

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670754

研究課題名(和文)人工HDL/光応答性ナノ材料を用いた加齢黄斑症の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Potential therapy with artificial HDL and photoresponsive nanomaterial for Age-related maculopathy

研究代表者

後藤 謙元 (GOTOH, Norimoto)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20632095

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)：(1)ヒト脈絡膜新生血管のRNA Seq 解析およびバイオインフォマティクス解析の実施した。VEGFAの発現が各検体間で400倍程度の発現量のばらつきがあった。VEGFAは抗VEGF療法の主要なターゲットであるが、抗VEGF療法に抵抗する症例については光力学療法の検討が必要なが示唆された。(2)人工HDLの点眼による後眼部薬物デリバリーの有効性を示した。(3)血清および前房水中のHDL コレステロール引き抜き能の評価系を確立した。

研究成果の概要(英文)：(1) Establishing RNA expression profile of human choroidal neovascularization samples using next generation sequencing. (2) Developing novel transcorneal drug delivery system of artificial HDL delivery into the mouse retina. (3) Establishing modified method for evaluating HDL cholesterol efflux with small clinical samples.

研究分野：眼科学

キーワード：眼科学 加齢黄斑変性 HDL 遺伝子発現 ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性において顕著な視力低下をもたらす病変は脈絡膜新生血管板 (CNV) である。ところが患者の本病変においてどのような遺伝子が発現しているのか、ほとんど何も分かっていなかった。滲出型加齢黄斑変性への第一選択薬は抗 VEGF 薬であるが、その標的である VEGF ファミリーの遺伝子発現の定量さえ行われていない。過去四半世紀あまり、血管新生の基礎研究は医学研究の最重要課題でありつづけてきた。CNV については世界中で数多くの培養細胞、動物モデルでのメカニズムが報告されてきたが、臨床応用する段階になるとヒト病変でどの遺伝子が発現しているか分からないことが常に障害になってきた。

加齢黄斑変性の治療の変遷として、1990年代後半に黄斑下手術による CNV の物理的な除去が行われた。この観血的な手技は侵襲が強く効果も限定的であったため、光線力学療法、抗 VEGF 抗体薬にとって代わられた。助成者は平成 9 年から 11 年にかけて行われた脈絡膜新生血管除去術 6 例の病理検体が京都大学眼科に保存されていることに着目し、近年発達した次世代シーケンズ技術を応用して網羅的に遺伝子発現を検討することで、病変の病態解明を行うとともにゲノム編集の対象とする遺伝子標的の探索を行った。

また現在抗 VEGF 薬が市場を席巻しているが、7 年予後は 2/3 の患者が視力低下をきたすこと、頻回の硝子体注射は感染の危険を含む患者の負担が見逃せないことがあり、特にドラッグデリバリーシステム (DDS) についてより効率的で侵襲の少ない方法が求められてきた。研究分担者は生体ナノ材料である cpHDL が新たな加齢黄斑変性に対する DDS として有効であるか検討を行った。

最後に CNV 発生による大幅な視力低下の前段階として加齢黄斑症の時期があり、泡沫化したマクロファージを特徴とするドルーゼンの沈着をもって定義されている。近年 HDL コレステロール引き抜き能と心血管イベントの正の相関について報告が増加していることを鑑み、近年マウスモデルを根拠に引き抜き能の低下が AMD 発症に寄与するという報告もある (Sene et al. Cell Metab.2013;17:549-561.)。しかしヒト患者検体で評価した報告は知る限りない。長い AMD 研究および網膜の老化研究の中で、脂質の寄与が議論されてきたことを鑑み、眼科領域では全く評価されたことがない HDL コレステロール引き抜き能を評価することにした。

