

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293374

研究課題名(和文) 増殖組織特徴的遺伝子を標的とした革新的眼内増殖抑制治療戦略の体系的構築

研究課題名(英文) Development of novel comprehensive molecular therapies for intraocular proliferative diseases targeting periretinal fibrovascular membranes

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) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：後天視覚障害の上位を占める糖尿病網膜症、加齢黄斑変性などの増殖性疾患においては、網膜の上下に生じる線維(血管)増殖組織が主要病態である。我々は、増殖組織の進展に関する遺伝子レベルの知見を蓄え、新しい分子標的療法を開発する目的で、ゲノムワイド遺伝子発現解析を行い、約100の増殖組織特徴的遺伝子群の抽出に成功した。

本研究では、増殖組織特徴的遺伝子群のうち、マトリセルラー蛋白であるペリオスチとテネイシンCを標的とした革新的一本鎖RNAによる分子標的薬を作成し、In vitro、In vivoモデル系で網膜上下の線維血管増殖に対する抑制効果を確認した。両分子標的薬は臨床で使用可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In intraocular proliferative diseases such as diabetic retinopathy (DR) and age-related macular degeneration (AMD), fibro (vascular) membrane (FVM) formation above and beneath the retina plays a pivotal role in the primary pathology. We have succeeded in extracting approximately 100 highly expressed genes in FVMs associated with PDR, which included periostin and tenascin-C, a matricellular protein.

We showed that the expression of periostin and tenascin-C was increased in the retinas of a mouse model of oxygen-induced retinal neovascularization (NV) and in choroidal NV. A new class of RNA interference (RNAi) agent that targets periostin and tenascin-C had a significant inhibitory effect on the retinal NV, CNV and choroidal fibrosis than control RNAi with no apparent adverse effects. These findings suggest a causal relationship between these matricellular proteins and intraocular FVM formation, and a potential therapeutic role of the new intravitreal RNAi agents for DR and AMD.

研究分野：眼科学

キーワード：糖尿病網膜症 加齢黄斑変性 ペリオスチン テネイシンC 眼内増殖 分子標的薬 核酸医薬

1. 研究開始当初の背景

眼内細胞増殖は後天視覚障害の上位を占める糖尿病網膜症(DR)、加齢黄斑変性(AMD)や増殖硝子体網膜症(PVR)などで観察される。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。

DRは、全国で年間3,000人以上が失明する視覚障害原因の第2位であり、眼科医療の中で最も重要な疾患の一つとなっている。またAMDも高齢化社会の進展により増加の一途をたどっており、視覚障害原因の第4位であり、DR同様最も重要な眼科疾患の一つとなっている。今後もDR、AMDの患者数は増加するとされており、よりよい治療法の確立が社会的急務である。

DRは大きく非増殖と増殖網膜症に分類される。増殖糖尿病網膜症(PDR)では血管成分(病的血管新生)と線維成分(線維組織形成)を含む線維血管増殖組織(以下PDR増殖組織)が網膜面上に出現し、その収縮による牽引性網膜剥離が視力低下の原因となる。日本人に多い滲出型AMDでは網膜下に線維血管増殖組織が生じ、視機能が障害される。さらに、PDR、AMDと同様の増殖組織形成は、手術侵襲に伴う術後眼内細胞増殖によるPVRでも認められ、その分子機序は殆ど不明である。治療は光凝固術や硝子体手術が行われているが、視機能を維持できない症例も多い。増殖組織の形態学的観察では、網膜グリア細胞・筋線維芽細胞・網膜色素上皮細胞(RPE)・新生血管内皮細胞等が認められる。このうち増殖組織収縮に伴う牽引性網膜剥離に病態の主体となるのはRPE由来であるとされる。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、その薬効は限定的であり、二次性の線維性変化による牽引性網膜剥離を増悪させる場合もある。したがって、増殖組織の病因に基づいた新しい分子標的薬の創製が期待される。

2003年にヒトの全遺伝情報が明らかになり、ゲノムの構造、転写産物の配列や機能の情報が加速度的に蓄積された。その結果、特定の組織中の遺伝子発現を包括的に把握することが容易になった。この時代的背景をふまえて、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中心としたプロジェクトを世界で初めて開始した。

ゲノムワイド遺伝子発現解析は、注意深く行う必要があるため、まず当施設でのIlluminaマイクロアレイシステムの最適化を行い、高い再現性があると結論づけた(Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010; Lab Invest, 2011)。次に、極小検体である増殖組織からのRNA抽出の条件を最適化し、EST

解析用のパイプラインを構築した。その後、増殖組織と網膜由来のRNAを用いて約4万遺伝子のマイクロアレイ解析を行い、正常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存在することを初めて見出した。

