

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09960

研究課題名(和文) 網膜変性疾患におけるドラッグ・リポジショニングの検討

研究課題名(英文) Examination of drug repositioning in retinal degenerative diseases

研究代表者

神野 英生 (Kohno, Hideo)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60514536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はマイクログリア/マクロファージ可視化網膜変性自然発症モデルである *Mertk*^{-/-}-Cx3cr1GFP/+ *Ccr2*RFP/+マウスに対し、抗炎症効果が期待され網膜変性への治療効果が期待されるレシチン結合ヨウ素およびミノサイクリンを使用し、網膜変性へのドラッグリポジショニングの可否につき検討を行った。その結果レシチン結合ヨウ素投与により、網膜変性は軽症化され網膜機能の保持を網膜電図にて確認した。ミノサイクリン投与によっても網膜変性は軽症化された。これらの薬剤は、網膜変性患者においても治療効果が期待できる薬剤であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性や網膜色素変性(Retinitis pigmentosa; RP)などの網膜変性疾患は視細胞死を生じ失明に直結する難治性疾患である。現在、これらの変性疾患において様々な治療法の開発が行われているが、当研究においても網膜変性疾患における新たな治療アプローチの方法論を示すことができ、社会的、学術的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We used microglia / macrophage visualized retinal degeneration spontaneous onset model *Mertk*^{-/-}-Cx3cr1GFP / + *Ccr2*RFP / + mice, to assess drug repositioning. Lecithin-Bound Iodine or minocycline were administrated *Mertk*^{-/-}-Cx3cr1GFP / + *Ccr2*RFP / + mice. As a result, retinal degeneration was alleviated by administration of lecithin-bound iodine, and the maintenance of retinal function was confirmed by electroretinogram. Administration of minocycline also alleviated retinal degeneration. These drugs are considered to be drugs that can be expected to have a therapeutic effect even in patients with retinal degeneration.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜変性 炎症 ドラッグリポジショニング マイクログリア

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (Age related macular degeneration; AMD) や網膜色素変性 (Retinitis pigmentosa; RP) などの網膜変性疾患は視細胞の細胞死 (視細胞死) を生じ失明に直結する難治性疾患である。近年の我々のものを含む研究結果の蓄積より、視細胞死の進行には網膜内の局所炎症が重要な働きをすることが明らかとなってきた。中枢神経系である視細胞は一度ダメージを受けるとその後の再生は不可能であることから、炎症を抑制することが視細胞死の進行を防ぐことができるのかを検討するのは眼科臨床医の急務であると考えられる。

今回申請者が着目したのは「ドラッグ・リポジショニング」である。ドラッグ・リポジショニングとはすでに使用実績のある薬剤を元々の対象疾患だけでなく別の疾患への薬効を検討する既存薬の再開発を意味する。市販実績があり、臨床レベルにおける安全性と体内動態が確認されていることによる「確実性」と、多くの既存データを使用できる「低コスト性」が最大の利点とされている。網膜変性疾患では薬剤の投与期間が長期にわたるため、その副作用の発現に注意する必要があるが、新規開発薬に比べ安全性が確認され副作用情報が整っている既存薬のドラッグ・リポジショニングは網膜変性疾患の治療戦略開発に有用であると考えられる。

2. 研究の目的

上記の内容を踏まえ今研究期間中に我々は以下の候補薬において網膜変性へのドラッグ・リポジショニングの検討を行った。

① 「中心性網膜炎や喘息の治療薬であるヨウ素レシチン」

ヨウ素レシチンは 1950 年代より眼科領域にて使用開始され、網膜出血、硝子体出血・混濁、中心性網膜炎、網膜中心静脈閉塞症に対し効能・効果を保険収載されている内服薬であるが、近年においては、その効果に対する薬理作用が不明なことより使用頻度が減少している。一方でヨウ素レシチンは海水由来のヨウ素および大豆由来の大豆レシチンを主成分としており、長期投与に伴う副作用をほぼ考慮しなくてもよい薬剤である。近年 Sugimoto らの研究グループよりヨウ素レシチン投与により網膜色素上皮由来の炎症性ケモカイン産生が抑制され、ヨウ素レシチンによる抗炎症効果がある可能性が報告された (J Ophthalmol. 2016;2016:9292346.)。我々の検討によると網膜色素上皮細胞は視細胞外節由来蛋白質を貪食し、炎症性サイトカイン、ケモカインを産生する (J Biol Chem. 288:15326-41;2013.)。加齢などにより網膜色素上皮細胞の機能低下が生じると、異常な視細胞外節の蓄積が生じマイクログリアの網膜下腔への遊走が開始され視細胞外節を貪食し活性化したマイクログリアにより網膜内に異常な炎症状態が発生すると我々は提唱している (J Biol Chem. 288:15326-41;2013.)。現在第一薬品産業株式会社および慶応大学の協力のもとヨウ素レシチン含有餌をマウス用に作成中である。ヨウ素レシチン含有餌にて生育した Mertk^{-/-}Cx3cr1GFP⁺ Ccr2RFP⁺マウスおよび通常餌にて生育した同マウスの網膜表現型を比較検討していくことでヨウ素レシチンの網膜変性における治療効果を検討していく。

