

令和元年5月14日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11279

研究課題名(和文) 眼疾患病態形成分子(プロ)レニン受容体を標的にした低分子化合物による創薬探索

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic agents targeting (pro) renin receptor

研究代表者

神田 敦宏 (Kanda, Atsuhiko)

北海道大学・医学研究科・特任講師

研究者番号：80342707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性や糖尿病網膜症は、主要な中途失明原因の網脈絡膜疾患であり、生活習慣病に合併した慢性炎症性疾患と位置づけられる。しかしながら、未だ根本的な治療法の開発・疾患発症機序の解明には至っていない。我々は、これまでに生活習慣病での臓器障害において(プロ)レニン受容体が炎症・血管新生病態の上流で疾患の分子病態を制御していることを報告してきた。本研究課題では、(プロ)レニン受容体の機能解明および生理的機能への影響を最小限にしながら慢性炎症病態を抑制する阻害剤の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、眼科領域の分子標的療法では抗VEGF療法が臨床応用されたが、VEGFは進行期病態のメインプレーヤーでありRAPS活性化の下流で動く分子である。この臨床病期には他の炎症関連分子も動いているため、抗VEGF療法のみで病態を制御することには限界がある。(プロ)レニン受容体(つまりRAPSの活性化抑制)を創薬ターゲットとした本研究成果は、多くの病態分子を抑制できる上流での介入戦略として、より効率の良い治療の実現につながる事が期待されている。

研究成果の概要(英文)：(Pro)renin receptor is known to regulate activations of tissue RAS and RAPS, and involved in the pathogenesis of several ocular disorders. However, its physiological functions remain unclear. The goal of this study is to develop a novel agent which can inhibit (P)RR functions, and determine its safety and efficacy in vitro and in vivo.

研究分野：網膜細胞生物学

キーワード：(プロ)レニン受容体 受容体結合プロレニン系 炎症 血管新生 レニン・アンジオテンシン系

1. 研究開始当初の背景

レニン・アンジオテンシン系 (RAS) は、生物が海から陸へと進化する過程で塩分と水分を体内に保持するために発達した循環ホルモンシステム (循環 RAS) であるが、臓器局所では細胞の分化・増殖や組織修復などの役割を担っている (組織 RAS)。これまでに我々は、眼組織 RAS が炎症・血管新生病態の上流で網膜疾患の分子病態を制御していることを示した。飢餓時代に塩分保持など生命維持に必須の役割を担ってきた RAS であるが、皮肉にも飽食の現代社会においては生活習慣病の進行因子となっている。さらに、我々は組織 RAS の上流に (プロ)レニン受容体が存在し、プロレニンとの結合が組織 RAS の活性および (プロ)レニン受容体の細胞内伝達シグナル (ERK1/2 活性化など) が網脈絡膜病態を惹起すること [受容体結合プロレニン系 (RAPS)] を世界で初めて明らかにした。(プロ)レニン受容体によるこの 2 つの作用 (組織 RAS の活性化および RAS 非依存型細胞内シグナル活性化) は眼組織のみならず腎臓や心臓などの病態モデルにおいても認められている。また、最近、我々は糖尿病網膜症などの患者より採取した臨床検体を用いた解析の結果、(プロ)レニン受容体は糖尿病網膜症、結膜リンパ腫などにおける疾患の進行に関与する重要な分子であることを示した。

海外の大規模ランダム化比較試験では、RAS 抑制薬の経口投与により糖尿病網膜症の発症・進行が抑制された報告が複数ある。しかし、新薬であるレニン阻害薬 aliskiren をはじめとする既存の RAS 抑制薬では、(プロ)レニン受容体からの細胞内シグナルは阻害できないことから、(プロ)レニン受容体は生活習慣病における病態形成の上流経路で早期介入できる (臓器保護のための) 共通の創薬ターゲットとして注目されている。

2. 研究の目的

これまでの成果を基に本研究では、受容体結合プロレニン系の中心に位置する (プロ)レニン受容体を標的にして、網羅的な低分子化合物スクリーニングなどによる創薬研究ならびに (プロ)レニン受容体の病理的機能解析などを展開する。