また、PVR由来増殖組織と増殖のより緩やかな続発黄斑上膜を用いてEST解析を行い、続発黄斑上膜と比較してPVR由来増殖組織で高発現の細胞接着や増殖に関与する遺伝子群を見出した(Br J Ophthalmol, 2010; PLoS One, 2013)。これら2つのゲノムワイド遺伝子解析で共に高発現を示したペリオスチンは、増殖組織で特異的に発現し、その活動性を促進すると考えられた。そこで、ペリオスチンを第一の標的として、増殖組織形成への関与を検証した(Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011 & 2008)。ペリオスチンは組織修復に関与するマトリセルラー蛋白で、PDR・PVRいずれにおいても患者硝子体で高値を示し、病期と正の相関を示した。また、正常網膜には発現せず、PDR・PVR増殖組織の α -smooth muscle actin (α -SMA)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や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眼内増殖抑制治療の分子標的になると考えられた(FASEB J, 2013)。

2. 研究の目的

これまでの研究成果は、増殖組織のゲノムワイド遺伝子発現解析が真に患者様に役立つ新しい分子標的薬創製に極めて有用であることを示唆している。そこで、抽出増殖組織特徴的遺伝子群のうち、炎症や癌で特異的に誘導されるペリオスチンとテネイシンCに着目し、日本独自の技術である一本鎖RNAをプラットフォームとしてペリオスチン・テネイシンC標的一本鎖核酸(nkRNA)を創製し、臨床で用いる薬剤となり得るか否かについて検討した。

3. 研究の方法

1)黄斑円孔、黄斑上膜、PDR患者の硝子体手術の際に硝子体サンプルを採取した。ELISA法により硝子体中のテネイシンC、ペリオスチンとVEGFを定量した。また、手術中に採取した増殖組織を用いてテネイシンC、ペリオスチン、SMA、CD34、CD31、GFAP、integrin α Vの免疫染色を行った。

2)培養ヒト血管平滑筋細胞(VSMC)を低酸素暴露後、テネイシンC遺伝子発現を定量した。また培養ヒト網膜血管内皮細胞(HREC)を用

いて、テネイン C、ペリオスチン蛋白の増殖、遊走、管腔形成への効果を検討した。さらに、ペリオスチン・テネイン C 標一本鎖核酸の細胞増殖能、遊走能、接着能、管腔形成の抑制効果の定量を行った。

3) マウス酸素負荷網膜血管新生(OIR)モデルやレーザー誘導脈絡膜血管新生モデルを用いてペリオスチン・テネイン C 標一本鎖核酸の安全性と抑制効果を検討した。

4. 研究成果

1) PDR 硝子体中ペリオスチン・テネイン C 濃度と相関を検討した。PDR 硝子体ではコントロールと比較して、疾患責任分子であるペリオスチン・テネイン C 濃度が有意に高値であった ($p < 0.01$)。ペリオスチンとテネイン C の硝子体中濃度は有意に相関した ($p < 0.01$, $r = 0.439$) が、VEGF とテネイン C は相関がなかった ($p < 0.05$, $r = 0.181$)。増殖組織を伴う PDR では、増殖組織のない PDR に比し有意にペリオスチン・テネイン C 濃度が高値であった ($P < 0.05$)。増殖組織の免疫染色では、ペリオスチン・テネイン C は SMA および CD34 陽性細胞上の integrin V と共染色を認めた。

2) マウス OIR モデルにおいて、ペリオスチン・テネイン C の網膜血管新生への役割について検討した。ペリオスチン・テネイン C は虚血網膜内の SMA 陽性細胞や網膜上新生血管中の SMA および CD31 陽性細胞と共染された。培養 VSMC の低酸素暴露後 3 時間でテネイン C 遺伝子の発現は有意に高値を示した ($P < 0.05$)。さらにペリオスチン・テネイン C は容量依存的に HREC の増殖、遊走、管腔形成を促進した。一方ペリオスチン・テネイン C 標一本鎖核酸は HREC の増殖、遊走、管腔形成を有意に抑制した。

ペリオスチン・テネイン C は虚血網膜中の血管平滑筋や網膜新生血管の周皮細胞から産生され、integrin V 受容体を介してパラクライン的に網膜血管新生を促進する可能性が示唆された。

3) テネイン C の脈絡膜新生血管形成への役割について検討した。加齢黄斑変性患者の脈絡膜新生血管膜とレーザー誘導マウス脈絡膜血管新生モデルを用いた蛍光免疫染色では、テネイン C は -SMA、パンサイトケラチン、CD31、CD34、インテグリン V と共染色した。同マウスモデルでは、レーザー照射後 3 日目でテネイン C の mRNA およびタンパクの発現上昇を認めた。In vitro では、テネイン C はヒト微小血管内皮細胞の増殖を促進し、接着を抑制した。さらに、テネイン C はヒト微小血管内皮細胞の増殖、接着、遊走、管腔形成をすべて促進した。これらの促進効果はインテグリン V 阻害剤であるシレンジタイドで阻害された。ヒト網膜色素上皮細胞は TGF- β 2 によりテネイン C を発現

