしたか)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 1114 号
学 位 審 査 年 月 日	令和元年7月31日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
Periocular injection of candesartan-PLGA	
学 位 論 文 題 名	microparticles inhibits laser-induced experimental choroidal neovascularization (カンデサルタン-PLGA 微粒子の眼周囲注射は レーザー誘発実験的脈絡膜血管新生を阻害する)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 朝 日 通 雄 教授 廣 瀬 善 信 教授 近 藤 洋 一

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《背景と目的》

脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) の発生を主要な病態とする加齢黄斑変性(age-related macular degeneration, AMD)は本邦における視覚障害の主要な原因疾患の一つである。近年、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)が、CNV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、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。抗VEGF抗体療法は反復投与を必要とするが、脳梗塞や心筋梗塞の発症リスク増大や眼内炎の発症などの報告があり、継続投与に一定のリスクを伴う。

レニン・アンジオテンシン系 (renin angiotensin system: RAS) は主に昇圧作用を担う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産生にかかわる構成成分

が存在することが知られている。近年、RASはVEGF発現亢進を介して、眼内における血管新生や炎症をはじめとする種々の病態に関与することが報告されている。一方でAMDの病態形成にもVEGFが関与していることから、その上流にはRASの存在が示唆される。過去には実験的に作製したCNVに対するアンジオテンシン受容体拮抗薬(angiotensin-II receptor blockers, ARB)であるテルミサルタンの抑制効果が報告されている。しかし、動物モデルにおける投与量は臨床での数倍であり、そのまま臨床で全身投与として用いるには副作用の問題がある。

ポリ乳酸・グリコール酸共重合体(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)微粒子は高い組織深達性を持ち、その中に封入した薬物の徐放効果で近年、注目を集めている。また、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。

今回、ARBの一つであるカンデサルタン(candesartan, CAN)を内包したPLGA微粒子(CAN-PLGA)の結膜下投与によるレーザー光凝固誘発CNVに対する抑制効果を検討した。

《方法》

7～9週齢の雄のBrown Norwayラットに対して、視神経乳頭の周囲に1眼あたり5箇所レーザー照射をすることで実験的CNVを作製した。レーザー設定はパワー200mw、時間0.1秒、スポット径75 μ mとした。レーザー照射時の気泡の発生をもって、ブルッフ膜の破壊所見と判断した。

レーザー照射2日前に正常ラットの片眼にCAN 5mgを含むCAN-PLGAを結膜下に投与し、投与群とした。また反対眼にはPBSを結膜下投与しcontrol群とした。照射7日後に蛍光標識したイソレクチンB4を用いてCNVの体積を測定した。各眼のCNV体積は5つのレーザー誘発CNV体積の平均値を算出して求めた。CNVへのマクロファージの集積を確認するために、抗CD68抗体による蛍光免疫組織染色を施行し、蛍光顕微鏡にて観察した。5つのレーザー誘導CNVを中心とする100 $\times$ 100 μ m²の領域にあるCD68陽性細胞数を計測し、平均値を算出した。網膜色素上皮・脈絡膜におけるVEGF、Monocyte

Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)、Interleukin1- β (IL1- β) の mRNA 発現を RT-PCR 法によって測定した。

《結果》

全てのラットは実験期間を通して健康状態に問題なく、結膜下注射後に明白な眼合併症（炎症、角膜混濁、白内障、硝子体混濁、網膜出血など）は認めなかった。

CNV体積はCAN-PLGA局所投与によってcontrol群と比較して有意に抑制された。CAN-PLGA局所投与群では、CNV病変におけるCD68陽性細胞数はcontrol群と比較して有意に減少していた。光凝固群における網膜色素上皮-脈絡膜のMCP-1、IL1- β 、およびVEGFのmRNA発現はCAN局所投与によって有意に抑制された。

《考察》

マクロファージは、AMD患者のCNVに集積しており、CNV形成に主要な役割を果たす細胞であることが分かっている。さらに、CNVに集積したマクロファージはVEGFを含む血管新生に関与するサイトカインを放出することで、CNV形成に関与するとされる。今回の検討にて、レーザー照射によって増加した網膜色素上皮-脈絡膜のMCP-1、IL1- β 、およびVEGFのmRNA発現亢進はCAN-PLGA局所投与によって有意に抑制された。中でもMCP-1はマクロファージの浸潤を誘導する主要な因子とされる。これらから、局所投与したCAN-PLGAによって抑制された炎症性反応がCNVの縮小に関与したと考えられる。

今回の検討で用いた PLGA は、US Food and Drug Administration (FDA) にて人への使用が認められており、薬剤輸送の基材として広く用いられている。既報にて眼球周囲に投与した PLGA には内包された薬剤の徐放効果があることが報告されていることから、今回の検討でも、結膜下に投与した PLGA から、眼球周囲組織に CAN が徐放されていたものと考えられる。

《結論》

CAN-PLGA の結膜下投与はラットにおけるレーザー光凝固誘発 CNV を抑制したことから、CNV の発生を主要な病態とする AMD の新たな治療法となる可能性が示唆される。

論文審査結果の要旨

脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization : CNV) の発生を主要な病態とする加齢黄斑変性(age-related macular degeneration: AMD)は本邦における視覚障害の主要な原因疾患の一つである。近年、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)が、CNV の病態形成に中心的な役割を果たしていることが報告され、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が、継続投与に一定のリスクを伴う。

申請者は Brown Norway ラットを用いてレーザー誘発 CNV モデルを作製し、VEGF の発現を抑制すると言われているアンジオテンシン受容体拮抗薬(angiotensin-II receptor blockers, ARB)の一つであるカンデサルタン(candesartan, CAN)を内包したポリ乳酸・グリコール酸共重合体(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)微粒子 (CAN-PLGA) の結膜下投与の CNV に対する効果を検討した。レーザー照射 2 日前に CAN 5mg を含む PLGA 粒子を結膜下投与し投与群とした。また対側眼に PBS を結膜下投与し control 群とした。照射 7 日後に flat mount 法による蛍光標識レクチン染色を用いて CNV の体積を測定し、CD68 陽性細胞は CNV 中心部の $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ の領域に存在するものを数え、vascular endothelial growth factor (VEGF)、Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、Interleukin-1- β (IL1- β) の mRNA 発現を RT-PCR 法によって測定した。その結果、CAN-PLGA 局所投与によって CNV 体積は有意に抑制され、CNV 病変における CD68 陽性細胞数が有意に減少した。また、光凝固によって誘発された MCP-1、IL1- β 、および VEGF は CAN-PLGA 局所投与により有意に抑制された。

以上のことから、ARB の一つである CAN を内包した CAN-PLGA の結膜下投与は、CNV の発生を主要な病態とする AMD の新たな治療法となる可能性が示唆されるため、臨床的意義は大きいと考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Clinical Ophthalmology

13: 87-93, 2018, doi: 10.2147/OPTH.S181110