

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20257

研究課題名(和文)新規SRPK阻害剤による眼内新生血管局所治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of a topical drug for ocular neovascularization using an novel SRPK inhibitor

研究代表者

諸岡 諭 (MOROOKA, SATOSHI)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：80738005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：現在眼内新生血管疾患に対しては、抗VEGF薬の眼内注射による治療が行なわれている。今回新規薬剤を用いた軟膏剤の開発を行った。これまでの研究で得たSRPK阻害効果のある化合物を用いて、眼軟膏剤を作成し、脈絡膜新生血管モデルマウスに投与した。コントロールとして使用した基材のみの軟膏塗布に比べ、化合物含有軟膏を塗布にて、有意な新生血管抑制効果を認めた。次に眼内での効果をより高めるため、化合物のプロドラッグ体の作成を試みた。まず効果を確認した化合物の大量合成を行い、これまで報告されているプロドラッグ体を参考に、SRPK阻害剤のアセチル化体を作成した。

研究成果の概要(英文)：Intravitreal injection of anti-VEGF antibodies has been demonstrated to cure intraocular neovascularization. We developed an eye ointment containing new SRPK inhibitor to reduce the risk of several complications by intraocular injection. In a mouse model of laser-induced choroidal neovascularization, topical administration of eye ointment containing SRPK inhibitor significantly inhibited choroidal neovascularization than that of control ointment. We tried to make a pro-drug of the SRPK inhibitor that is more efficient. We synthesized that compound in large quantity and got an acetylated derivative of the SRPK inhibitor referring to previous report.

研究分野：眼科

キーワード：血管新生阻害

1. 研究開始当初の背景

(1) 眼内血管新生と VEGF

眼内血管新生が原因となる疾患として、糖尿病網膜症や加齢黄斑変性などがあげられる。糖尿病網膜症は我が国の失明原因の第2位で、患者数はおよそ300万人と言われている。網膜光凝固術や手術など治療の進歩に伴い、失明に至る患者は減少しているが、ライフスタイルの欧米化により糖尿病患者が増加しているため、依然として失明を回避する治療が重要である。また加齢黄斑変性は失明原因の第3位であり、推定患者数は69万人と言われている。高齢者の増加のため、1998年から2007年の9年間で患者数は約2倍に増加しており、今後も増加が見込まれる。血管新生には VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) が関与しており、2006年滲出性加齢黄斑変性に対し、抗 VEGF 薬(ラニビズマブ)が認可され、現在加齢黄斑変性の多くの症例で使用されている。抗 VEGF 薬の誕生以前は、加齢黄斑変性症に対して外科治療が行われていたが、治療しても視機能の維持が困難であった。しかし抗 VEGF 薬により、視機能を維持および改善できる症例が増え、抗 VEGF 薬の使用量は増加の一途をたどっている。前述のように加齢黄斑変性患者数が増加しており、またラニビズマブは2013年8月には網膜静脈閉塞症へ、2014年4月には糖尿病網膜症へも適応拡大されており、今後さらに抗 VEGF 薬の使用が増えていくと考えられる。

(2) 現行の抗 VEGF 治療の問題点・改善点

現行の抗 VEGF 薬は分子量の大きい抗体であり、投与方法が硝子体注射に限られている。硝子体注射は感染予防などの目的で、手術に準じた設備や準備が必要であり、患者だけでなく、医師にとっても負担である。今後 VEGF 投与の増加が予想されるため、硝子体注射より負担が少なく、安全な眼軟膏や点眼剤の開発が望まれる。

(3) VEGF と SRPK

細胞内のすべてのタンパク質は mRNA を鋳型にして合成される。この mRNA はゲノム DNA を鋳型として合成される pre-mRNA から RNA スプライシングにより複数生成される。この RNA スプライシングには、セリンやアルギニン残基が多いタンパク質(セリンアルギニンリッチ; SR) タンパク質が重要な役割を担っている。この SR タンパクは細胞内で、いくつかのキナーゼにリン酸化される。リン酸化された SR タンパク質は pre-mRNA に結合し、スプライシングを促すとされている¹⁾。我々は SR タンパク質リン酸化キナーゼのひとつである SRPK の阻害剤、SRPIN340 を開発し、ウイルス増殖抑制効果があることを報告した²⁾。その後 SRPIN340 が VEGF 活性阻害を介し、眼内新生血管を抑制することが明らかになった³⁾。しかし SRPK が VEGF スプライシングに及ぼす影響については、不明な点も多い。