し、ヒト網膜色素上皮細胞馴化培地はヒト微小血管内皮細胞の増殖、管腔形成を促進した。さらに、その促進効果は馴化培地にテネイン C siRNA を導入することで阻害された。テネイン C ノックアウトマウスやテネイン C siRNA を硝子体注射したマウスでは脈絡膜新生血管の体積は有意に減少した。これらの結果より、形質転換した網膜色素上皮細胞によりテネイン C は分泌され、インテグリン V を介して傍分泌様式で脈絡膜新生血管の発達に関与していると考えられる。従って、テネイン C は加齢黄斑変性の脈絡膜血管新生に対する治療標的となる可能性がある。

4) ペリオスチンを標的とし、RNA 干渉を用いてその発現を抑制する新規 1 本鎖核酸医薬 (NK0144) の脈絡膜増殖組織形成抑制効果を検討した。

In vitro のアッセイ系を脈絡膜増殖組織においてペリオスチンを産生している主な細胞と考えられる培養ヒト RPE 細胞を用いて行った。TGF- β 2 刺激によるペリオスチン発現増幅下で亢進する RPE 細胞の増殖、接着、遊走それぞれを NK0144 により抑制出来るかを検討した。NK0144 により RPE 細胞の増殖、接着、遊走がそれぞれ有意に抑制された。

In vivo ではマウスレーザー CNV モデルを用いて NK0144 の脈絡膜増殖組織に対する作用を検討した。CNV モデルではレーザーによる血管新生誘導後にペリオスチンの発現が増大し、レーザー後 14 日目で発現が最大となった。またその発現は蛍光免疫染色で RPE 細胞と共染することを確認した。ペリオスチンノックアウトマウスではレーザーにより誘導された初期の CNV、後期の脈絡膜線維組織ともに野生型に比べて減少しておりペリオスチンが脈絡膜増殖組織形成を促進していると考えられた。このモデルに FITC で標識した NK0144 を硝子体内投与したところ、投与後 24 時間から RPE 細胞への到達を認め、少なくとも 120 時間までは残存していることを確認した。また、NK0144 はこのモデルにおける RPE 細胞のペリオスチン発現を有意に抑制していることも確認した。

以上より、両分子標的薬は眼内増殖抑制薬として、臨床で使用可能であると考えられた。現在、産学官連携により、本薬剤の臨床応用を試みている

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 10 件)

1. Nakama T, Yoshida S, Ishikawa K, Kubo Y, Kobayashi Y, Zhou Y, Nakao S, Hisatomi T, Ikeda Y, Takao K, Yoshikawa K, Matsuda A, Ono J, Ohta S, Izuhara K, Kudo A, Sonoda KH, Ishibashi T: Therapeutic

effect of novel single-stranded rna agent targeting periostin in eyes with retinal neovascularization. *Mol Ther Nucleic Acids* 2017;6:279-289. 査読有

2. Zhou Y, Yoshida S, Kubo Y, Kobayashi Y, Nakama T, Yamaguchi M, Ishikawa K, Nakao S, Ikeda Y, Ishibashi T, Sonoda KH: Interleukin-12 inhibits pathological neovascularization in mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Sci Rep* 2016;6:28140. 査読有

3. Tachibana T, Yoshida S, Kubo Y, Koayashi Y, Nakama T, Ishikawa K, Nakao S, Izuhara K, Kono T, Ishibashi T: Reduced vitreal concentration of periostin after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 2016;94:e81-82. 査読有

4. Nakama T, Yoshida S, Ishikawa K, Kobayashi Y, Abe T, Kiyonari H, Shioi G, Katsuragi N, Ishibashi T, Morishita R, Taniyama Y: Different roles played by periostin splice variants in retinal neovascularization. *Exp Eye Res* 2016;153:133-140. 査読有

5. Kobayashi Y, Yoshida S, Zhou Y, Nakama T, Ishikawa K, Kubo Y, Arima M, Nakao S, Hisatomi T, Ikeda Y, Matsuda A, Sonoda KH, Ishibashi T: Tenascin-c secreted by transdifferentiated retinal pigment epithelial cells promotes choroidal neovascularization via integrin alphav. *Lab Invest* 2016;96:1178-1188. 査読有

6. Kobayashi Y, Yoshida S, Zhou Y, Nakama T, Ishikawa K, Arima M, Nakao S, Sassa Y, Takeda A, Hisatomi T, Ikeda Y, Matsuda A, Sonoda KH, Ishibashi T: Tenascin-c promotes angiogenesis in fibrovascular membranes in eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2016;22:436-445. 査読有

7. Zhou Y, Yoshida S, Nakao S, Yoshimura T, 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

8. Yoshida S, Kubo Y, Kobayashi Y, Zhou Y, Nakama T, Yamaguchi M, Tachibana T, Ishikawa K, Arita R, Nakao S, Sassa Y, Oshima Y, Kono T, Ishibashi T: Increased vitreous concentrations of mcp-1 and il-6 after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy: Possible association with postoperative macular oedema. *Br J Ophthalmol* 2015. .