② テトラサイクリン系抗生物質であるミノサイクリン

ミノサイクリンは広域スペクトル性のテトラサイクリン系抗生物質であり、脂溶性が高く組織移行性が良好である。皮膚感染症などにおいてテトラサイクリン系抗生物質の中で第一選択となる場合もある。その脂溶性の高さから血液網膜関門を通過し、経口投与にて網膜内まで薬効を及ぼすことが出来ることが知られている。ミノサイクリンはマイクログリア抑制作用があることが知られており、網膜変性への治療応用が期待されている薬剤である。我々の過去の報告においてもミノサイクリン投与は all-trans-retinal 蓄積のため光障害誘導網膜変性を生じる Abca4^{-/-}Rdh8^{-/-}マウスにおける視細胞保護効果を示した (J Biol Chem. 288:15326-41;2013.) しかし、Abca4^{-/-}Rdh8^{-/-}マウスにおける光障害誘導網膜変性は短期間で発症する劇症型の網膜変性であり、慢性疾患である AMD や RP とは網膜内の炎症の役割が同様であるかどうかは不明である。今回、慢性型の網膜変性自然発症モデルである Mertk^{-/-}Cx3cr1GFP⁺ Ccr2RFP⁺マウスに対しミノサイクリンを投与していく。現在の予備実験結果においては生後 4 週よりミノサイクリンを投与し 6 週において網膜標本を用い、その治療効果を検証した。RPE フラットマウントにおいて、網膜下腔へと侵入した活性化マイクログリア/マクロファージを意味する Ccr2 陽性細胞の数はミノサイクリン投与群において減少していた。今後活性化マイクログリア/マクロファージをミノサイクリン投与にて抑制し Ccr2 の発現が減少することが視細胞保護、網膜変性への治療効果へと結びついていくのか見当をしていく。

3. 研究の方法

マイクログリア/マクロファージ可視化網膜変性自然発症モデルである *Mertk*^{-/-}*Cx3cr1*GFP/*Ccr2*RFP/+マウスを作成した。このモデルマウスは網膜内においてはマイクログリア特異的に発現しているケモカインレセプター “*Cx3cr1*” に緑色蛍光蛋白質 (green fluorescein protein: GFP) を、活性化マクロファージに強く発現するケモカインレセプター “*Ccr2*” に赤色蛍光蛋白質 (red fluorescein protein: RFP) を発現している。網膜色素上皮細胞の視細胞外節貪食機能において重要な働きをする *Mertk* 遺伝子を欠損しているために網膜変性を自然発症する動物モデルである。このマウスは生後 5 週ごろに網膜変性を人工的な操作を必要とせずに自然発症する。網膜変性の発症は比較的緩徐であることから、光障害モデルなどの劇症型の網膜変性モデルでは判別できない薬効を判別することができると予想される。以上のことよりドラッグ・リポジショニングの検討に適したモデルマウスであると考えられる。

上述のモデルマウスに対しヨウ素レシチンおよびミノサイクリンを以下のように投与した。

①ヨウ素レシチン：ヨウ素レシチン配合動物餌を 1：高濃度、2：低濃度、3：無配合の 3 種を作成した。これらの配合餌を離乳直後の仔マウスに与え続け、8 週齢、12 週齢で網膜変性重症度および眼内サイトカイン濃度を測定した。

②ミノサイクリン：ミノサイクリンを 50 mg/kg もしくは 100 mg/kg にて連日腹腔内投与をした。生後 28 日より 32 日まで投与した短期投与群、および生後 56 日より 112 日まで投与した長期投与群の 2 群を作成し網膜変性重症度を検討した。

4. 研究成果

ヨウ素レシチンおよびミノサイクリンの投与は双方ともに網膜変性における視細胞死を抑制し、網膜変性を軽症化させる治療効果を発揮した。これらの薬剤は網膜内へのマクロファージ侵入を抑制し、網膜内炎症を軽減させたことが治療効果へと結びついたことが推察された。以上の結果は論文にて公表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kohno H, Terauchi R, Watanabe S, Ichihara K, Watanabe T, Nishijima E, Watanabe A, Nakano T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Effect of Lecithin-Bound Iodine Treatment on Inherited Retinal Degeneration in Mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transl Vis Sci Technol.	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/tvst.10.13.8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Terauchi R, Kohno H, Watanabe S, Saito S, Watanabe A, Nakano T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Minocycline decreases CCR2-positive monocytes in the retina and ameliorates photoreceptor degeneration in a mouse model of retinitis pigmentosa.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0239108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0239108.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 神野 英生
2. 発表標題 ヨウ素レシチンによる網膜変性での視細胞保護効果
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺内稜、神野英生、酒井勉、中野匡
2. 発表標題 ミノサイクリン投与による変性網膜におけるCcr2発現の抑制効果
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Terauchi, Tsutomu Sakai, Tadashi Nakano and Hideo Kohno.
2. 発表標題 Minocycline suppresses microglial Ccr2 expression in inherited retinal degeneration.
3. 学会等名 ARVO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関