

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15734

研究課題名(和文)マトリセルラー蛋白を標的とした次世代型アンチセンス点眼・内服治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of next-generation gapmer antisense oligonucleotides targeting periostin for intraocular proliferative disease

研究代表者

吉田 茂生(Yoshida, Shigeo)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：50363370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、加齢黄斑変性や糖尿病網膜症などの眼内増殖性疾患の治療に抗血管内皮増殖因子(VEGF)療法が導入され、眼科臨床で一定の成果をあげている。しかし、抗VEGF抗体の硝子体注射を頻回に行っても、その薬効は限定的である場合が多い。我々は、眼内増殖性疾患の疾患責任分子としてマトリセルラー蛋白であるペリオスチンの同定に成功した。一方、組織到達性に優れ、安全性が高い次世代型ギャプマー型アンチセンスが開発された。本研究では、ペリオスチン標的次世代型アンチセンスを合成した。ペリオスチン標的ギャプマー型アンチセンスはin vitro, in vivo眼内増殖モデルで有意な抑制効果を示した。

研究成果の概要(英文)：Recently, a number of studies have demonstrated the effects of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) treatment on intraocular proliferation in eyes with age-related macular degeneration and diabetic retinopathy. However, despite the frequent intravitreal injection of the anti-VEGF drugs, its effect is often limited. As a disease responsible molecule for intraocular proliferative diseases, we have successfully identified periostin, a matricellular protein. On the other hand, a next-generation gapmer antisense oligonucleotides that is stable with high safety has been recently developed. In this study, the next generation antisense oligonucleotides targeting periostin was synthesized. Periostin-targeting gapmer antisense oligonucleotides significantly inhibited fibrovascular proliferation both in vitro and in vivo models of intraocular proliferation.

研究分野：眼科学

キーワード：ペリオスチン 糖尿病網膜症 加齢黄斑変性 アンチセンス

1. 研究開始当初の背景

我が国の後天視覚障害原因の4割近くは、糖尿病網膜症(DR)、加齢黄斑変性(AMD)や高度近視等の眼内増殖性疾患である。高齢化社会の進展や食生活の欧米化により、今後も患者数は増加すると考えられ、よりよい治療法の確立が社会的急務である。

これらの眼内増殖性疾患においては、網膜の上下に生じる線維(血管)増殖組織(以下増殖組織)が主要病態である。これは一種の創傷治癒反応であるが、眼内で過剰におこると難治で、視機能を低下させる。近年、AMDやDRの治療に抗血管内皮増殖因子(VEGF)療法が導入され、眼科臨床で一定の成果をあげている。しかし、抗VEGF抗体は数週間毎の反復投与が必要であり、耐性例や無効例も存在する。また、抗VEGF薬投与後の線維化が視力予後不良の原因となることも知られている。したがって、増殖組織の発生進展病理に基づいた新しい分子標的薬の創製が期待される。

我々は増殖組織の成因に基づいた分子標的療法を開発する目的で、2002年より、患者増殖組織のゲノムワイド遺伝子発現解析を世界で初めて開始した(BJO 2010;PLoS One 2013;IOVS 2015)。PDRあるいはPVRに伴う増殖組織と網膜由来のRNAを用いて4万遺伝子のマイクロアレイ解析を行い、網膜での発現がほとんどなく、増殖組織で有意に高発現である増殖組織特徴的遺伝子が約100存在するを見いだした(IOVS 2015)。この増殖組織特徴的遺伝子にペリオスチンやテナシンCなどのマトリセルラー蛋白が含まれていた。従来細胞と細胞の間隙を埋める細胞外マトリクス(ECM)として考えられてきた蛋白のうち、マトリセルラー蛋白は、古典的ECMとは明確に区別すべき難治性炎症性疾患の病態に深くかかわる分子群として近年注目されつつある。

ペリオスチンとテナシンCはPDRおよびPVR患者硝子体で高値を示し、病期と正の相関を示した(IOVS 2011)。また、正常網膜には発現せず、PDR・PVR増殖組織の-smooth muscle actin陽性細胞に特異的に発現していた。In Vitroでペリオスチンあるいは蛋白投与により、増殖組織の構成細胞であるヒト網膜色素上皮細胞(RPE)の増殖、遊走、接着、コラーゲン合成が亢進した(FASEB J 2014;Lab Invest 2016)。さらに、ペリオスチンあるいは阻害により実験的脈絡膜線維血管増殖組織形成が抑制された。以上よりペリオスチン・は眼内増殖性疾患治療の分子標的になると考えられた(FASEB J 2014;Gene Ther 2015)。この成果を踏まえて、臨床応用に向けて産学官共同でペリオスチン標的RNA干渉(siRNA)医薬の前臨床試験を行っている。