(4) 新規 SRPK 阻害剤の取得

約72000種の化合物ライブラリから、In silico および In vitro kinase assay を行い、最も SRPK 阻害活性の高い化合物を取得した。脈絡膜新生血管モデルマウスを用い、スクリーニングで取得した SRPK 阻害剤を用い、硝子体注射を施行し、in vivo での効果を確かめたところ、既報で血管新生抑制効果を認めた SRPIN340 よりも高い新生血管阻害効果を認めた。また濃度依存的に血管新生抑制することも確認している。

<参考文献>

1. Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2. Ngo JC, et al. Mol Cell. 20:77-89, 2005
2. Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral

replication. Fukuhara T, et al. 103:11329-11333, 2006

3. Specific inhibition of serine/arginine-rich protein kinase attenuates choroidal neovascularization. Mol Vis. 19: 536-543, 2013

2. 研究の目的

(1) 新規 SRPK 阻害剤眼軟膏作成

これまでの実験で得られた新規 SRPK 阻害剤の眼軟膏剤を作成する。

(2) 新規 SRPK 阻害剤眼軟膏の血管新生抑制効果確認

上記にて作成した眼軟膏を脈絡膜新生血管モデルマウスに投与し、血管新生抑制効果を確認する。

(3) SRPK 阻害剤のプロドラッグ体作成およびプロドラッグ体眼軟膏の血管新生抑制効果確認

薬剤の眼内移行性を改善すると、より血管新生抑制効果が高くなることが期待されるため、薬剤の化合物濃度を低くすることができると考えられる。1.で薬効を確認できた眼軟膏より眼内移行性の良好な化合物の取得を目指し、化合物のプロドラッグ化を行い、眼軟膏を作成する。2.と同様の方法で血管新生抑制効果を確認する。

(4) SRPK 阻害剤による血管新生の形態学的変化の検討

SRPK 阻害剤を投与した新生血管モデルマウスの摘出眼球から作成した切片および網膜光干渉断層計 (optical coherence tomography; OCT)を用いて血管新生の形態変化を観察する。

(5)SRPK 阻害剤による眼組織での VEGF mRNA の変化の確認

SRPK 阻害剤による VEGF スプライシングの変化については不明な点が多い。そのため SRPK 阻害剤投与による眼組織での VEGF mRNA の変化を確認する。

3. 研究の方法

(1) 新規 SRPK 阻害剤眼軟膏作成

眼軟膏剤は硝子体注射と比較し、容易にかつ安全に投与できるため、これまでの実験で血管新生阻害効果を確認した SRPK 阻害剤の眼軟膏剤を作成する。一般的な基剤としては白色ワセリンやパラフィンを用いる予定である。

(2) 新規 SRPK 阻害剤眼軟膏の血管新生抑制効果確認

レーザーを用いた脈絡膜新生血管モデルマウスを用いる。具体的には麻酔下で6週～8週齢の C57BL6J マウスの眼底に、アルゴンレーザーを照射し、新生血管を作成する。なおこのモデルは既存の抗 VEGF 薬開発でも用いられている方法である。レーザー照射直後より、1日1～3回眼軟膏剤を眼表面に塗布する。レーザー照射7日後、麻酔下で左室より FITC-Dextran を灌流し、眼球を摘出する。摘出後、眼球を開いてフラットマウントを作成し、蛍光顕微鏡にて、血管新生の面積を測定する。コントロール眼軟膏と比較し、SRPK 阻害眼軟膏剤が血管新生を抑制しているかを確認する。

(3) SRPK 阻害剤のプロドラッグ体作成およびプロドラッグ体眼軟膏の血管新生抑制効果確認

眼局所薬の眼内移行性、特に角膜透過性においては、化合物の脂溶性が重要な因子である。通常点眼基剤に溶解するには、水溶性を高める必要があるが、水溶性が高く、脂溶性が低い化合物の場合、角膜透過性が低下がする。現在認可されているプロドラッグ化点眼剤として、非ステロイド性抗炎症薬のネパフェナクが挙げられる¹。ネパフェナクはアンフェナクのプロドラッグ体であり、アンフェナクに比べ、角膜透過性が高く、嚢胞様黄斑浮腫にも効果があるとされている²。

