

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670757

研究課題名(和文)ペリオスチンを標的とした増殖性網膜硝子体疾患に対する革新的人工抗体の創製

研究課題名(英文)Development of novel antibody targeting periostin for the treatment of proliferative vitreoretinal diseases

研究代表者

吉田 茂生 (Yoshida, Shigeo)

九州大学・医学(系)研究科(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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：高分子ナノ粒子ライブラリーを合成し、細胞増殖アッセイを用いてナノ粒子ライブラリーを種々の濃度で混合し、ペリオスチン誘導性増殖に対する抑制効果をスクリーニングした。カチオン系粒子の増殖抑制効果が強いことが明らかとなった。さらに新しいライブラリーを設計し、2次スクリーニングを行った。Cation1-4, Cation1-5, Cation1-6が濃度依存的に増殖抑制効果を示した。このうち、Cation1-4は網脈絡膜血管新生モデルで抑制効果を示した。

研究成果の概要(英文)：We synthesized polymer nanoparticle libraries and performed screening to extract those polymer particles to inhibit periostin-dependent cell proliferation using in vitro cell proliferation assays. At the 2nd screening, we could extract Cation1-4, Cation1-5, Cation1-6 which inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner. Among these polymer nanoparticles, Cation1-4 exhibited the significant inhibition of retinal and choroidal proliferation in vivo.

研究分野：眼科学

キーワード：プラスチック抗体 網膜血管新生 脈絡膜血管新生

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)や高度近視等の増殖性網膜硝子体疾患である。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。

これらの増殖性網膜硝子体疾患においては、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抗体の硝子体内半減期は僅か数日しかないので、高価な硝子体注射を数週間毎に繰返し行う必要があり、その薬効は限定的である。したがって、増殖組織の病因に基づいた安価で持続期間の長い新しい分子標的薬の創製が期待される。

2. 研究の目的

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。これまでに、増殖性網膜硝子体疾患の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(BJO 2010;PLoS One 2013)。ペリオスチンは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 α -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 2013)。さらに、ペリオスチン阻害によりTGF- β 2あるいは患者硝子体依存性の細胞接着と遊走が抑制された。In vivoでは、ペリオスチン阻害によりPVRの進行や網脈絡膜線維(血管)増殖が抑制された。以上よりペリオスチンは増殖性網膜硝子体疾患治療の分子標的になると考えられた(FASEB J 2013)。

一方、分担研究者の星野らは最近、生体内の蛋白を認識し、その機能を中和する革新的ナノ粒子“プラスチック抗体”の開発に成功した。

そこで本研究では、硝子体内で長期間にわたり滞留する抗ペリオスチンプラスチック抗体を最適化し、一度の硝子体注射で長期間薬効が持続する眼内増殖抑制療法を実現する事を目的とする。ペリオスチンの網膜での発現レベルは低く、ペリオスチンを標的とした分子標的薬を創製できれば、正常網膜にほとんど障害を与えることなく、増殖組織のみを消退させる薬剤となることが期待される。

3. 研究の方法

ペリオスチン標的プラスチック抗体の調製

hrPE(ヒト網膜色素上皮)を用いて、ペリオスチンによる増殖促進を抑制するプラスチック抗体をスクリーニングで同定した。

1. hrPEを96 well plateに3,000 cells/wellで播種した。(0% FBS/DMEMでstarvation開始)

2. 播種から24時間培養後、rh-Periostin 100ng/mLとプラスチック抗体を各濃度で加えた。抗体濃度は原液1.8 mg/mLをDMEMで100倍希釈(18 μ g/mL)したものを最高濃度とし、96 well plateに添加時に18, 6, 1.8, 0.6, 0.18 μ g/mLとなるようにして希釈系列を作成した。

3. 24時間培養後、BrdU 10 μ Mで細胞を2時

間標識した。

4. ELISA アッセイで細胞に取り込まれた BrdU を検出した。

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プラスチック抗体の動態と増殖抑制効果、安全性の検証

最適化を行ったペリオスチンプラスチック抗体の薬効を、既に確立しているマウス網膜血管新生モデルおよび脈絡膜血管新生モデルにて評価した。

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た。高酸素負荷直後にペリオスチンプラスチック抗体を硝子体腔に注射した。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。その後組織学的、電気生理学的にも安全性を評価した。

次に、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、ペリオスチンプラスチック抗体を硝子体注射した。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、治療効果を判定した。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した。

4 . 研究成果

アニオン性高分子ライブラリー 23 種、カチオン性高分子ライブラリー 32 種の計 55 種のプラスチック抗体ライブラリー (第一世代) をスクリーニングした。スクリーニングの結果、プラスチック抗体濃度依存的にペリオスチン誘導性細胞増殖効果抑制の傾向が見られたカチオン性の抗体 5 種類を同定し、そのうちの 3 種類について、組成を細かく振り分けた拡張ライブラリー (第二世代 : Cation1-1-6, Cation22-1-5, Cation24-1-8 の 19 種類) を作製し、再度増殖アッセイに

よるスクリーニングを行った。

このうち Cation1-4, 1-5, 1-6 が 10 μ g/mL, 5 μ g/mL, 2.5 μ g/mL で濃度依存的に抑制効果を示した。

そこで、網膜血管新生モデルや脈絡膜血管新生モデルにおける Cation1-4, 1-5, 1-6 の増殖抑制効果を検討した。Cation1-6 は 5 μ g/mL で網膜血管新生モデル・脈絡膜血管新生モデルいずれにおいても有意に抑制した ($p < 0.05$)。Cation1-4, 1-5 の増殖抑制効果は有意ではなかった。コントロールと比べ、Cation1-4, 1-5, 1-6 投与眼で ERG の振幅の減弱を認めなかった。

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 . Nakama T, Yoshida S, Ishikawa K, Kobayashi Y, Zhou Y, Nakao S, Sassa Y, Oshima Y, Takao K, Yoshikawa K, Shimahara A, Hamasaki T, Ohgi T, Hayashi H, Matsuda A, Kudo A, Nozaki M, Ogura Y, Kuroda M, Ishibashi T. Inhibition of choroidal fibrovascular membrane formation by new class of RNA interference therapeutic agent targeting periostin. Gene Therapy 2015;49:127-37. 査読有
- 2 . Zhou Y, Yoshida S, Nakao S, Kobayashi Y, Nakama T, Kubo Y, Miyawaki K, Yamaguchi M, Ishikawa K, Oshima Y, Akashi K, Ishibashi T. M2 macrophages enhance pathological neovascularization in the mouse model of oxygen-induced retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2015;56:4767-4777. 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

1. 吉田 茂生 . 網膜血管新生とマクロファージ, 第 119 回日本眼科学会, 2015.04.18.札幌
2. Shigeo Yoshida, Novel molecular-targeted therapies for intraocular proliferation. 7th Chinese Congress of Research in Vision and Ophthalmology, 2015.08.14.Shenyang
3. 吉田 茂生, 眼内血管新生におけるマトリセルラー蛋白の役割, Retina Research Forum, 2015.10.04. 東京

〔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
<http://www.eye.med.kyushu-u.ac.jp/>

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

石橋 達朗 (ISHIBASHI TATSURO)
九州大学・大学病院・病院長
研究者番号：30150428

(3)連携研究者

星野 友 (HOSHINO YU)
九州大学・工学研究院・准教授
研究者番号：40554689