3. 研究の方法

(1) ヒト・マウス共通の (プロ)レニン受容体遺伝子配列を標的とした一本鎖 RNA 干渉を複数種類デザインした。そして、ヒト・マウス由来培養細胞を用い、デザインした一本鎖 RNA 干渉による遺伝子ノックダウン効果を real-time PCR 法またはイムノプロット法で解析し、スクリーニングを行った。そして、最も抑制効果の高かった (プロ)レニン受容体特異的一本鎖 RNA 干渉薬 [(P)RR-PshRNA] を正常マウスに投与し、その安全性を確認した。その後、網脈絡膜疾患動物モデルマウスに (P)RR-PshRNA を投与し、炎症性サイトカインなどの遺伝子発現解析や免疫組織染色などを行い、病態抑制効果を検討した。(2) (プロ)レニン受容体細胞外領域について既に結晶が得られているが、分解能が低く構造解析には至っていなかった。そこで分解能の向上を期待して、発現領域を少しずつ短くしたコンストラクトを 4 種類作製し、蛋白質調製、結晶化、X 線回折実験を行った。増殖糖尿病網膜症 (PDR) 患者の血漿中における可溶性 (プロ)レニン受容体 [s(P)RR] タンパク質濃度と糖尿病による全身的要因との関連性について検討するため、2 型糖尿病に合併した PDR 患者 20 名と対照群として非糖尿病患者 (特発性黄斑上膜および黄斑円孔) 20 名の手術前に採取した血漿を用いて検討した。血漿中における s(P)RR やプロレニン、糖尿病誘発性炎症関連分子のタンパク質濃度はマルチプレックス解析システムおよび酵素免疫測定法を用いて測定・解析を行った。さらに、ヒト網膜毛細血管内皮細胞を用いて種々の条件下における遺伝子発現変化を定量的リアルタイム PCR にて解析した。

4. 研究成果

(1) (P)RR-PshRNA は、代表的な二本鎖 siRNA と同等の遺伝子発現抑制効果を示したが、生物学的安定性の向上が認められた。さらに正常マウスに (P)RR-PshRNA を硝子体投与したが、組織学的・電気生理学的な変化は認められなかった。また、複数の網脈絡膜疾患動物モデルマウスに投与したところ、網膜において惹起された炎症関連分子 (単球走化性因子-1 やインターロイキン-6 など) の遺伝子発現の抑制が認められた。今回、我々は新規 (プロ)レニン受容体阻害剤として (P)RR-PshRNA を開発することに成功した。そして、疾患モデル動物において (P)RR-PshRNA により有害事象なく眼病態の抑制効果が認められた。今後、糖尿病網膜症などに対する新たな分子標的療法になることが示唆される。

(2) 新しく作成した 4 種類のコンストラクトについて、大腸菌で封入体として発現させ希釈法で巻き戻して結晶化に十分な量を調製することに成功した。市販の結晶化スクリーニングを用いて結晶化条件を探索したところ、複数の条件で結晶が得られたため、もっとも再現性の良かった結晶を放射光施設に持っていき、X 線回折実験を行ったところ良好な回折像が得られたためデータセットを収集した。新しく作製したコンストラクトについて結晶化に成功した。X 線回折データを解析したところ、これまで得られていた結晶とは異なるパッキングをした結晶であることが判明した。これまでのところ分解能が大幅に向上したデータセットを収集するには至っていないが、結晶の再現性は改善しており構造解析に向けた展望は悪くない。今後は結晶

