

令和 2 年 11 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08587

研究課題名(和文) 侵襲性及び治療コストを低減させる新規加齢黄斑変性疾患治療薬の探索検討

研究課題名(英文) Exploratory research of new drugs for age-related macular degeneration decreasing treatment cost and invasiveness

研究代表者

河野 雅之 (Kohno, Masayuki)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：00437203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：米糠等に含まれるフィトケミカル群に着目し、網膜変性に対するその抗酸化作用、細胞保護作用を評価した。培養細胞レベルで過酸化水素添加による酸化ストレスを抑制できる候補を絞り込み、ヨウ素酸ナトリウム誘発網膜変性モデルマウスに対して、給水瓶で被験薬を自由摂取させて、経時的に、麻酔下で網膜の電気生理的応答及び網膜の構造変化を評価した。その結果、米糠成分等に含まれるフェルラ酸、シナピン酸等の経口投与により網膜のダメージを抑制することが示唆された。また計算科学CGBVS法から選び出した候補化合物の中から、新規低分子血管新生阻害候補も見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の加齢に伴う網膜変性等の顕著な増加は食の欧米化が関係しているという仮説に基づいて、玄米等穀類に含まれるフィトケミカルの経口摂取による網膜変性抑制/予防の可能性を評価した。網膜変性マウスモデルにおいて、フェルラ酸等のフィトケミカルの変性疾患予防/抑制効果等を示すことができた。これらが高齢者等の網膜系疾患に対するサプリメントもしくは医薬品として、実際の医療に適用できれば高騰している医療費削減の一助となりうる。

研究成果の概要(英文)：We studied antioxidant and cell-protective effect of fit-chemicals including brown rice in renal degeneration. In vitro study, promising candidates could inhibit H2O2-induced oxidative stress. Promising drugs were given orally by water bottle to sodium iodate-induced renal degeneration mice. The retina was examined by electroretinography (ERG) and optical coherence tomography (OCT) in living mice. Ferulic acid and sinapic acid including brown rice could protect retinal pigment epithelium from sodium iodate-induced degeneration. New angiogenesis inhibitors were found in candidate low-molecular compounds selected by chemical genomics-based virtual screening (CGBVS).

研究分野：分子薬理学

キーワード：網膜変性 フィトケミカル 血管新生

1. 研究開始当初の背景

黄斑は眼球後部の網膜組織の中心部で最も視覚機能に重要であり、加齢黄斑変性(AMD)はその黄斑部に不可逆的な組織障害がおこり、視力が低下していく疾患で、先進国で後天性の失明原因の主因である。治療法としては、光線力学的療法と薬物療法があり、前者は病巣の活動性低下のみであり、後者は血管新生を阻害する抗 VEGF 抗体を硝子体内注射して視力の改善または安定させる効果がある程度期待できる。しかし、薬価で最大約 17 万円もするような高価な抗体を 1~3 カ月毎に硝子体内注射して、感染症等の予防ケアも必須で、効かない症例もあり、このような患者に負担が大きい現状を改善していく必要がある。

そこで AMD 治療の侵襲性及びコストを低減させるために、我々のこれまでの病変部位特異的な新規治療法の研究成果(分子標的化カチオニックペプチド抗がん剤及びその Drug Delivery System(DDS)化による薬効増強、細胞膜崩壊性カチオニックペプチドの癌細胞での作用機序解明、細胞内ストレスダメージと Heat Shock Protein の制御、肺線維化モデルでのステロイド病変部局所噴霧等)及び共同研究関係等を加味して、以下の 3 つの戦略を立案し研究を本科研費研究開始前から検討を進めてきた。

1) 網膜における各種ストレス由来損傷及びその後の線維化の抑制

細胞保護作用/HSP70 誘導、抗線維化能を有する新規候補化合物を、安全性が確保された既存薬剤の新規薬効/適応化を目指すドラッグリポジショニング研究の手法でリストアップした。すでに研究に着手しており、まず 2 種類の細胞保護剤で抗線維化効果を確認できた。