2. 研究の目的

加齢黄斑症の加療につながる新規生体情報につき、学際的なアプローチにより明らかにする。

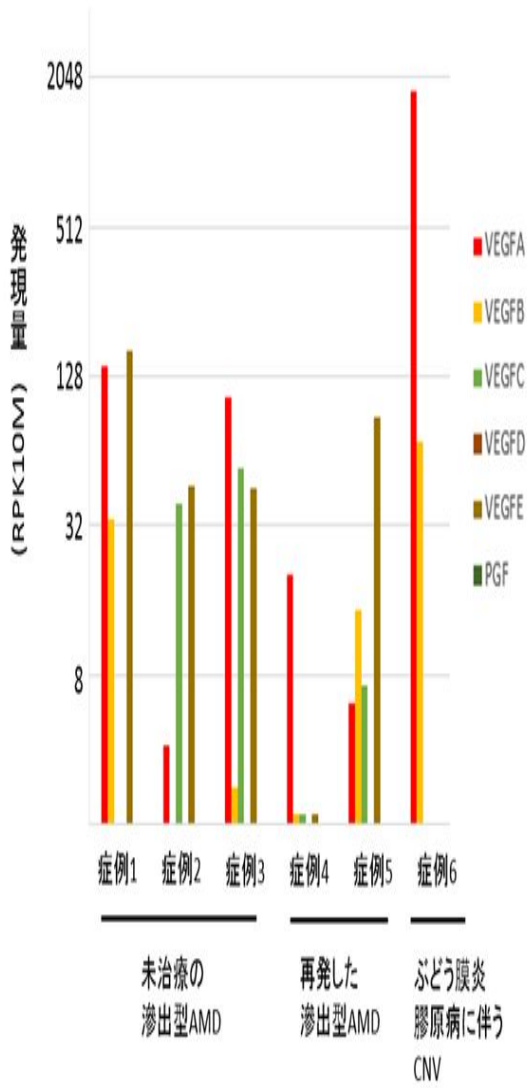
3. 研究の方法と結果

(1) ヒト患者の加齢黄斑変性症病変の遺伝子発現プロファイル作成

平成 9 年から 11 年にかけて CNV に対して黄斑下手術を受けた 6 人 6 眼 (うち未治療 AMD3 例、光凝固および放射線治療をした AMD2 例、ぶどう膜炎に伴う CNV1 例)。抜去直後から 4%PFA 固定を 24 時間行い OCT に包埋後、実験まで -80 で保管された。クライオトームにて 10um 厚で薄切し、それぞれ 10 切片から RNA を抽出、DNaseI 処理も同時に行った。OvationRNA-Seq FFPE System (Nugen) を用いライブラリー作成をした。Bioanalyzer Pico kit (HP) によりライブラリーの QC 後、TruSeqNano DNA LT Sample Prep Kit (Illumina) にて処理をし、HiSeq2500 (Illumina) の 1 レーンを使った解析を実施した。Raw read のフィルタリング、マッピング、RNA の発現レベルのノーマライゼーションを行った。発現レベルは RPK10M を用いた。網膜の遺伝子発現、網膜色素上皮 (RPE) の遺伝子発現は既報のデータを得て順位付けをした上でクラスター分析を行った。

6.1 ± 0.4 ギガ塩基 / 検体の情報を得た。11,216 遺伝子 (全遺伝子の 43%) の発現が 6 例のうちいずれかでみとめられた。網膜、網膜色素上皮の遺伝子発現プロファイルと比較すると CXCL4 など 19 遺伝子が CNV に多く発現していることが分かった。クラスター分析によると、CNV の遺伝子発現は網膜、網膜色素上皮とは異なるクラスターを形成し、また CNV 間の距離は未治療 AMD が自覚症状の長さの順に並び、再発例とは異なった小クラスターを形成した。

現在滲出型 AMD に対する第一選択薬は抗 VEGF 抗体薬である。VEGFA のみを標的とするラニズマブと、VEGFA、VEGFB、PGF を標的とするアフリベルセプトの両者が市場を占めている。臨床的な興味として、両者の優劣、また抗 VEGF 抗体薬が効かない症例があることが言われているため、VEGF ファミリーの遺伝子発現を検討した (図)。



症例2と症例6のVEGFAの遺伝子発現量は、400倍以上という極めて大きな差がみとめられた。症例2、症例5では、CNV進展におけるVEGFAの寄与は小さい可能性が高い。一方、VEGFBは、症例1、症例5、症例6で発現がみとめられた。VEGFCに対しては現在新抗体薬の治験が行われているが、従来の抗体薬で効かない症例に効果がある可能性が、症例2、症例3からは想像される。現状では、抗VEGF抗体薬への反応が乏しい症例に対しては、すみやかに光線力学療法を追加を検討する方向性が示唆されている可能性がある。