査読有

9. Nakama T, Yoshida S, Ishikawa K, Kobayashi Y, Zhou Y, Nakao S, Sassa Y, Oshima Y, Takao K, Shimahara A, Yoshikawa K, 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;22:127-137. 査読有

10. Ishikawa K, Yoshida S, Kobayashi Y, Zhou Y, Nakama T, Nakao S, Sassa Y, Oshima Y, Niuro H, Akashi K, Kono T, Ishibashi T: Microarray analysis of gene expression in fibrovascular membranes excised from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:932-946. 査読有

〔学会発表〕(計 21 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, 2016.10.08.仙台

2. 吉田 茂生, 糖尿病網膜症・加齢黄斑変性とマトリセルラー蛋白, 第 3 回 Asahikawa Research & Clinical Hour Ophthalmology, 2016.07.16.旭川市

3. 吉田 茂生, 新しい眼内増殖抑制治療薬開発の試み, 第三回眼科創薬研究会, 2016.06.03.大阪市

4. 吉田 茂生, 増殖糖尿病網膜症におけるマトリセルラー蛋白の役割, 第 120 回日本眼科学会, 2016.04.07.仙台

5. 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.札幌市

6. 吉田 茂生, 糖尿病網膜症の治療アップデート, 第 21 回 響内科眼科糖尿病病診療連携の会, 2015.07.02.宗像市

7. 吉田 茂生, 糖尿病網膜症と炎症性サイトカイン, 第 14 回 網膜ラウンジ, 2015.07.04.東京

8. Shigeo Yoshida, Novel molecular-targeted therapies for intraocular proliferation, 7th Chinese Congress of Research in Vision and Ophthalmology, 2015.08.14.Shenyang

9. 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

10. Shigeo Yoshida, Inflammation in the pathogenesis of diabetic macular edema, 8th Joint Meeting of Japan-China-Korea Ophthalmologists, 2015.10.18.Fukuoka

11. 吉田 茂生, 糖尿病黄斑浮腫 -Fundamentals & Diagnosis-, 糖尿病黄斑浮腫 診断と治療 up to date, 2015.11.29.札幌

12. 吉田 茂生, 糖尿病黄斑浮腫の病態, 網膜硝子体学会 糖尿病網膜症アップデート ～基礎から臨床まで～, 2015.12.18.東京
13. 吉田 茂生, 糖尿病黄斑浮腫の病態と治療, 第2回 黄斑疾患セミナー in 岡山, 2016.02.06.岡山
14. Shigeo Yoshida, Alterations in the vitreous proinflammatory cytokine levels after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy, Asia-ARVO, 2015.02.16.Yokohama
15. 吉田 茂生, 糖尿病網膜症に対する硝子体手術とサイトカイン, 第35回西中国眼疾患フォーラム, 2014.11.20.宇部市
16. 吉田 茂生, ペリオスチンを標的とした新しい眼内増殖抑制薬開発の試み, 第68回日本臨床眼科学会, 2014.11.15.神戸市
17. Shigeo Yoshida, Role of Cytokines in Diabetic Macular Edema, Retina Expert Conference 2014 in Chicago, 2014.10.19.Chicago
18. Shigeo Yoshida, Diabetic Retinopathy, The 10th International Symposium of Ophthalmology-Hong Kong 2014, 2014.09.26.Hong Kong
19. 吉田 茂生, 石橋 達朗, ゲノムワイド遺伝子発現解析からみた網膜血管新生の分子機序, 第34回眼薬理学会, 2014.09.14.岐阜
20. Shigeo Yoshida, Development of molecular-targeted therapies for intraocular proliferation, The First Kyushu-Beijing-Youngnam retina meeting, 2014.08.23.Busan
21. Shigeo Yoshida, Gene expression profiling of epiretinal membranes from patients with proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy, The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, 2014.05.04.New Orleans
〔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)

〔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

園田 康平 (SONODA KOHEI)

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

中尾 新太郎 (NAKAO SHINTARO)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 50583027

佐々由季生 (SASSA YUKIO)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号: 80580315