2) 新規 A 標的 antagonist による血管新生阻害

VEGF を標的とした血管新生を阻害する抗体は薬効としては現状の治療方法としては最も有効性が高いので、血管新生阻害剤でありながらこれまでとは大きく異なる革新的阻害点眼薬の探索方法を検討した。共同研究をしている医学研究科奥野恭史教授により最近開発された、パターン認識技術を応用したこれまでにない方法である Chemical Genomics Based Virtual Screening (CGBVS)法に着目した。この方法は従来の 3D 法等計算科学方法では発見が困難なリガンド群をも探索可能となり、その予測性能は格段に向上したが、現状では G protein-coupled receptor (GPCR)等の限られたメジャーな蛋白群のみが予測対象となる。そこで VEGF とは独立した血管新生メカニズムを有する GPCR である A receptor (特許申請予定のため公開されるこの報告書においては A と表現した)を標的とした。そのノックアウトマウスを用いた網膜症モデル

において眼の血管新生効果が阻害されていることが報告されている。

3) 角膜透過性新規 DDS の探索による点眼剤化検討

カチオニックペプチド、タイトジャンクションモジュレーター、シクロデキストリン等を *in vitro* 角膜モデル系にて、毒性を示さずに可逆的に透過性能を高められるかを評価した。

2. 研究の目的

① 研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

1) DR 研究手法で候補とした細胞保護作用/HSP70 誘導、抗線維化能等を有する化合物が、網膜変性ダメージ及びその後の線維化を抑制すること

2) 計算科学 CGBVS 法から見出した新規 A-antagonist が血管新生を阻害すること

3) これらの候補化合物単独もしくは新規 DDS 併用により、点眼もしくは経口で網膜変性動物モデルにおいて有効性を示すこと。

② 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義
ドラッグリポジショニング研究手法と計算科学 CGBVS 法から選抜した候補化合物に新規 DDS を組み合わせ、網膜変性ダメージ及びその後の線維化、もしくは血管新生を抑制する、新規点眼剤もしくは経口剤を見出すことで、侵襲性及びコストの低い新規 AMD 治療薬を提供する。

3. 研究の方法

1. 試薬

A-ligands 候補化合物はナミキ商事、A peptide はペプチド研究所、フェルラ酸は東京化成、ルチンはナカライテスク、ヨウ素酸ナトリウムはナカライテスク、組織固定液 Super fix は KURABO、マウスは日本 SLC より購入した。

2. 細胞培養

ヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE19 は ATCC (American Type Culture Collection) から入手し、DMEM/HamF12 培地で培養した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVECp は KURABO より入手し、そのプロトコールに従って培養した。

3. 各種細胞保護作用候補物質等による網膜変性ダメージ及び線維化の抑制評価検討

1) 網膜における各種ストレス由来損傷及びその後の線維化の抑制

① WST assay による細胞傷害性評価

ヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 を 96well plate に播種し、各種細胞保護剤を前処理し小胞体ストレス誘発剤 Thapsigargin(TG)、酸化ストレス誘発剤の tert-butyl hydroperoxide(tBH)を添加して、24h 後に Cell Count Reagent SF (ナカライテスク)を 10ul/well で添加、発色させてプレートリ

ーダーで450nm吸光度を測定した。

② ストレス誘発によるVEGF発現のELISA定量

ARPE-19を96well plateに播種し、各種細胞保護剤を前処理しTG、tBHを添加して、24h後の培養上清をHuman VEGF DuoSet ELISA (R&D Systems)でVEGFを定量した。

③ Phagocytosis 活性測定

ARPE-19を24well plateに播種し、各種細胞保護剤を前処理し、TGを添加し24h後に蛍光ラテックスビーズを加え、その4h後に細胞内取り込み能をPhagocytosis活性としてフローサイトメーターBDLSRFortessa (BD)にて評価した。

④ 線維化

ARPE-19を6well plateに播種し、無血清培地中で各種細胞保護剤を前処理し、線維化誘発因子TGF β 1を添加して、6h後の細胞からRNAを抽出し、Real time PCR測定装置(MX3000P, stratagene)を用いて、collagen type-I α 1のmRNA発現量を定量比較した。

4. in vitro 細胞保護効果検討、各種細胞保護作用候補物質等曝露による酸化ストレス抑制評価

WST assayによる細胞傷害性評価

ヒト網膜色素上皮細胞株ARPE-19を96well plateに播種し、各種被験薬剤を前処理し酸化ストレス誘発剤の過酸化水素0.4mM(final)を添加して、1h後に培地交換、もしくは各種被験薬剤を後処理して、さらに一晚培養した。その翌日にCell Count Reagent SF (ナカライテスク)を10ul/wellで添加、発色させてプレートリーダーで450nm吸光度を測定した。