化条件やX線回折実験のクライオ条件検討を進め、構造解析を実現したい。

(3) PDR群において血漿s(P)RR、プロレニンおよび活性型プロレニンが非糖尿病患者に比べ高値であり、また炎症関連分子では leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1 (LRG1)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、complement factor D (CFD) が有意に上昇していた。さらに、s(P)RRとそれら分子は有意な相関が認められたが、プロレニンとは相関がなかった。また、臨床検査項目とs(P)RRとの関連性について調べたところ、腎機能の指標である推算糸球体濾過量(eGFR)や血清クレアチニン(sCre)との相関が認められた。ヒト網膜毛細血管内皮細胞をLRG1、CFD、TNF- α で刺激すると、TNF- α でのみ(P)RR/ATP6AP2遺伝子の発現が上昇したが、プロレニン/RENの発現は変化しなかった。また、高グルコース条件下ではヒト網膜毛細血管内皮細胞における(P)RR/ATP6AP2とプロレニン/RENの両方の発現が上昇した。慢性炎症、腎機能障害および高血糖など糖尿病誘導因子が血漿中s(P)RR濃度を上昇させ、さらには組織RASの活性化を誘導してPDRにおける網膜新生血管を促進していると示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20件)

1. Hase K, Kanda A, Noda K, Ishida S. Increased plasma galectin-1 is correlated with advanced glycation end products and interleukin-1 in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol*. 査読有, 12巻, 2019, 692-694, DOI: 10.18240/ijo.2019.04.28.
2. Kanda A, Ishida S. (Pro)renin receptor: Involvement in diabetic retinopathy and development of molecular targeted therapy. *J Diabetes Investig*. 査読有, 10巻, 2019, 6-17, DOI: 10.1111/jdi.12842.
3. Kanda A, Noda K, Hirose I, Ishida S. TGF- β -SNAIL axis induces Müller glial-mesenchymal transition in the pathogenesis of idiopathic epiretinal membrane. 査読有. 9巻, 2019, 673, DOI: 10.1038/s41598-018-36917-9.
4. Wu D, Kanda A, Liu Y, Kase S, Noda K, Ishida S. Galectin-1 promotes choroidal neovascularization and subretinal fibrosis mediated via epithelial-mesenchymal transition. *FASEB J*. 査読有. 33巻, 2019, 2498-2513, DOI: 10.1096/fj.201801227R.
5. Dong Y, Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. Pathologic roles of receptor-associated prorenin system in idiopathic epiretinal membrane. *Sci Rep*. 査読有. 7巻, 2017, 44266, DOI: 10.1038/srep44266.
6. Dong Y, Noda K, Murata M, Yoshida S, Saito W, Kanda A, Ishida S. Localization of Acrolein-lysine adduct in fibrovascular tissues of proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res*. 査読有. 42巻, 2017, 111-117, DOI: 10.3109/02713683.2016.1150491.
7. Hase K, Kanda A, Hirose I, Noda K, Ishida S. Systemic factors related to soluble (pro)renin receptor in plasma of patients with proliferative diabetic retinopathy. *PLoS ONE*. 査読有. 12巻, 2017, e0189696, DOI: 10.1371/journal.pone.0189696
8. Kanda A, Dong Y, Noda K, Saito W, Ishida S. Advanced glycation endproducts link inflammatory cues to upregulation of galectin-1 in diabetic retinopathy. *Sci Rep*. 査読有. 7巻, 2017, 16168, DOI: 10.1038/s41598-017-16499-8
9. Kanda A, Ishizuka ET, Shibata A, Matsumoto T, Toyofuku H, Noda K, Namba K, Ishida S. A novel single-strand RNAi therapeutic agent targeting (pro)renin receptor suppresses ocular inflammation. *Mol Ther Nucleic Acids*. 査読有. 7巻, 2017, 116-126. DOI: 10.1016/j.omtn.2017.01.001
10. Kinoshita S, Ohguchi T, Noda K, Murata M, Yasueda S, Obata H, Matsunaga T, Fukushima T, Kanda A, Ishida S. Evaluation of the safety and tolerability of conjunctival ring for posterior segment of the eye. *Curr Eye Res*. 査読有. 30巻, 2017, 1-6. DOI: 10.1080/02713683.2017.1287277
11. Matsuda T, Noda K, Murata M, Kawasaki A, Kanda A, Mashima Y, Ishida S. Vascular Adhesion Protein-1 Blockade Suppresses Ocular Inflammation after Retinal Laser Photocoagulation in Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有. 58巻, 2017, 3254-3261, DOI: 10.1167/iovs.17-21555