一方、近年、従来のRNA干渉(siRNA)やアンチセンス核酸と分子構造の異なる次世代型の核酸医薬であるギャプマー型アンチセンスが開発された。ギャプマー型アンチセンスは従来型より疾患標的性が高く、血中安定性に優れ、安全性が高い次世代核酸医薬である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、マトリセルラー蛋白(ペリオスチン)標的ギャプマー型アンチセンスを最適化し、点眼や内服により眼内増殖抑制療法を実現する事を目的とする。安価でコンプライアンスの高い分子標的療法の確立により治療成績を向上し、患者の身体的、金銭的負担を軽減できれば、その社会貢献ははかり知れない。

3. 研究の方法

マトリセルラー蛋白(ペリオスチン)標的アンチセンスの候補配列決定

ヒト全長ペリオスチン mRNA から作成可能な 20mer のアンチセンス標的配列を各々全パターン作成し、データベース化する。このデータベースから、in Silico スクリーニングにより実際に用いるアンチセンス配列を選択する。まず、非ヒト霊長類マカクザル 2 種とマウス間で種間交差性のある配列を選別する。次に、他の遺伝子とのホモロジーがあるもの、Toll-like receptor のリガンドとなり免疫系を賦活化する CpG 配列を含むもの、アンチセンス分子自身が高次構造をとる配列を除外し、候補となるギャップマー型アンチセンスの候補配列決定を決定し、合成する。

マトリセルラー蛋白(ペリオスチン)アンチセンスの in Vitro 機能評価

で合成したペリオスチンアンチセンスの生物学的抑制効果を明らかにする。培養ヒト RPE を用いて、TGF β 2 刺激による増殖能、接着能、遊走能、収縮活性の亢進に対するペリオスチンアンチセンスの抑制効果を指標に、最適な濃度を選定する。この際、従来のペリオスチン/の一本鎖 RNA 干渉 (siRNA) や中和抗体投与群との比較検討も併せて行う。次に、培養ヒト網膜血管内皮細胞(HREC)を用いて、VEGF 刺激による増殖能、遊走能、管腔形成能の亢進に対する、アンチセンスの抑制効果について検討を行う。管腔形成に関してはマトリゲル上に HREC を培養し、アンチセンスとコントロールのスクランブルで処理後、VEGF で刺激し、管腔形成の面積を画像処理、両群で比較し、スクランブル配列の管腔形成抑制効果を定量化する。有意な抑制効果を示したアンチセンスは適宜特許申請を行う。

網膜血管新生モデルや脈絡膜血管新生モデルにおけるペリオスチンアンチセンスの動態と増殖抑制効果、安全性の検証

初年度最適化を行ったペリオスチン/アンチセンスの薬効を、既に確立しているマウス網膜血管新生モデル(OIR)・脈絡膜血管新生モデル(CNV)にて評価する。

マウス網膜血管新生モデルとして、頻用している再現性の高いマウス酸素負荷網膜血管新生モデルを用いる。高酸素負荷直後に最適化ペリオスチンアンチセンスを経口投与する。至適濃度は臨床現場で使用されているアンチセンス医薬の添加量を参考に決定する。血管新生誘導後 5 日にフラットマウントを作成して血管新生抑制効果を定量化する。対照としてスクランブル配列核酸のみの投与も行い、その影響を検証する。その後眼球摘出し、ペリオスチンアンチセンスの残存量を定量すると同時に組織学的、電気生理学的にも安全性を評価する。

次に、マウスにレーザーを照射し、脈絡膜新生血管を誘導する。同時に、ペリオスチンあるいはアンチセンスを硝子体注射する。注射後 7、24 日目にフラットマウントを作成し、血管新生および線維化抑制度を評価し、治療効果を判定する。同時に前房水を採取し、ペリオスチンアンチセンスの眼内での濃度を測定する。術後 7、24 日目に上記マウスモデルと同様に安全性を評価する。