5. 薬剤誘発網膜変性マウス実験

5.1. ヨウ素酸ナトリウム(NaIO₃) 誘発モデル

C57BL/6正常成獣マウスに対して、各種植物由来化合物の水溶液を給水瓶で自由摂取させた。その給水瓶摂取から3日にNaIO₃を40mg/kgで単回腹腔内投与し、2-3週間後に解剖して、眼球をSuper fixで固定した。被験薬水溶液は週3回程度で補充した。

5.2. 麻酔

(独)国立国際医療研究センター研究所動物実験施設がホームページ上で公開している「三種混合麻酔薬と拮抗薬」の方法に従った。

<http://www.rincgm.jp/department/lab/08/pdf/mouse.pdf>

塩酸メドミジン、ミタゾラム、酒石酸ブトルフェノールの3種混合麻酔液を調製した。サンドールP点眼液(日本点眼薬研究所)を点眼し、5分程度後で、再度点眼して、3種混合麻酔液を0.1ml/10gで腹腔内投与した。5分程度で麻酔が効いてきたら、余分なひげを鉋で切り、適宜点眼しながら、ERG測定の

セットを準備した。

5.3. 網膜電図ERG

10、30 cd \cdot s/m²の光刺激で、両眼の網膜の電気生理的応答を測定した。

5.4. OCT

ERGに引き続いて、専用のコンタクトレンズを両眼に装着して、網膜部の光干渉断層イメージング撮影を実施した。測定終了後には、乾燥防止眼軟膏を両眼に塗り、塩酸アチパメゾール希釈液(麻酔回復液)を0.1ml/10gで腹腔内投与した。

5.5. 標本評価

眼球の標本作製、HE染色は京都病理㈱に委託した。外顆粒層(ONL)部分に着目し、その蛇行、顆粒層の密度低下等で、異常率(%)を測定した。

6. human A-receptor 高発現株樹立、agonist 刺激による細胞内カルシウム測定

ヒト子宮頸癌細胞株Hela、ヒト胎児腎細胞株HEK293に対して、human A-receptorのcDNAを導入したベクターをtransfectionして、ハイグロマイシン薬剤スクリーニングにより、クローン化した。フローサイトメトリー解析により抗human A-receptor抗体で、高発現株を選抜した。

A-agonist刺激による細胞内カルシウム変動解析はFluo-4 DirectTM Calcium Assay Kitを使用し、そのプロトコールに従った。蛍光測定は蛍光プレートリーダーGlomax(プロメガ社)を用いた。

7. ゼブラフィッシュ解析による血管新生阻害等新規薬剤スクリーニング評価

血管内皮細胞特異的GFP発現ゼブラフィッシュの受精卵に各種候補薬剤を曝露し、その48時間後に、血管新生度合を蛍光顕微鏡下で観察した。生物医科学研究所の瀬原教授、飯田助教との共同研究として実施した。

4. 研究成果

1. 各種細胞保護作用候補物質等による網膜変性ダメージ及び線維化の抑制評価検討

1) 網膜における各種ストレス由来損傷及びその後の線維化の抑制

細胞保護作用/HSP70誘導、抗線維化能を有する新規候補化合物を、安全性が確保された既存薬剤の新規薬効/適応化を目指すドラッグリポジショニング研究的な考えに基づいて調査し、リストアップした。加齢黄斑変性の新規適応の可能性があると考えられ、かつ、すでに用途特許等の問題がない既存細胞保護薬の放射線障害保護薬のAmifostine(AM)、肝臓機能改善薬のGlycyrrhizic acid(GA)は、ヒト網膜色素上皮細胞株ARPE19に対して、小胞体ストレス誘発剤Thapsigargin(TG)、

Tunicamycin(TM)及び酸化ストレス誘発剤の tert-butyl hydroperoxide(tBH)によるストレスダメージ(図1)、VEGF産生(図2)、Phagocytosisダメージ(図3)を抑制した。またTGFβ1によるcollagen発現への抑制効果(図4)も示した。