12. Murata M, Noda K, Kawasaki A, Yoshida S, Dong Y, Saito M, Dong Z, Ando R, Mori S, Saito W, Kanda A, Ishida S. Soluble vascular adhesion protein-1 mediates spermine oxidation as semicarbazide-sensitive amine oxidase: possible role in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res*. 査読有. 42巻, 2017, 1674-1683, DOI : 10.1080/02713683.2017.1359847
13. Suimon Y, Saito W, Hirooka K, Kanda A, Kitai H, Sakakibara-Konishi J, Ishida S. Improvements of visual function and outer retinal morphology following spontaneous regression of cancer in anti-recoverin cancer-associated retinopathy. *Am J Ophthalmol Case Rep*. 査読有. 5巻, 2017, 137-140, DOI : 0.1016/j.ajoc.2016.12.024
14. Dong Y, Dong Z, Kase S, Ando R, Fukuhara J, Kinoshita S, Inafuku S, Tagawa Y, Ishizuka ET, Saito W, Murata M, Kanda A, Noda K, Ishida S. Phosphorylation of alphaB-crystallin in epiretinal membrane of human proliferative diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol*. 査読有. 9巻, 2016, 1100-1105, DOI : 10.18240/ijo.2016.08.03
15. Dong Y, Kase S, Dong Z, Fukuhara J, Tagawa Y, Ishizuka ET, Murata M, Shinmei Y, Ohguchi T, Kanda A, Noda K, Ishida S. Regulation of vascular endothelial growth factor-C by tumor necrosis factor- in the conjunctiva and pterygium. *Int J Mol Med*. 査読有. 38巻, 2016, 545-550, DOI: 10.3892/ijmm.2016.2647
16. Dong Z, Shinmei Y, Dong Y, Inafuku S, Fukuhara J, Ando R, Kitaichi N, Kanda A, Tanaka K, Noda K, Harada T, Chin S, Ishida S. Effect of geranylgeranylacetone on the protection of retinal ganglion cells in a mouse model of normal tension glaucoma. *Heliyon*. 査読有. 2巻, 2016, e00191, DOI: 10.1016/j.heliyon.2016.e00191
17. Kanda A, Ishida S. Receptor-associated prorenin system contributes to development of inflammation and angiogenesis in proliferative diabetic retinopathy. *Inflamm Regen*. 査読有. 36巻, 2016, 22, DOI: 10.1186/s41232-016-0027-0
18. Kinoshita S, Noda K, Saito W, Kanda A, Ishida S. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor-B in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*. 査読有. 94巻, 2016, e521-523, DOI: 10.1111/aos.12969

(他2件)

〔学会発表〕(計 24件)

1. 神田敦宏、劉野、市原淳弘、石田晋。(プロ)レニン受容体特異的一本鎖RNA干渉による脈絡膜血管新生と線維化の抑制。第11回(プロ)レニン受容体フォーラム, 2019年03月16日, コングレススクエア日本橋(東京都、中央区)
2. 神田敦宏、石田 晋。受容体結合プロレニン系に対する核酸医薬による眼炎症病態の抑制。第38回日本眼薬理学会, 2018年09月29日-2018年09月30日, 長崎大学(長崎県、長崎市)
3. 神田敦宏、Wu Di、野田航介、石田晋。脈絡膜血管新生と線維化におけるガレクチン-1の関与。第22回眼創傷治癒研究会, 2018年08月18日-2018年08月19日, 奈良ホテル(奈良県、奈良市)
4. 神田敦宏。新規血管新生因子ガレクチン-1のアフリベルセプトによる阻害と糖尿病網膜症における病態形成への関与。Gunma Macular Academy (招待講演)。2018年11月17日, 群馬ロイヤルホテル(群馬県、前橋市)
5. 神田敦宏。糖尿病における眼内炎症性メディエーター 受容体結合プロレニン系 シンポジウム「なぜ糖尿病で失明するのか ~内科の意見、眼科の意見」。第18回日本抗加齢医学会総会(招待講演), 2018年5月27日, 大阪国際会議場(大阪府、大阪市)
6. Kanda A, Liu Y, Ishizuka ET, Noda K, Ishida S. Therapeutic effect of novel single-stranded RNAi agent targeting (Pro) renin receptor in ocular inflammation. 33rd Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress (APAO). 2018年2月8日-11日, Hong Kong (China)
7. 神田敦宏。糖尿病網膜症における終末糖化産物誘導炎症応答によるガレクチン-1の発現誘導。第10回Retina Research Meeting, 2017年12月09日, JPタワーホール(東京都、中央区)
8. 神田敦宏、野田航介、齋藤 航、石田 晋。糖尿病網膜症における新規血管新生因子ガレクチン-1の発現調節メカニズム。第40回日本分子生物学会年会, 2017年12月06日-2017年12月09日, パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

