

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462680

研究課題名(和文) 角膜癬痕に対する画期的核酸医薬の開発

研究課題名(英文) Nucleic acid-based drug for corneal opacities

研究代表者

臼井 智彦 (USUI, TOMOHIKO)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80282557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：角膜の癬痕性混濁や血管新生の抑制を、核酸医薬を用いて検討した。Angiopoietin like protein 2 (Angptl2)に対する1本鎖のRNA干渉(RNAi)製剤やマイクロRNA(miR)29bのmimicsを合成し、*in vitro*での効果を確認した。また点眼製剤としてlipid nanoparticle(LNP)でRNAi製剤を包埋し、マウスアルカリ外傷モデルに点眼し、その効果を観察した。するとLNPで包埋したAngptl2 RNAi製剤やmiR29b mimicsを点眼した群では、コントロールと比較して顕著に角膜血管新生ならびに癬痕形成を抑制した。

研究成果の概要(英文)：Nucleic acid drug is expected as new therapeutic tool for various diseases because of its high safety and economical aspects. Recently, we generate a single-stranded proline-modified short hairpin ribonucleic acid interference (RNAi) and micro-RNA (mi-RNA) molecule that is carried in a lipid nano-particle for topical application. This agent can penetrate all layers of the cornea and successfully inhibit the expressions of target molecules. This modified nucleic acid agent will be a new topical formulation for use against corneal diseases.

研究分野：眼科

キーワード：角膜 核酸医薬 血管新生

1. 研究開始当初の背景

角膜は眼球の最も表面に位置する無血管透明組織であり、健全な視機能を得るためには、角膜には瘢痕組織や血管侵入がなく透明であることが必須条件である。しかしアルカリ被爆などの化学外傷、熱傷、Stevens-Johnson症候群や眼類天疱瘡などの炎症性疾患、角膜ヘルペスや感染性角膜潰瘍などの感染性疾患、先天無虹彩症などの輪部機能不全疾患、角膜移植後の縫合系に対する炎症反応、コンタクトレンズ装用など、主に炎症を主体とするさまざまな刺激や侵襲によって角膜の透明性は脅かされ、病的な血管が角膜内へ侵入するとともに角膜実質の瘢痕化を形成する。角膜内に侵入した血管は脆弱であり、透過性が亢進していることから新生血管から漏出した成分により角膜混濁や瘢痕を招き、角膜の透明性維持が困難となり、最終的には重篤な視機能低下を残してしまう。また角膜は従来リンパ管も存在しない組織であるが、血管侵入角膜では同時にリンパ管新生も生じていることが明らかとなってきた。

このような角膜瘢痕を生じた患者の機能改善を可能にする唯一の治療は角膜移植である。しかし、血管が侵入し瘢痕化を形成した角膜では、透明性が損なわれているだけでなく、免疫的バランスが崩壊していることも大きな問題である。すなわち、侵入したリンパ管を介して抗原提示細胞が容易に所属リンパ節へ遊走しやすく、かつ侵入血管を介して活性化されたリンパ球が容易に角膜へ遊走しやすくなる。そのため血管侵入が生じている角膜に対する角膜移植術の拒絶反応の発症率は高く、術後成績は極めて不良である。また瘢痕化した角膜の実質細胞は従来の細胞とは異なり、筋芽細胞に分化しており、角膜の恒常性維持が困難になることも示唆されている。さらに本邦ではドナー角膜の供給が不十分であり、現時点での唯一の治療法である角膜移植ですら十分行うことができず、多くの患者がこのような角膜混濁による視機能低下に苦しんでいる。このような背景から、角膜炎症を引き金として生じる角膜瘢痕、血管新生のメカニズムの解明とともに、角膜移植にかわる新たな治療法の開発が望まれている。管新生に対するあたらしい創薬が期待されている。角膜瘢痕を来した角膜の機能回復には角膜移植が唯一の治療法であるが、瘢痕過程においては临床上ステロイドの局所投与が行われることがある。ステロイド点眼は、抗炎症作用、抗瘢痕作用、抗血管新生作用を有し、その効果はある程度期待できるものであるが、その効果は限定されている。さらにステロイド点眼薬には、眼圧上昇による緑内障の発症、感染リスクの増大、創傷治癒遅延など、副作用が臨床上大きな問題となる。また低分子の受

容体や酵素、様々な膜タンパクや分泌型タンパクなどを用いた分子標的薬が様々な疾患に応用されつつあるが、これらも合成や品質管理に大きなコストがかかると同時に、様々な全身への影響も懸念されている。

そのような背景から申請者はステロイド点眼や角膜移植に依存しない、核酸医薬に着目した。核酸医薬とは、遺伝子とは異なり蛋白質をコードせず、核酸そのものが機能を持つ医薬品の総称であり、特定の塩基配列や蛋白質を認識して遺伝子発現の抑制やタンパク質の機能阻害を可能にする、最先端の分子標的薬として期待されている。核酸医薬品は従来の医薬品とは全く異なる分子を創薬標的とし、特異性が高く、作用機序が明確であり、副作用が少ないと考えられている。また核酸合成機で人工的に作製可能で、品質的に安全性が高く、規格化、大量生産が容易なことが大きな利点である。