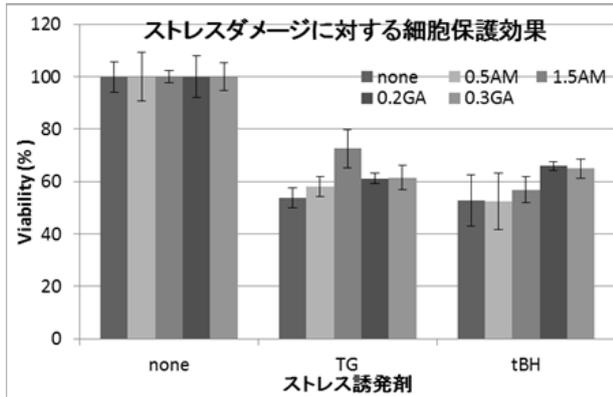


図1 ストレスダメージに対する細胞保護効果

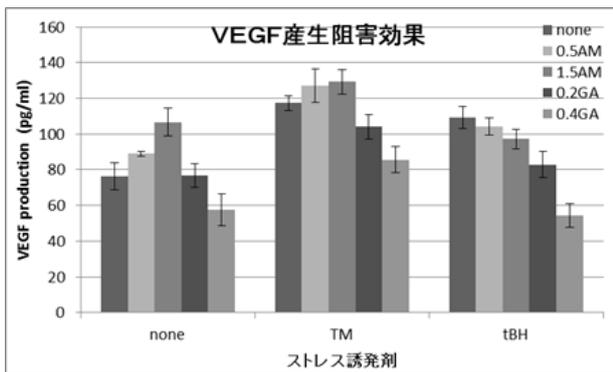


図2 VEGF産生抑制効果

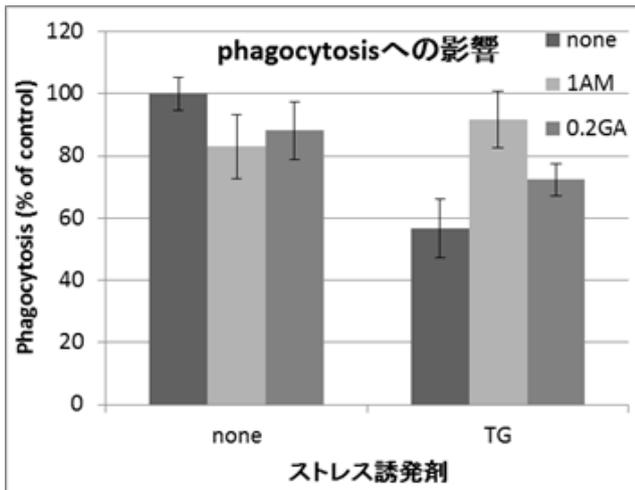


図3 Phagocytosisダメージ能の回復効果

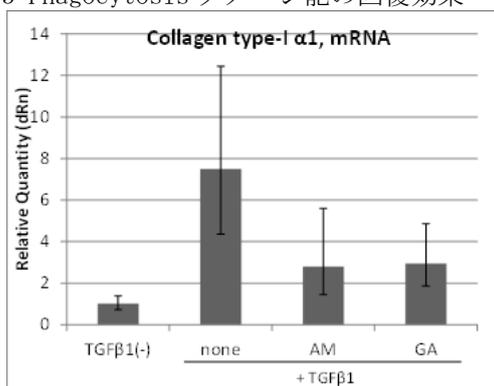


図4 TGFβ1によるcollagen発現への抑制効果

2. 天然物由来化合物による網膜変性抑制検討

1.1. ヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE19を用いた、酸化ストレスに対する低減効果

