

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462675

研究課題名(和文) I Bキナーゼ阻害によるぶどう膜炎制御

研究課題名(英文) Regulation of uveitis by inhibition of IkappaB kinase in mice

研究代表者

石嶋 漢 (Ishijima, Kan)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：70634765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：新規 IkappaB 阻害薬 IMD-0354 を全身投与してぶどう膜炎動物モデルへの効果を検討した。マウスの臨床的重症度スコアは対照群に比較して治療群で有意に軽症化した ($p<0.05$)。その効果は用量依存的であり、投与薬剤の効果と考えられた。続いて組織学的重症度を検討したところ、同様に対照群と比較して治療群で有意にぶどう膜炎は軽症化した ($p<0.05$)。新規 IkappaB 阻害薬は自己免疫性ぶどう膜炎動物モデルに対して非常に優れた抑制効果を示した。

研究成果の概要(英文)：A new IkappaB kinase inhibitor, IMD-0354, was systemically injected into an animal model of human endogenous uveitis. Clinical severity of uveitis was significantly milder in treated mice than that of untreated control mice ($p<0.05$). It showed a dose-dependent effect. Pathological severity was also significantly milder in treated mice than controls ($p<0.05$). A new IkappaB inhibitor had a beneficial effect on regulating uveitis in mice.

研究分野：眼科学

キーワード：ぶどう膜炎 転写因子 新規薬剤

1. 研究開始当初の背景

(1) . 疫学的背景

ぶどう膜炎は、虹彩・毛様体・脈絡膜といういずれも眼内で血流と色素に富んだ組織におきる炎症の総称である。地域や民族的遺伝背景によって各疾患に特徴があり、先進国においては 40 歳以上の中途失明原因の約 10% を占める。その多くがベーチェット病や炎症性腸疾患などの膠原病または類縁疾患に起因する。世界 25 カ所を調査した研究では、現在なおベーチェット病のぶどう膜炎患者の 1 / 4 が失明に至るという厳しい現実がある (Kitaichi N et al: Br J Ophthalmol, 2007)。北海道大学病院を 1994-2003 年の 10 年間に初診したぶどう膜炎患者 1,240 名の平均発症年齢は男性 41.7 歳、女性 45.7 歳であり、とくにベーチェット病患者の発症年齢はさらに低いことを我々は報告した (Kitamei H et al: Acta Ophthalmol, 2009)。ぶどう膜炎は特に青壮年での発症が多く、患者本人はもちろん、社会的、経済的にも極めて重要な問題である。

(2) . ぶどう膜炎制御の現状

これまでぶどう膜炎の治療には主としてステロイド薬、消炎鎮痛薬 (NSAIDs) と免疫抑制薬が用いられてきた。しかし日常臨床で、現行の治療でも重篤な視力障害に陥る例をしばしば経験する。効果の高い治療法を開発するには、眼内で炎症を制御する因子をターゲットとすることが重要と考えられ、近年では難治性ベーチェット病患者への抗 tumor necrosis factor (TNF)- α 抗体 (Ohno S et al: J Rheumatol, 2004) などの炎症性サイトカインに標的を絞った治療の開発研究・臨床応用が進んできている。これらの治療で従来の治療に抵抗する難治性ぶどう膜炎を以前よりは効果的に制御できるようになったが、それでも炎症が制御できない、あるいは副作用、感染症などで本治療適応外の例は多い。

(3) . 過去の NF- κ B 阻害薬によるぶどう膜炎制御の試み

EIU はエンドトキシンによる非特異的炎症であるが、EAU はヒト内因性ぶどう膜炎の動物モデルであり、Th1/Th17 細胞優位の自己免疫反応による。我々はこれまでピロリジンジチオカーボメイト (PDTC, Kitamei H et al: J Leukoc Biol 2006) やデヒドロメチルエポキシノマイシン (DHMEQ, Iwata D et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 2010) で有効性を報告した。しかし強力な抗酸化作用を有する PDTC は酸化されると逆に生体内で酸化剤として作用し始める。DHMEQ は全身副作用に関しては軽微だが、脂溶性で現時点では注射薬として使用できない。将来の臨床応用を考えると感染防御・細胞増殖等に重要な NF- κ B を非特異的に阻害することは生理的

に望ましくない。

ならば炎症反応時にのみ活性化される分子を標的とすればよいのではないか? この経路のうちストレス下でのみ活性化する IKK に注目し、我々は IMMD 社 (東京) が開発した特異的 IKK β 阻害薬 IMD-0354 (注射) と IMD-1041 (経口) を EIU に投与して有効性を報告した (Lennikov A et al: Mol Vis 2012)。次ははいよいよ内因性ぶどう膜炎モデル (EAU) に挑戦するときと考えた。