核酸医薬には、2本鎖DNAで転写因子を阻害するデコイ、タンパク質をコードしたRNAと相補的な配列の核酸を用いるアンチセンス、抗体のように標的に対して特異的な結合活性を示す核酸アプタマー(例 マクジェン®)、RNA干渉(RNA interference; RNAi)を利用するsmall(short) interfering RNA(siRNA)、ゲノム上にコードされているが蛋白質へは翻訳されないnon-coding RNAの1つであるmicroRNA(miRNA)などがある。中でもsiRNAやmiRNAに近年注目が集まっている。

RNAiとはRNA分解酵素(Argonauteタンパク質)と結合し、RNA induced silencing complex(RISC)と呼ばれる複合体を形成し、標的RNAの相同部分を切断、分解することによりターゲットの発現を抑制する現象のことである。この現象を線虫で発見したFireとMelloは2006年にノーベル賞を受賞している。本現象を利用して、人工的に2本鎖RNAを作製し、RNaseIIIの一種であるDicerという酵素によって切り出されてsiRNAと呼ばれる20-25塩基対の短い2本鎖のRNAが産生される。siRNAは、ターゲットmRNA配列に相補的に結合することによりmRNAを変性させることができる。siRNAとRNA induced silencing complexという複合体が再利用されながら相補的な配列を持つmRNAを酵素的に分解するので、アンチセンス核酸などより少量のsiRNAによって標的分子を選択的に抑制することが可能であり、分子標的薬としての特異性が高く、副作用が少ないことが利点である。また患者ごとの疾患原因遺伝子に応じた個別化治療が可能であり、複数の遺伝子が関与している病態に対し、複数のsiRNAを組み合わせることも可能である。

miRNAは内因性に存在する20-25塩基ほどの一本鎖のRNAで、他の遺伝子の発現を調節

する機能を有すると考えられているnon-coding RNAの一種である。ヒトでは約2000種類以上のmiRNAが知られている。miRNAを含むRNAが転写され、核内の酵素によってmiRNAはまず2本鎖のprimary miRNA (pri-miRNA)という前駆体となる。核外に出た後siRNA同様Dicerという酵素によって切断され、成熟したmiRNAとなる。miRNAは主に標的遺伝子の3'側の領域に結合し、発現、翻訳を抑制する。miRNAはsiRNAと異なり、標的となる配列を有する複数のmRNA配列に部分相補的に結合し、mRNAの遺伝子発現を同時に抑制する。

miRNAを標的とした治療には、疾患で発現が亢進しているmiRNAの機能を抑制する、

疾患で発現が低下したmiRNAを補充するといった二つの治療戦略がある。この場合、miRNAのアゴニスト作用を持つ核酸を投与する(アゴニスティック核酸)。一方miRNAの補充療法(miRNA replacement therapy)は、減少したmiRNAを投与することにより発現を回復させる方法である。

このような核酸医薬を様々な角膜疾患に投与することを考えた場合、点眼がもっとも適している形態であると考えられる。しかし核酸医薬の一つの問題点に低い組織移行性が上げられる。また2本鎖RNAではToll-like receptor (TLR)を介した自然免疫応答による炎症発症も懸念事項の一つである。

2. 研究の目的

そこで本研究では、核酸医薬点眼による角膜透明性維持、角膜癒痕、血管新生に対する効果を検討し、本邦発の核酸点眼薬実現化に向けた検討を行うことを目的とする。ターゲット分子はangiopoietin like protein 2 (Angpt12)とマイクロRNA29b (miR29b)とした。

Angpt12は様々な炎症性疾患において、中心的な役割を果たす分子として近年注目を浴びており、眼疾患においてもブドウ膜炎、また我々も過去に角膜血管新生・リンパ管新生において、重要な因子として報告している(Toyono T, Usui T et al Invest Ophthalmol Vis Sci 2013)。本分子に対する1本鎖RNA製剤(pshRNA)の角膜血管新生に対する効果を検討した。

miR29は組織の線維化や血管新生を制御するmiRとして知られている。そこでmiRに関しては、angpt12と同様、1本鎖のmiR29b mimicsを合成して、それを点眼することによる角膜血管新生に対するmiR-29b補充療法の検討を行った。

3. 研究の方法

Angpt12を抑制するRNA干渉(RNAi)製剤の配列決定の為に、3種類のAngpt12 siRNAを合成し、in vitroで発現抑制効果を検討した。その中で最も抑制効果の高かった配列に

対し、1本鎖RNAであるAngpt12 pshRNAを合成した。本核酸製剤に蛍光色素を標識し、脂質ナノ粒子(lipid nanoparticle; LNP)に包埋し(Li-Angpt12 psh)、マウス角膜に点眼し、核酸製剤の点眼によるドラッグデリバリーを検討した。