過酸化水素による酸化ストレスに対して、穀類中に含まれるフェルラ酸、シナピン酸、p-クマル酸、バニリン酸、コウジ酸、ルチン等の添加によりそのダメージを抑制できた。

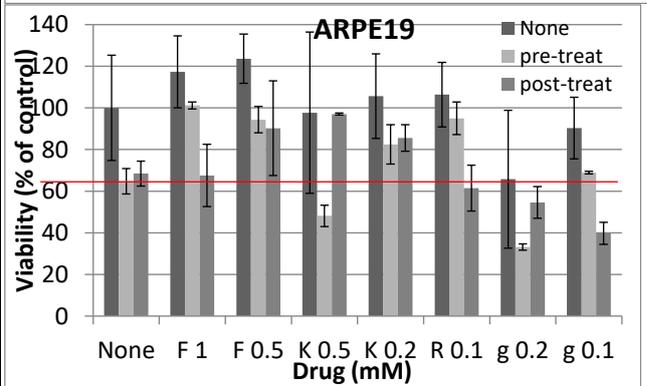
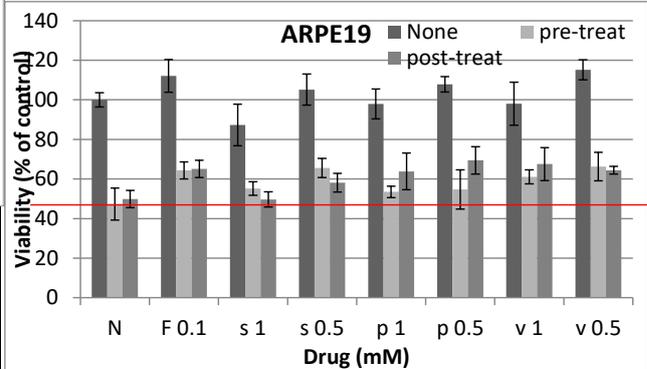


図5(上下). ヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE19を用いた、酸化ストレスに対する低減効果
過酸化水素処理1時間のより前から酸化ストレス中まで(pre-treat)もしくはその wash out 後(post-treat)に候補薬剤を添加
F: フェルラ酸、s:シナピン酸、p: p-クマル酸、v:バニリン酸、K:コウジ酸、R:ルチン、g:γオリザノール

3. 候補薬剤経口摂取によるヨウ素酸ナトリウム誘発網膜変性マウスモデルでの薬効評価

酸化ストレス誘発剤のヨウ素酸ナトリウム(NaIO3)を腹腔内投与(ip)して、マウスに網膜変性を誘発させ、その際にフェルラ酸、フィチン酸、シナピン酸、ルチン水溶液もしくは水を入れた給水瓶でマウスに自由摂取させた。その結果、電気生理的応答を評価する網膜電図(ERG)及び網膜断層像解析(OCT)ともに、NaIO3投与によるダメージが観測できたが、水摂取群と比較して、フィチン酸以外の3つの候補成分摂取群ではいずれもダメージ軽快がみられた(図6-8)。

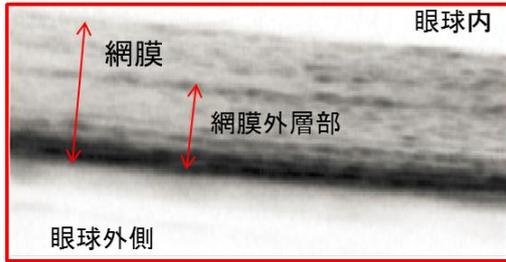


図 6. 網膜部の光干渉断層イメージング (OCT)、網膜外層部：視細胞層等含む

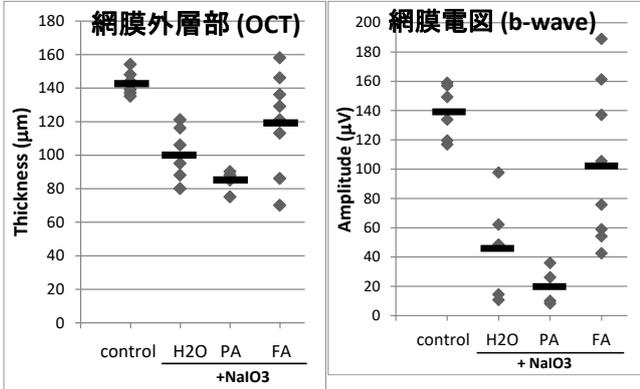


図 7. 米糠成分自由給水摂取による網膜変性抑制効果
米糠成分 PA:フィチン酸、FA:フェルラ酸、40mg/kg/day として、給水瓶に水溶液として自由給水させた。