最後に網羅的な遺伝子発現プロファイルについて、GO解析を行った。AMDでは凝固系に関わる遺伝子群と化学走性に関わる遺伝子群が濃縮された。一方、ぶどう膜炎・膠原病に伴うCNVでは、組織融解に関わる遺伝子群が濃縮された。これらは臨床的所見の見地からは妥当な結果と考えられた。

(2) 高密度リポタンパク質の点眼による後眼部薬物デリバリー

生体ナノ材料である細胞膜透過ペプチド融合HDL(cpHDL)に着目し、マウス後眼部への

新規ドラッグデリバリーシステム(DDS)の構築をはかった。蛍光物質を載せたcpHDLが硝子体注射でも点眼でも後眼部へ移行し、従来報告のあるリポソームと同等以上の移行することを、研究分担者はあきらかにした。以下、詳細に述べる。

前述したように、現在の加齢黄斑変性症治療では、非常に高価な抗体医薬を数ヶ月おきに医師が患者の硝子体内に投与しなければならず、患者の金銭的負担および眼球内感染症リスクを伴う。点眼は患者自身が行うことのできる治療法であるが、治療薬物単独では後眼部へ十分な量が到達しないため、研究はほとんど行われてこなかった。現時点で加齢黄斑変性症の点眼治療法は存在しないが、実験室レベルでは、最近、100 nmのリポソーム(リン脂質二重膜の中空ナノ粒子)を点眼すると、内包された蛍光色素が後眼部へ移行することが報告された。この報告は、ナノ粒子の点眼利用の有用性を実証した初めての例である。その後、同グループはリポソーム表面を陽電荷高分子で被覆すると、その蛍光色素の後眼部への輸送効率が向上することも報告している。しかしながら、このリポソームに治療薬物を内包して薬効が増強するかどうかは未だ報告されていない。

HDLは、血管内で余剰脂質の回収・肝輸送を担う生体ナノ材料である。研究分担者は、HDLを試験管内で組換えapolipoprotein A-Iとリン脂質から作製し、様々な疾患に対するDDSの開発に取り組んできた。そしてこのHDLに遺伝子改変技術を適用し、様々な生理活性ペプチドを融合したHDLを作製し、DDSにおけるその有用性を世界に先駆けて実証してきた。HDLの特徴として、10 nmというサイズの小ささが挙げられる。これは上記のリポソームの1/10の大きさであり、抗体のサイズと同等である。一方、HDLのリン脂質二重膜部分にはリポソーム同様、薬物を内包させることができる。本研究では、遺伝子改変したHDL(cpHDL)を加齢黄斑変性症のためのDDSとして利用することを試みた。

点眼された物質は、まず角膜上皮細胞を含む眼球表面から吸収され、強膜内を移行して後眼部へ到達する。上記の通り、薬物輸送担体が陽電荷を帯びると、負電荷を帯びる角膜細胞膜と相互作用し、眼球表面滞留性・吸収性が向上する。また薬物輸送担体の強膜内移行性はそのサイズに依存し、少なくとも100 nm以下が良く、さらに20 nm程度が良いとする報告もある。研究分担者は、cpHDLが中性pHで野生型HDLに比べて陽電荷を帯びること、そのサイズは野生型HDLと同じく10 nm程度であることを確認している。一方、cpHDLは野生型HDLに比べて、非常に効率良くHDL受容体非依存的に細胞内に取り込まれる。従ってcpHDLの性質は、点眼による後眼部への薬

物輸送に求められる条件とよく一致している。具体的には、cpHDL は眼表面組織からその細胞膜透過ペプチドの作用により効率良く吸収され、その後そのサイズの小ささにより強膜内を移行し、後眼部へ内包した薬物を輸送できると期待される。

加齢黄斑変性症患者の後眼部では、異常な血管新生が見られる。そこでこの変異型 HDL に血管新生阻害薬(pazopanib)を内包して、後眼部血管新生誘導マウスに点眼すると、薬剤単独に比べて顕著に新生血管量が低下することがわかった(特許出願済み、未公開)。HDL は蛋白質と脂質の複合ナノ粒子であることから、様々な機能化方法が存在し、構造・機能の精密な改変が可能である。従って今後作製される様々な改変型 HDL の中から、加齢黄斑変性症のための真に実用的な DDS を開発できる可能性が極めて高いと考えられる。