さらにマウスアルカリ外傷における血管新生抑制効果について観察した。マウス角膜に麻酔下で0.1Nの水酸化ナトリウムを点眼することにより角膜血管新生、リンパ管新生を誘導した。この過程において、1日1回Li-Angpt12 pshを点眼した。コントロールにはリン酸バッファーを用いた。ドラッグデリバリーは蛍光標識の確認にて行った。

アルカリ外傷誘導後、眼球を摘出し、新生血管の定量のため、血管内皮特異的マーカーであるCD31の免疫染色を角膜のホールマウントで行い、核酸医薬点眼の血管新生抑制効果を検討した。染色後実体蛍光顕微鏡を用いて血管新生領域部分を撮影し、NIH imageを用いて角膜血管新生領域を算出した。また角膜を摘出し、mRNAを抽出し、Angpt12に対するリアルタイムPCRを行った。

miR29bにおいては、まずmiR29の重要なターゲットであるTGF-betaに対する抑制効果をいくつかのmiR29b mimicsを合成してin vitroで検討した。TGF-betaに対する抑制効果が最も高かった配列に対して同様にLNPで包埋した製剤を合成し、アルカリ外傷モデルを用いて、点眼で角膜血管新生に対する効果を検討した。

4. 研究成果

Angpt12-pshのみを点眼してもマウス角膜の角膜最表層にしか分布しなかったが、LNPに包埋したLi-Angpt12 pshを点眼すると、角膜深層まで薬物が到達することが観察された。また角膜上皮、実質ともにAngpt12の発現が抑制されることをPCRで確認した。本製剤はWST-1アッセイにおいて、ほとんど細胞毒性を示さないことも併せて確認した。

次にアルカリ外傷モデルにおいて、Li-Angpt12 pshを1日1回点眼した角膜では、Angpt12 mRNAがコントロール群と比較して顕著に抑制された。処置後10日目に角膜を摘出したところ、角膜癒痕や血管新生を有意に抑制していた。

miR29bの点眼においても同様に、アルカリ外傷モデルにおいて、角膜血管新生や癒痕形成が有意に抑制されることがわかった。

本研究で用いたRNA製剤の自然免疫惹起作用についてもin vitroで検討を行った。TLR3によって誘導されるIFN-gamma、TLR7によって誘導されるIFN-alphaの発現上昇は、これら1本鎖RNA製剤によって惹起されなかった。

このように様々なドラッグデリバリー技術を駆使し、組織移行性のよい核酸製剤の開発ならびに、免疫応答の生じにくいプラットフォーム

フォームの検討を重ねることによって、核酸医薬であっても点眼により、マウス角膜化学外傷モデルにおいて、角膜の透明性を脅かす血管新生を抑制する治療効果を持つことが示された。本製剤は角膜化学外傷をはじめとした、炎症性角膜血管新生を来す疾患に対する新たな治療薬として有効である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Taketani Y, Usui T, Toyono T, Shima N, Yokoo S, Kimakura M, Yamagami S, Ohno S, Onodera R, Tahara K, Takeuchi H, Kuroda M. Topical use of Angiopoietin-like protein 2 RNAi-loaded lipid nanoparticles suppresses corneal neovascularization. *Mol Ther Nucleic Acids* 5 e292, 2016
2. 臼井智彦 角膜の透明性を守る為に 日眼会誌 120:246-263, 2016

〔学会発表〕(計3件)

1. 竹溪友佳子、臼井智彦、神川あずさ、豊野哲也、島伸行、横尾誠一、山上聡、小野寺理彩子、田原耕平、大野慎一郎、竹内洋文、黒田雅彦 MicroRNA-29b による角膜血管新生、線維化抑制効果の検討 第120回日本眼科学会 2016年4月8日(仙台国際センター、仙台市、宮城県)
2. 臼井智彦 核酸医薬を用いた角膜疾患治療 第120回日本眼科学会シンポジウム 次世代を担う新しい角膜治療 2016年4月7日(仙台国際センター、仙台市、宮城県)
3. 竹溪友佳子、臼井智彦、豊野哲也、神川あずさ、木枕光木子、島伸行、横尾誠一、山上聡、竹内洋文、黒田雅彦 Angpt12 RNAi 点眼による角膜血管新生抑制 角膜カンファランス 2016 2016年2月19日(軽井沢プリンスホテル、軽井沢、長野県)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：眼疾患治療剤

発明者：臼井智彦、黒田雅彦、高梨正勝、大野慎一郎、豊福秀一、田原耕平、小野寺理沙子、竹内洋文

権利者：同上

種類：特許

番号：51600814428

出願年月日：2016年4月15日

国内外の別：国際出願

取得状況(計0件)

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

臼井 智彦 (USUI TOMOHIKO)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80282557

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：