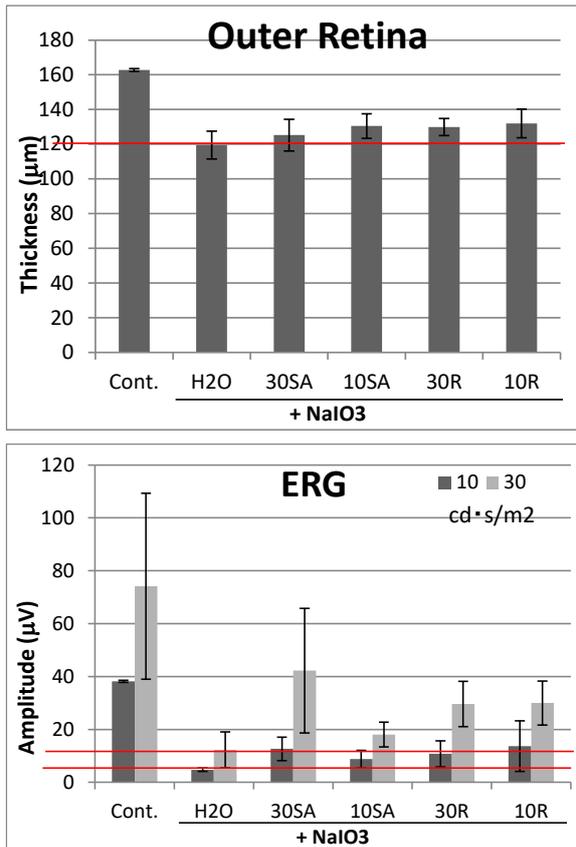


図 8. シナピン酸、ルチン自由給水摂取による網膜変性抑制効果

上：OCT データ、下：網膜電図 (ERG)
給水瓶 Cont, H2O: 水、30SA: 30mg/kg/day シナピン酸、10SA: 10mg/kg/day シナピン酸、30R: 30mg/kg/day ルチン、10R: 10mg/kg/day ルチン

4. 新規計算科学法 CGBVS による新規血管新生阻害剤の探索とその安全性・有効性評価

1) CGBVS 法による新規 A-受容体結合化合物予測

VEGF を標的とした血管新生を阻害する抗体は薬効としては現状の治療方法としては最も有効性が高いので、血管新生阻害剤でありながらこれまでとは大きく異なる革新的阻害点眼薬の探索方法を検討した。共同研究をしている医学研究科奥野恭史教授により最近開発された、パターン認識技術を応用したこれまでにない方法である Chemical Genomics Based Virtual Screening (CGBVS) 法に着目した。この方法は従来の 3D 法等計算科学方法では発見が困難なりガンド群をも探索可能となり、その予測性能は格段に向上したが、現状では G protein-coupled receptor (GPCR) 等の限られたメジャーな蛋白質群のみが予測対象となる。そこで VEGF とは独立した血管新生メカニズムを有する GPCR である A-receptor を標的とした。入手可能な低分子化合物ライブラリーの中から、上位 250 化合物の予測結果を得て、構造類似性でグループ化を行い、種類が多いグループからそれぞれ 1 つを選び、その A-agonist/antagonist 作用を評価した。

2) A-agonist/antagonist screening

A-receptor 高発現株樹立、agonist 刺激による細胞内カルシウム濃度測定

ヒト子宮頸癌細胞株 Hela に対して、human A-receptor の cDNA を導入したベクターを transfection して、ハイグロマイシン薬剤スクリーニングにより、クローン化した。フローサイトメトリー解析により抗 human A-receptor 抗体で、高発現株を選抜した。その高発現株に対して、A-agonist で刺激したところ、細胞内 Ca 濃度の上昇が確認できた。

3) 血管新生阻害評価

マウス胸部大動脈断片培養及び、血管内皮細胞特異的 GFP 発現ゼブラフィッシュ等を用いた評価系で、新規血管新生阻害剤候補低分子化合物を見出し、これから特許出願予定である。

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 1 件)

Oral administration of ferulic acid or

ethyl ferulate attenuates retinal damage
in sodium iodate-induced retinal
degeneration mice.

Kohnno M, Musashi K, Ikeda H, Horibe T,
Matsumoto A, Kawakami K.

Sci Rep. 2020 May 26;10(1):8688.

doi: 10.1038/s41598-020-65673-y.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 雅之 (KOHNO, Masayuki)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：00437203

(4) 研究協力者

堀部 智久 (HORIBE, Tomohisa)

川上 浩司 (KAWAKAMI, koji)

武蔵 国弘 (MUSASHI, Kunihiro)

奥野 恭史 (OKUNO, Yasushi)

池田 華子 (IKEDA, Hanako)

瀬原 淳子 (SEHARA, Atsuko)

飯田 敦夫 (IIDA, Atsuo)