4. 研究成果

マトリセルラー蛋白(ペリオスチン)標的アンチセンスの候補配列決定

ヒト全長ペリオスチン mRNA から作成可能な 20mer のアンチセンス標的配列を各々全パターン作成し、データベース化した。このデータベースから、In Silico スクリーニングにより実際に用いるアンチセンス配列を選択した。まず、非ヒト霊長類マカクザル 2 種とマウス間で種間交差性のある配列を選別した。次に、他の遺伝子とのホモロジーがあるもの、Toll-like receptor のリガンドとなり免疫系を賦活化する CpG 配列を含むも

の、アンチセンス分子自身が高次構造をとる配列を除外し、候補となるギャップマー型アンチセンスの候補配列決定を決定し、合成した。

マトリセルラー蛋白(ペリオスチン)アンチセンスの In Vitro 機能評価

次に、培養ヒト RPE を用いて、TGF β 2 刺激による増殖能、接着能、遊走能、収縮活性の亢進に対して、ペリオスチンアンチセンスは有意に抑制効果を示した ($P < 0.05$)。次に、培養ヒト網膜血管内皮細胞 (HREC) を用いて、VEGF 刺激による増殖能、遊走能、管腔形成能の亢進に対する、アンチセンスの抑制効果について検討を行った。管腔形成に関してはマトリゲル上に HREC を培養し、アンチセンスとコントロールのスクランブルで処理後、VEGF で刺激し、管腔形成の面積を画像処理、両群で比較した。ヒト網膜血管内皮細胞ではアンチセンス投与で抑制傾向を示した。

上記で最適化を行ったペリオスチンアンチセンスの薬効を、既に確立しているマウス網膜血管新生モデル (OIR)・脈絡膜血管新生モデル (CNV) にて評価した。高酸素負荷直後に最適化ペリオスチンアンチセンスを経口投与した。血管新生誘導後 5 日にフラットマウントを作成して血管新生抑制効果を定量化した。ペリオスチンアンチセンスは対照コントロールに比べて虚血領域と病的血管新生をいずれも約 50% 程度抑制した ($P < 0.05$)。その後眼球摘出し、ペリオスチンアンチセンスの組織学的、電気生理学的な安全性を評価した。組織学的、電気生理学的いずれにおいてもコントロールに比べて有意な変化はなかった。

マウスにレーザーを照射し、脈絡膜新生血管を誘導した。同時に、ペリオスチンアンチセンスを硝子体注射した。注射後 7、24 日目にフラットマウントを作成し、血管新生お

よび線維化抑制度を評価した。脈絡膜血管新生はネガコンに対して有意な抑制効果が認められた ($P < 0.05$)。線維化は抑制傾向を認めた。その後眼球摘出し、ペリオスチンアンチセンスの組織学的、電気生理学的な安全性を評価では、組織学的、電気生理学的いずれにおいてもコントロールに比べて有意な変化はなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Yoshida S, Nakama T, Ishikawa K, Nakao S, Sonoda KH, Ishibashi T: Periostin in vitreoretinal diseases. Cell Mol Life Sci 74(23): 4329-4337, 2017, 査読有
2. Yoshida S, Nakama T, Ishikawa K, Nakao S, Sonoda KH, Ishibashi T: Periostin in vitreoretinal diseases. Cell Mol Life Sci 74(23): 4329-4337, 2017, 査読有.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 吉田茂生: マトリセルラー蛋白を標的とした新しい糖尿病網膜症治療薬開発の試み. 第 31 回日本糖尿病合併症学会・第 22 回日本糖尿病眼学会 (招待講演) (仙台 2016 年 10 月 8 日)
2. 吉田茂生: 網脈絡膜疾患の組織線維化と細胞外マトリクス. 日本眼科学会・第 22 回日本糖尿病眼学会 (招待講演) (東京 2017 年 4 月 8 日)
3. 吉田茂生: 網脈絡膜疾患と細胞外マトリクス. Retina Research Forum 2017 (招待講演) (東京 2017 年 9 月 10 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

吉田茂生（YOSHIDA SHIGEO）

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：50363370

(2)研究分担者

園田康平（IKEDA YASUHIRO）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：10294943

池田 康博（IKEDA YASUHIRO）

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：50583027