既報を参考にこれまでのスクリーニングで取得した新規 SRPK 阻害剤のプロドラッグ体

の合成を行い、より眼内移行性の高い化合物の取得を目指す。

(4) SRPK 阻害剤投与による血管新生の形態学的変化の検討

一定期間眼軟膏剤を投与した脈絡膜新生血管モデルマウスより眼球を摘出する。4%パラホルムアルデヒドにて固定後、スクロース溶液で置換し、凍結させる。凍結切片を作成し、免疫染色にて新生血管を染色し、形態学的変化を観察する。生体内での新生血管の観察が必要である場合は、0.4%トロピカミド溶液にてマウスを散瞳させた後、麻酔下にて光干渉断層計を用い、脈絡膜新生血管を観察する。

(5) SRPK 阻害剤投与による眼組織での VEGF の変化

脈絡膜新生血管モデルマウスに眼軟膏剤を投与する。一定期間後、網膜および脈絡膜を採取し、それぞれから RNA を抽出する。Reverse Transcript 試薬を用い、cDNA を作成した後、定量 PCR を用い、VEGF mRNA 量を測定する。また摘出した組織よりタンパクを抽出し、ELISA 法にて VEGF タンパク量を測定する。

<参考文献>

1. Topical ophthalmic NSAIDs: a discussion with focus on nepafenac ophthalmic suspension.

Gaybes BI, Callanan D. Clin Ophthalmol.

2:355-368, 2008

2. Cystoid and diabetic macular edema treated

with nepafenac 0.1%. Hariprasad SM, et al. J

Ocul Pharmacol Ther. 23:585-590, 2007

4. 研究成果

(1) 新規 SRPK 阻害剤眼軟膏作成

化合物スクリーニングによって得られた新規 SRPK 阻害剤を用い、眼軟膏剤を作成した。基材として白色ワセリンと液体パラフィンを用いた。まず効果を確認するため、化合物 10%含有の眼軟膏剤を作成した。眼軟膏剤は

経時的な含有量低下もなく、室温・光照射下でも安定していた。

(2) 新規 SRPK 阻害剤眼軟膏の血管新生抑制効果確認

C57B/6J マウスの両眼にアルゴンレーザーを照射し、脈絡膜新生血管 (Choroidal NeoVascularization; CNV) モデルマウスを作成した。レーザー直後より、1日3回、7日間、基材のみのコントロール眼軟膏及び化合物含有眼軟膏をそれぞれマウスの両眼に点入した。なお眼軟膏の塗布には Gilson 社のマイクロマンを使用し、7 μ l 定量し、眼表面に点入した。レーザー照射7日後、麻酔科に左室より Sigma 社の FITC-Dextran を灌流し、眼球摘出を行った。摘出眼は4%パラホルムアルデヒド液で固定した後、角膜・水晶体・網膜を除去し、フラットマウントを作成した。Keyence 社の傾向顕微鏡にて新生血管を作成し、血管面積を計測した。なおレーザーにて網膜下出血や硝子体出血を認めた個体は除外した。結果、コントロール眼軟膏塗布群 (28981 \pm 2532.8 μ m²) と比較して、化合物含有眼軟膏群 (19777 \pm 1836.6 μ m²) で有意な新生血管抑制効果を認めた。

(3) SRPK 阻害剤のプロドラッグ体作成

プロドラッグ体作成のために、まず化合物の大量合成を行った。大量合成で取得した化合物は、実験で使用した SRPK 阻害剤と一致していることを確認した。これまで報告されているプロドラッグ体を参考に、軟膏剤で効果を確認した SRPK 阻害剤のアセチル化体を作成した。しかしモデルマウスを用いた実験にて使用する軟膏を作成するのに必要量の化合物を取得するのが困難であり、モデルマウスでの効果実験まで至らなかった。