9. 神田敦宏、野田航介、齋藤 航、石田 晋. 糖尿病網膜症における新規血管新生因子ガレクチン-1の発現調節メカニズム. 第32回日本糖尿病合併症学会, 2017年10月27日-2017年10月29日, 京王プラザホテル(東京都、新宿区)
 10. 神田敦宏、石塚タンエルダ、劉 野、野田航介、石田 晋. (プロ)レニン受容体特異的一本鎖RNA干渉による眼炎症病態の抑制. 第17回日本抗加齢医学会総会. 2017年06月02日-2017年06月04日, 東京国際フォーラム(東京都、千代田区)
 11. 神田敦宏、董 陽子、野田航介、齋藤 航、石田 晋. 糖尿病網膜症における新規血管新生因子ガレクチン-1の発現調節メカニズム. 第121回日本眼科学会総会, 2017年04月06日-2017年04月09日, 東京国際フォーラム(東京都、千代田区)
 12. 神田敦宏. 糖尿病網膜症における(プロ)レニン受容体の病態形成への関与解明と阻害薬開発. YIA受賞講演. 第32回日本糖尿病合併症学会, 2017年10月27日-2017年10月29日, 京王プラザホテル(東京都、新宿区)
 13. 神田敦宏. 受容体結合プロレニン系を標的とした網脈絡膜疾患治療. 教育セミナー「網膜疾患に対する基礎研究の進め方-思考の過程とその成果-」. 第121回日本眼科学会総会, 2017年04月06日-2017年04月09日, 東京国際フォーラム(東京都、千代田区)
 14. 神田敦宏. 受容体結合プロレニン系を介した眼疾患病態形成機序の解明と創薬開発. ランチョンセミナー「バイエル レチナ・アワード」. 第121回日本眼科学会総会, 2017年04月06日-2017年04月09日, 東京国際フォーラム(東京都、千代田区)
 15. Kanda A, Dong Y, Noda K, Ishida S. Galectin-1, an angiogenic factor associated with diabetic retinopathy, is regulated by advanced glycation end products triggering inflammatory cues. 14th Congress of the International Ocular Inflammation Society, 2017年10月18日-2017年10月21日, Lausanne (Switzerland)
 16. Kanda A, Dong Y, Noda K, Saito W, Ishida S. Advanced glycation end products link inflammatory response to upregulation of galectin-1 in diabetic retinopathy. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, 2017年05月07日-2017年05月11日, Baltimore(USA)
 17. 神田敦宏、董陽子、野田航介、齋藤航、石田 晋. アフリベルセプト新規結合タンパク質ガレクチン-1による糖尿病網膜症における病態形成への関与. 第39回日本分子生物学会, 2016年11月30日-2016年12月02日, パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)
 18. 神田敦宏、董 陽子、野田航介、齋藤 航、石田 晋. アフリベルセプト新規結合タンパク質ガレクチン-1による糖尿病網膜症における病態形成への関与. 第6回わかもと先進眼科医療研究会, 2016年08月19日, ロイヤルパークホテル(東京都、中央区)
 19. 神田敦宏、野田航介、齋藤 航、石田 晋. 血管新生因子ガレクチン-1のアフリベルセプトによる阻害と糖尿病網膜症における関与. 第120回日本眼科学会総会, 2016年04月07日-2016年04月10日, 仙台国際センター(茨城県、仙台市)
 20. 神田敦宏. 新規(プロ)レニン受容体機能阻害剤の開発. 第8回(プロ)レニン受容体フォーラム, 2016年03月19日、岐阜大学(岐阜県、岐阜市)
 21. Kanda A, Dong Y, Noda K, Saito W, Ishida S. Galectin-1 is associated with progression of diabetic retinopathy. XX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research (ISER), 2016年09月25日-09月29日, Tokyo (Japan)
 22. Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. Galectin-1 is an angiogenic factor associated with proliferative diabetic retinopathy: Novel target for aflibercept. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, 2016年05月1日-05月05日, Seattle (USA)
 23. Kanda A. Aflibercept is more than just a VEGF trap: anti-angiogenesis effect on Galectin-1. SNOW (Sapporo Novel Ophthalmology Workshop, 2016年1月23日、Sapporo (Japan)
 24. Kanda A. Aflibercept traps galectin-1, an angiogenic factor associated with diabetic retinopathy. 2016 Autumn Meeting of Ophthalmological Society of Taiwan (TOS), 2016年11月12日-13日、Kaohsiung (Taiwan)
- 〔図書〕(計 7 件)
1. 神田敦宏. 糖尿病網膜症における(プロ)レニン受容体の病態形成への関与解明と阻害薬