2. 研究の目的

ぶどう膜炎の病態には炎症をつかさどる転写因子 nuclear factor kappa B (NF- κ B) 経路が重要である。これまで我々は動物モデルで複数の NF- κ B 阻害薬の有効性を報告したが、全身副作用のため臨床応用に至っていない。しかし昨年、我々は I κ B キナーゼを特異的に阻害し、全身副作用を劇的に軽減できる新規薬剤を用いてエンドトキシン誘導ぶどう膜炎 (EIU) を安全かつ有効に軽症化させた。今回それらを用いてヒト難治性ぶどう膜炎モデル、実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) の制御を試みた。

3. 研究の方法

(1) . EAU の誘導と薬剤投与

- ①. 6-8 週齢の B10. BR マウス、C57BL/6 マウスにヒト視細胞間レチノイド結合蛋白 (IRBP) 由来合成ペプチドと結核死菌強化完全フロインドアジュバントエマルジョンを皮下注射する。動物愛護の観点から足踵ではなく、背部皮下に注射する。
- ②. 追加免疫として百日咳菌毒素を 0.1 μ g 腹腔内投与して EAU を惹起する。
- ③. **IMD-0354** (30, 10, 3 mg/kg) を連日腹腔内注射する。対照群には基剤のみを投与する。

(2) . EAU 軽症化の検討

- ①. 免疫 10 日後から 3 日おきに 21 日目まで、麻酔下で散瞳薬と検眼鏡を用いて経瞳孔的にマウス眼底検査をおこなう。我々の既報 (Namba K et al: J Immunol, 2000) に基づきぶどう膜炎を経時的に評価する (臨床的重症度スコア)。我々は従来困難であったマウスの眼底検査を生きたまま可能にする方法を確立しており、同じマウスの眼炎症所見を経時的に観察することが出来る。
- ②. 21 日目にマウスを安楽死させ、眼球を摘出する。
- ③. 固定後組織標本を作製し、組織学的に重症度を評価検討する (病理組織学的重症度スコア)。
- ④. 眼内の炎症細胞数、蛋白濃度、一酸化窒素濃度、サイトカインおよびケモカイン濃度を測定し、コントロールマウス

と比較する。サイトカインおよびケモカイン濃度はELISAによって測定する。

4. 研究成果

研究計画に従い、新規 IkappaB 阻害薬 IMD-0354 を全身投与してぶどう膜炎動物モデルへの効果を検討した。2 系統のマウス、C57BL/6 (H-2^b) と B10. BR (H-2^k) に実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) を誘導した。C57BL/6 マウスは動物実験で広く使用される系統であるため、当初はこの系統を主に使用する計画であったが、疾患感受性が低く、十分な重症度のぶどう膜炎が惹起されなかった。そのため対照群と治療群の差を検討するには不十分であった。次に抗原感受性の高い B10. BR マウスを用いたところ十分な重症度のぶどう膜炎が惹起された。

B10. BR マウスでは臨床的重症度スコアが対照群に比較して治療群で有意に軽症化した ($p < 0.05$)。その効果は用量依存的であり、投与薬剤の効果と考えられた。続いて組織学的重症度を検討したところ、同様に対照群と比較して治療群で有意にぶどう膜炎は軽症化した ($p < 0.05$)。これまで全身投与にともなう有害事象はみられておらず、安全性も比較的高いと推測される。結論として、新規 IkappaB 阻害薬 IMD-0354 は自己免疫性ぶどう膜炎動物モデルに対して非常に優れた抑制効果を示した。

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 24 件)