(4) SRPK 阻害剤投与による血管新生の形態学的変化の検討、及び (5) SRPK 阻害剤投与による眼組織での VEGF の変化

SRPK 阻害剤投与による眼組織で VEGF の変化を確認するため、マウス網膜及び脈絡膜・強

膜複合体からの RNA 抽出、cDNA 作成、Reverse Transcription-PCR を試みた。網膜や脈絡膜・強膜の組織全体より RNA 抽出を行うと、レーザーを施行した部分以外の組織が多く含まれるため、レーザーを施行した部分のみの組織を部分的に採取して、RNA 抽出を試みたが、サンプル量が微量のため、VEGF mRNA を確認することができなかった。またレーザー数を増やし、採取する組織量も増やしたが、確認するに至らなかった。動物組織の VEGF mRNA の変化を同定するのが困難であったため、網膜色素上皮細胞を用いた実験で、SRPK 阻害剤による VEGF mRNA を確かめた。これまで我々は VEGF mRNA の低下に関して確認していたが、既報では RNA スプライシングによる VEGF のアイソフォーム変化による血管新生阻害が報告されていたので、スプライシング変化について検討した。化合物を添加した網膜色素上皮細胞から RNA 抽出し、VEGF mRNA を確認したが、既報にあるような新生血管阻害効果のある VEGF のアイソフォームの存在は確認できなかった。

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 1 件)

Satoshi Morooka, Mitsuteru Hoshina, Isao Kii, Takayoshi Okabe, Hirotatsu Kojima, Naoko Inoue, Yukiko Okuno, Masatsugu Denawa, Suguru Yoshida, Junichi Fukuhara, Kensuke Ninomiya, Teikichi Ikura, Toshio Furuya, Tetsuo Nagano, Kousuke Noda, Susumu Ishida, Takamitsu Hosoya, Nobutoshi Ito, Nagahisa Yoshimura, Masatoshi Hagiwara, **Identification of a dual inhibitor of SRPK1 and CK2 that attenuates pathological angiogenesis of macular degeneration in mice**, *Molecular Pharmacology*, 査読有、88 巻、2015、316-325、

doi: 10.1124/mol.114.097345.

[学会発表] (計 4 件)

(1) 諸岡諭、喜井勲、奥野友紀子、吉田優、福原淳一、野田航介、伊藤暢聡、石田晋、細谷孝充、萩原正敏、吉村長久、SRPK1 及び CK2 阻害活性を有する新規血管新生阻害薬の開発、第 119 回日本眼科学会、2015.4.16、札幌市

(2) Satoshi Morooka, Yukiko Okuno, Takamitsu Hosoya, Masatoshi Hagiwara, Nagahisa Yoshimura, **Identification of a dual inhibitor of SRPK1 and CK2 that attenuates pathological angiogenesis of macular degeneration in mice**, *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, 2015.5.4, Denver

(3) 諸岡諭、伊藤暢聡、細谷孝充、石田晋、萩原正敏、吉村長久、リン酸化酵素 SRPK1/CK2 阻害活性を有する新規血管新生阻害薬の開発、第 5 回わかもと先進眼科医療研究会、2015.8.21、東京都

(4) 諸岡諭、伊藤暢聡、細谷孝充、野田航介、石田晋、萩原正敏、吉村長久、リン酸化酵素 SRPK1/CK2 阻害活性を有する新規血管新生阻害薬、第 35 回日本眼薬理学会、2015.9.5、東京都

[図書] (計 0 件)
なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)
名称：血管新生増殖因子を阻害する医薬組成物
発明者：萩原正敏・諸岡諭・細谷孝充・吉田優
権利者：京都大学、東京医科歯科大学
種類：
番号：PCT/JP2015/059461
出願年月日：2014.3.27
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)
なし

[その他]
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

諸岡 諭(MOROOKA, Satoshi)
京都大学・大学院医学研究科眼科・特定
助教
研究者番号: 80738005

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

吉村 長久(YOSHIMURA, Nagahisa)
京都大学・大学院医学研究科眼科・教授

萩原正敏(HAGIWARA, Masatoshi)
京都大学・大学院医学研究科形態形成機構
学・教授

細谷孝充(HOSOYA, Takamitsu)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
教授