- 開発. 第 32 回 日本糖尿病合併症学会 Young Investigator Award 受賞講演. 糖尿病合併症学会誌. 日本糖尿病合併症学会. 32: 135-139, 2018
2. 神田敦宏、石田 晋. 慢性炎症と糖尿病網膜症. 糖尿病診療マスター. 医学書院. 15: 851-855, 2017
 3. 神田敦宏、石田 晋. 糖尿病網膜症の病態研究と進歩. Diabetes Frontier. メジカルビュー社. 28: 273-276, 2017
 4. 神田敦宏. 糖尿病網膜症における受容体結合プロレニン系の関与. 日本糖尿病眼学会誌. 日本糖尿病眼学会. 21: 63-65, 2017
 5. 神田敦宏. 大規模臨床試験(全身投与) まとめてズバツと解説! 知っているようで知らない新しい糖尿病網膜症診療. メジカルビュー社. 142-146, 2016
 6. 神田敦宏. 糖尿病網膜症における受容体結合プロレニン系の関与. 第 30 回日本糖尿病合併症学会・第 21 回日本糖尿病眼学会総会合同シンポジウム. 糖尿病合併症. 総説. 日本糖尿病合併症学会. 30: 26-28, 2016
 7. 神田敦宏、石田 晋. エイジングからみた糖尿病網膜症. 眼科. 金原出版. 58: 643-649, 2016

〔産業財産権〕

取得状況(計 2 件)

名称: プロレニン遺伝子またはプロレニン受容体遺伝子の発現を抑制する一本鎖核酸分子およびその用途

発明者: 神田敦宏他

権利者: 北海道大学、東京医大、(株)ボナック

種類: 特許

番号: W02017/115872 A1

出願年月日: 2016

取得年月日: 2017

国内外の別: 国外

名称: プロレニン受容体リガンド及びアンタゴニスト

発明者: 神田敦宏他

権利者: 北海道大学

種類: 特許

番号: 特開 2017-141185

出願年月日: 2016

取得年月日: 2017

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://eye.med.hokudai.ac.jp/>

<https://www.facebook.com/eyeMEDhokudaiCVS>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 喜多 俊介

ローマ字氏名: KITA SYUNSUKE

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 薬学研究院

職名: 特任助教

研究者番号(8桁): 10702003

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。