1. Higashi K, Meguro A, Takeuchi M, Yamane T, Kitaichi N, Horie Y, Namba K, Ohno S, Nakao K, Sakamoto T, Sakai T, Tsuneoka H, Keino H, Okada AA, akeda A, Fukuhara T, Mashimo H, Ohguro N, Oono S, Enaida H, Okinami S, Mizuki N. Investigation of association between IL10 gene polymorphisms and Vogt-Koyanagi-Harada disease in a Japanese population. *Ophthalmic Genet.* 2017; 38: 187-189 doi: 10.3109/13816810 査読有
2. Dong Z, Shinmei Y, Dong Y, Inafuku S, Fukuhara J, Ando R, Kitaichi N, Kanda A, Tanaka K, Noda K, Harada T, Chin S, Ishida S. Effect of geranylgeranylacetone on the protection of retinal ganglion cells in a mouse model of normal tension glaucoma. *Heliyon.* 2016; 2: doi:e00191 10.1016/j.heliyon.2016.e00191 査読有
3. Horie Y, Kitaichi N, Hijioka K, Sonoda K, Saishin Y, Kezuka T, Goto H, Takeuchi M, Nakamura S, Kimoto T, Shimakawa M, Kita M, Sugita S, Mochizuki M, Hori J, Iwata M, Shoji J, Fukuda M, Kaburaki T, Numaga J, Kawashima H, Fukushima A, Joko T, Takai N, Ozawa Y, Meguro A, Mizuki N, Namba K, Ishida S, Ohno S. Ocular Behçet's disease is less complicated with allergic disorders. A nationwide survey in Japan. *Clin Exp Rheumatol.* 2016; 102: 1100-1105 <http://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=10697> 査読有
4. Iwata D, Mizuuchi K, Aoki K, Horie Y, Kase S, Namba K, Ohno S, Ishida S, Kitaichi N. Serial frequencies and clinical features of uveitis in Hokkaido, Japan. *Ocul Immunol Inflamm.* 2016; 20: 1-4 doi: 10.1080/09273948.2016.1184286 査読有
5. Kase S, Namba K, Iwata D, Mizuuchi K, Kitaichi N, Tagawa Y, Okada-Kanno H, Matsuno Y, Ishida S. Diagnostic efficacy of cell block method for vitreoretinal lymphoma. *Diagn Pathol.* 2016; 11: 29 doi: 10.1186/s13000-016-0479-1 査読有
6. Satoh M, Namba K, Kitaichi N, Endo N, Kitamei H, Iwata D, Ohno S, Ishida S, Onoe K, Watarai H, Taniguchi M, Ishibashi T, Stein-Streilein J, Sonoda K, Kaer L V, Iwabuchi K. Invariant natural killer T cells play dual roles in the development of experimental autoimmune uveoretinitis. *Exp Eye Res.* 2016; 153: 79-89 doi:10.1016/j.exer.2016.10.003 査読有
7. Shinmei Y, Kijima R, Nitta T, Ishijima K, Ohguchi T, Chin S, Ishida S. Modified 360-degree suture trabeculectomy combined with phacoemulsification and intraocular lens implantation for glaucoma and coexisting cataract. *J Cataract Refract Surg.* 2016; 42: 1634-1641 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrs.2016.08.016> 査読有
8. Nagata Y, Yoshihisa Y, Rehman MU, Matsunaga K, Kitaichi N, Shimizu T. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in pollen-induced allergic conjunctivitis and pollen dermatitis in mice. *PLoS One.* 2015; 10: 1-13 doi:10.1371/journal.pone.0115593 査読有
9. Dong Z, Iwata D, Kitaichi N, Takeuchi M, Sato M, Endo N, Iwabuchi K, Ando R, Fukuhara J, Kinoshita S, Lennikov A, Kitamura M, Mizuuchi K, Kanda A, Noda K, Namba K, Yamagishi S, Ohno S, Ishida S. Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis by inhibition of glyceraldehyde derived-advanced glycation end product formation. *J*

[学会発表] (計 55 件)

1. 石嶋 漢、新明康弘、野崎真世、陳 進輝、石田 晋. 両眼の眼瞼延長術と瞼板縫合術が必要となった甲状腺眼症の 1 例. 第 54 回日本神経眼科学会総会;2016/11/25-26 宮崎市民プラザ (宮崎県・宮崎市)
2. Kitaichi N. Prevalence of allergic disorders complicated with Behcet's disease - A nationwide survey in Japan. 2016 Autumn Meeting of Ophthalmological Society of Taiwan (TOS); 2016/11/13 (Kaohsiung, Taiwan)
3. 野崎真世、加瀬 諭、石嶋 漢、石田 晋. 骨形成を伴う眼窩内脂肪肉腫の 1 例. 第 70 回日本臨床眼科学会;2016/11/3-6 国立京都国際会館(京都府・京都市)
4. 水内一臣、南場研一、岩田大樹、鈴木智浩、宇野友絵、大野重昭、北市伸義、石田 晋. サイトメガロウイルス網膜炎におけるウイルス血症との関連. 第 70 回日本臨床眼科学会;2016/11/3-6 国立京都国際会館(京都府・京都市)
5. Kitaichi N, Horie Y, Namba K, Ishida S, Ohno S. Ocular Behcet's disease is less complicated with allergic disorders - a nationwide survey in Japan. 17th International Conference on Behcet's Disease. Casa di Spiritualita Sant' Anna; 2016/9/15-17 (Matera, Italy)
6. Kitaichi N. Difficult case of treatment. Morning Session: Meet the expert. 17th International Conference on Behcet's Disease. Casa di Spiritualita Sant' Anna; 2016/9/15-17 (Matera, Italy)

[図書] (計 10 件)

1. Horie Y, Kitaichi N. Nova Science Publishers, Clinical effects of bilberry extract on eyestrain. Chapter 4. Occurrences, structure, biosynthesis, and health benefits based on their evidences of medicinal phytochemicals in vegetables and fruits Vol 5. 2016; 282(97-109)
2. Kitaichi N, Ohno S, Dong Z. Springer, Sarcoidosis. Case Report 66. Intraocular Inflammation. 2016; 1609(1576)
3. Ohno S, Kitaichi N, Kitamura M. Springer, Sarcoidosis. Chapter 75.

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石嶋 漢 (ISHIJIMA, Kan)
北海道大学・大学病院・医員
研究者番号：70634765

(2) 研究分担者

北市 伸義 (KITAICHI, Nobuyoshi)
北海道医療大学・個体差医療科学センター・教授
研究者番号：40431366

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし ()