

マイボーム腺の腺分泌機能を保持した三次元培養モデルの作成と ウサギマイボーム腺への薬物移行に関する研究

浅野 長祥

緒言

マイボーム腺機能不全症候群 (MGD) はドライアイの原因疾患と考えられており、全世界で数億人の潜在患者が存在するとも言われているが、承認された MGD 治療薬は未だ存在しない。さらに治療薬に対する高いアンメットニーズが存在するものの、基礎研究は大きく遅れており MGD 治療薬の開発を妨げている。特に、腺房の腺分泌障害が関連するか否かは根本的であり治療量医薬品の開発方針を左右する。しかし、実際のマイボーム腺中の薬物濃度を正確に測定することは依然として困難であり、病巣部一作用標的部位の絞り込みは滞っている。さらに、病巣部と考えられているマイボーム腺が眼瞼の瞼板内という特殊な環境に位置するため (Figure 1)、薬物移行性に関する情報は皆無である。一般的に薬物の治療効果には組織中濃度が深く関与しているため、薬物動態情報の欠落は MGD 治療薬の開発において致命的とも言える。そこで本研究では、生体環境に近い *in vitro* 三次元培養系を活用した腺分泌モデルの基盤構築および *in vivo* ウサギマイボーム腺における薬物移行評価系の確立、さらに点眼時の薬物移行性の評価に取り組んだ。

1. マイボーム腺細胞における三次元培養法の確立

ヒト由来不死化マイボーム腺上皮細胞は、培養維持が容易でありマイボーム腺の生理機能を解明するツールとして使用されているが、古典的な二次元単層培養による評価系のみであり、生体に近い微小環境を再現しているとは言い難い。そこで、皮脂腺における Air-lift 三次元培養の報告を参考に、簡便に腺分泌を再現できる三次元培養法の構築を検討し、Cytokeratin (CK) 発現分布、脂質分泌能の変化および形態学的特徴について解析した。その結果、多孔質スキャフォールド (Alvetex[®]) を用いたマイボーム腺細胞の Air-lift 三次元培養に伴い、CK6、CK10 など複数のサイトケラチン分子種の発現増加が確認され、マイボーム腺の分化あるいは Air-lift 環境へ適応した可能性が示唆された。さらに、同条件下において細胞内脂肪滴の増加が認められ、電子顕微鏡観察では、複数の脂質小胞が細胞質内に観察された。以上より、Alvetex[®] を用いたマイボーム腺細胞の Air-lift 三次元培養は、マイボーム腺細胞における全分泌過程を部分的に再現している可能性がある。

2. マイボーム腺への点眼時薬物移行性の検証

薬物動態評価に先立ち、簡便なウサギマイボーム腺採取法を独創的なアイデアで実現した。本研究において確立した採取法は、組織中に含まれる水分を急速凍結した際に生じる氷を組織とスライドガラスの接着剤として応用する着想に基づき、特殊な器具が不要であり、高いスループットが期待されるだけでなく、周辺組織からのコンタミリスクが低減されるなど薬物動態評価に適した画期的な手法であると言える。本採取法を活用して、選択的グルココルチコイド受容体アゴニスト (SA22465) およびリン酸ベタメタゾンモデル化合物として、ウサギ単回点眼時におけるマイボーム腺中薬物濃度推移を評価した。その結果、マイボーム腺への薬物移行量は、溶解型あるいは懸濁型に関わらず、周辺の眼瞼組織と比較して 10~100 倍低いことを明らかにした (Figure 2)。さらに、マイクロオートラジオグラフィーにより、点眼時におけるマイボーム腺への薬物移行はマイボーム腺中央導管を介している可能性は低く、結膜を介した寄与が高いと示唆された。