治療薬物を内包していない cpHDL を後眼部血管新生誘導マウスに点眼しても、新生血管量が低下するという興味深いデータを得ている。このことは cpHDL 自身にも何らかの治療効果があることを示唆しているのかもしれない。予想されるメカニズムとして、cpHDL が血中同様、眼内でも脂質代謝に介入する可能性が考えられる。最近、眼内脂質代謝に関与する HDL 様物質の存在が報告されている。従って、今回得られた結果は、cpHDL が眼内脂質代謝研究を進めるための良い研究ツールにもなる可能性を示唆するものである。

(3) HDL によるコレステロール引き抜き測定をするための最適化

HDL の分離については、コレステロール引き抜き能測定の標準法である超遠心分離法を検討した。超遠心機として Optima MAX-XP (Beckman Coulter)、ローターとして TLA110 (Beckman Coulter)を用いた。重水、スクロースを用いた密度勾配超遠心分離法を採用した。重水に 140mM NaCl, 10mM Hepes pH7.2, 10uM EDTA, 10uM Butylated Hydroxytoluene (BHT) を添加することは既報にならった 5)。HDL 分画は 1.063-1.210 の比重をもつものとして分離した。引き抜き能の測定については、単球の培養細胞系である HTP-1 細胞をフォルボールエステルによりマクロファージに分化させ、蛍光標識をしたコレステロールを貪食させたのち、分離済みの患者由来 HDL と共培養した。上清と細胞にみられる蛍光をプレートリーダーで定量し比較することで引き抜き能を決定した。

血清分離をおこなった検体が HDL が十分濃縮されているかについて、HPLC によるリポ蛋白質分画の評価 (LipoSearch、スカイライト・バイオテック社)により評価した。HDL が濃縮しており、LDL は検出限界以下であっ

た。

同一検体から HDL を用いてコレステロール引き抜き能を 6 回検討したが、ばらつきは 3.4%(SEM)であった。これは過去その他領域での報告に遜色ないものであった。

4 . 研究成果

加齢黄斑変性病変の網羅的遺伝子発現について初めて明らかにした。血管新生は医学研究の最重要課題でありつづけてきたが、患者病変部位の遺伝子発現が不明であることが常に臨床応用の障害になってきた。今回の結果は、新薬開発、既存の薬剤の適応拡大 (drug repositioning / drug repurposing) の根拠をあたえる。また、RNA-Seq では配列解読をしているため、発現がある遺伝子については cSNP の情報がえられる。VEGF ファミリーの CNV における発現を決めている多型を明らかにすることで、網脈絡膜疾患の Precision Medicine に貢献する手がかりがえられた。

生体ナノ材料である細胞膜透過ペプチド融合 HDL (cpHDL) の利用については特許出願に至った。

また HDL コレステロール引き抜き能については、眼科外来にて数十 ml の採血を患者に施行することは現実的ではなく、さらに眼液に含まれる HDL の評価への応用も踏まえると、すべてを縮小した系が必要であった。主に循環器領域で行われている測定方法の応用に時間を要したが、ばらつきの少ない測定方法を確立することができた。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

後藤謙元、脈絡膜新生血管除去検体の網羅的遺伝子発現解析、第 69 回日本臨床眼科学会総会、2015 年 10 月 23 日、名古屋

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：高密度リポタンパク質およびその細胞親和性ペプチドを融合した高密度リポタンパク質の点眼による後眼部薬物デリバリー
発明者：須田謙史、村上達也、吉村長久、後藤謙元

種類：特許出願

番号：特願 2014-211633

出願年月日：2014 年 10 月 16 日

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 謙元 (GOTOH, Norimoto)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・

准教授

研究者番号： 2 0 6 3 2 0 9 5

(2)研究分担者

村上 達也 (MURAKAMI, Tatsuya)
京都大学・学内共同利用施設等・准教授
研究者番号： 9 0 4 1 0 7 3 7

小谷 和彦 (KOTANI, Kazuhiko)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号： 6 0 3 3 5 5 1 0

辻川 明孝 (TSUJIKAWA, Akitaka)
香川大学・医学部・教授
研究者番号： 4 0 4 0 2 8 4 6