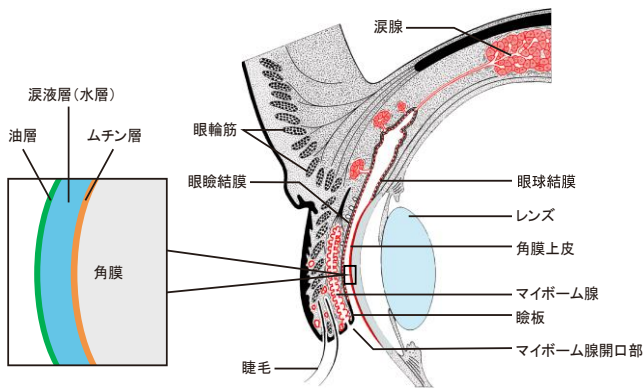


Figure 1. Schematic diagram of the eyelid structure and tear film

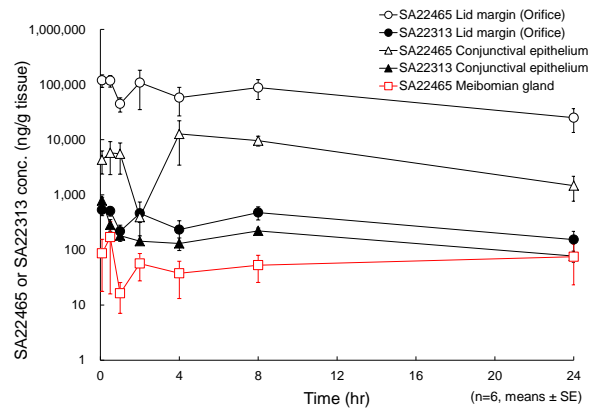


Figure 2. Lid margin, conjunctival epithelium and meibomian gland concentration of SA22465 and SA22313 following a single instillation of a 1% SA22465 to rabbits.

3. アジスロマイシン点眼時のマイボーム腺移行の可能性

アジスロマイシン点眼液は、米国では MGD に対して最も頻繁に適用外使用されている薬剤であるが、マイボーム腺中濃度を検討した報告が無いため、アジスロマイシン点眼時の薬物動態情報は臨床知見を考察する上でも興味深い。そこで、アジスロマイシン単回点眼後のマイボーム腺中薬物濃度推移を評価した。その結果、マイボーム腺中濃度は、眼瞼結膜上皮あるいはマイボーム腺開口部と比較して 100~1000 倍低く、抗菌作用や抗炎症効果を示す推定薬効濃度にも達していなかった。本結果は、マイボーム腺への限定的な薬物移行が治療効果に制限を掛けていた可能性を示唆するだけでなく、これまで眼瞼中濃度で代用されていたアジスロマイシンの PK-PD 解釈に新たな着眼点を示した。さらに、質量分析イメージング像は、上述したオートラジオグラフィーの結果を支持しただけでなく、実用に耐えうる十分な解像度であり、マイボーム腺における薬物分布を評価する手段としての有用性も明らかにした。

結論

本研究では、頑健性の高いマイボーム腺における薬物動態評価系を新規確立し、薬物点眼時のマイボーム腺への移行量が著しく制限されていることを明らかにした。さらに本評価系は、簡便かつスループットに優れているため、マイボーム腺への優れた移行性を持ち有効性と安全性を両立した MGD 治療薬の創薬や、効率的なドラッグデリバリーシステムへの展開が一層加速化されると期待される。また本研究で開発された三次元培養系は、マイボーム腺の分化・成熟過程を部分的であるが再現しており、*in vitro* 腺分泌モデルとして発展的に使用出来る可能性を示した。

以上、本研究で得られた成果と知見は、MGD の本質的な病巣部—作用標的部位の特定に向けて大きく前進させるものであり、特に、効率的な薬物動態スクリーニングを介して MGD 治療薬の早期開発を強く推進すると期待される。

本研究の誌上発表

1. Asano N, Ueda K, and Kawazu K. Penetration Route of the Selective Glucocorticoid Receptor Agonist SA22465 and Betamethasone into Rabbit Meibomian Gland Based on Pharmacokinetics and Autoradiography. *Drug Metab Dispos.* 45: 826-833 (2017).
2. Asano N, Wiseman JM, Tsuji F and Kawazu K. Limited Azithromycin Localization to Rabbit Meibomian Glands Revealed by LC-MS-Based Bioanalysis and DESI Imaging. *Biol. Pharm. Bull.* 40: 1586-1589 (2017).
3. Asano N, Hampel U, Garreis F, Schröder A, Schicht M, Hammer CM, Paulsen F. Differentiation patterns of immortalized human meibomian gland epithelial cells in three-dimensional culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 59: 1343-1353 (2018).