

200908013A

厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業

黄斑変性カニクイザルを用いた補体抑制による加齢黄斑変性の予防薬の開発

平成21年度 総括研究報告書

平成22年5月

主任研究者 岩田 岳

独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター

厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業

黄斑変性カニクイザルを用いた補体抑制による加齢黄斑変性の予防薬の開発

(H21-政策創薬-一般-002)

平成21年度 総括研究報告書

平成22年5月

主任研究者 岩田 岳

独立行政法人国立病院機構東京医療センター

臨床研究センター（感覚器センター）

<http://www.kankakuki.go.jp>

黄斑変性カニクイザルを用いた補体抑制による加齢黄斑変性の予防薬の開発

班員名簿（平成22年5月現在）

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
主任研究者	岩田 岳	国立病院機構東京医療センター臨床研究センター	部長
分担研究者	岡田 秀親 吉川 泰弘 村上 晶 溝田 淳 安川 力 原 英彰 臼倉 治朗	株式会社蛋白科学研究所 東京大学大学院農学生命科学研究科 順天堂大学医学部眼科 帝京大学医学部眼科 名古屋市立大学医学部眼科 岐阜薬科大学薬効解析学研究室 名古屋大学エコトピア科学研究所	代表取締役・所長 教授 教授 教授 准教授 教授 教授
事務局	涌井 笑子	独立行政法人国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター（感覚器センター） 細胞・分子生物学研究室 〒152-8902 東京都目黒区東が丘2-5-1 TEL/FAX (03)3411-1026	秘書
経理事務担当	高橋 周子	独立行政法人国立病院機構東京医療センター 事務部 企画課 〒152-8902 東京都目黒区東が丘2-5-1 TEL : 03-3411-0111 FAX : 03-3411-0366 E-Mail : ShTakahashi@ntmc.hosp.go.jp	事務員

I. 総括研究報告

平成21年度 厚生省科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

黄斑変性カニクイザルを用いた補体抑制による加齢黄斑変性の予防薬の開発に関する研究

研究代表者 岩田 岳 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター部長

研究要旨:加齢黄斑変性の早期発見を目的として、加齢黄斑変性の感受性遺伝子の探索(特許出願)、血漿バイオマーカー(特許出願)、さらに霊長類医科学研究センターの若年性(遺伝性)の黄斑変性カニクイザルを用いて補体 C5a, C3b の活性を抑制する AcPepA 抑制薬, Compstatin20 による薬効試験を実施中である。毎月、眼底観察、蛍光眼底造影を行い、6ヶ月毎に網膜黄斑部の視機能を診断するために局所網膜電図を行っている。一部の疾患個体において、投与6ヶ月後の眼底観察ではドルーゼンが一部消失していることが確認されている。

分担研究者:岡田秀親・株式会社蛋白科学研究所・代表取締役、吉川泰弘・東京大学農学生命科学研究科・教授、村上晶・順天堂大学医学部眼科・教授、溝田淳・帝京大学医学部眼科・教授、安川力・名古屋市立大学医学部眼科・准教授、原英彰・岐阜薬科大学薬効解析学研究室・教授、臼倉治朗・名古屋大学エコトピア科学研究所・教授

A. 研究目的

本研究は独立行政法人国立医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで発見された世界で唯一の若年性(遺伝性)黄斑変性カニクイザルの病理学的及び分子生物学的解析結果に基づいて、補体活性抑制による加齢黄斑変性の予防薬の開発を目的とする。これまでの研究から疾患サルはヒト加齢黄斑変性の初期に(50歳以上)観察される網膜下の蓄積物(ドルーゼン)が生後2年で観察され、その組成に補体活性因子が含まれていることを発見した(Umeda, Iwata et al, IOVS 2005, FASEB J 2005)。さらに疾患個体は局所網膜電図(ERG)の分析によって黄斑部での光に対する反応が消失していることから、ヒトの萎縮型加齢黄斑変性に類似することが明らかになっている。神経網膜と血管豊富な脈絡膜の境に存在する1層の網膜色素細胞はバリアー機能や視細胞の食作用があり、加齢黄斑変性の発症と密接に関係している。疾患個体の網膜色素上皮細胞で抗原提示分子の大きな発現変動が観察され、タイトジャンクションタンパク質ZO-1が消失していることからバリアー

機能が破綻し、脈絡膜側から血漿が漏れて網膜下で補体活性が生じていると考えられる(Chi, Iwata et al, 投稿準備中)。

補体活性化による網膜下の局所的な炎症反応が加齢黄斑変性の主要原因とするならば、これを抑制することによる予防が期待される。補体活性経路である古典経路、2次経路、レクチン経路が合流する補体因子 C3a (C3a)を特異的に抑制するコンプスタチン(開発 Pennsylvania 大学 John Lambris 教授)の改良型を疾患個体8頭に硝子体投与し、ドルーゼンの消失が観察された(Chi, Iwata et al, Adv Exp Med Biol 2010)。この研究ではコンプスタチンを毎週硝子体投与したが、ヒトの患者の場合にはこの治療法は感染の危険性がともなう。

そこで補体活性経路の C3a の下流に位置し、生体内に存在する分子数も C3a の 1/100 の C5a を抑制する方法が考えられ、岡田秀親(名古屋市立大学名誉教授、(株)蛋白科学研究所所長)が開発した C5 抑制薬 AcPepA を今年度から静注によって投与を開始した。薬効評価は眼底観察、自発蛍光観察、黄斑部の視機能を評価するための局所網膜電図を毎月行っている。さらに、生体内での AcPepA の分解速度を考慮して、生体分解性素材に埋め込む叙放剤の開発を開始した。

B. 研究方法

(1) C5a 補体抑制薬 AcPepA の合成と徐放剤の開発:人への投与可能な cGMP 規格の AcPepA を依頼合成し、前臨床安全性試験で安全確認

を行う。株式会社蛋白研究所によって開発された補体因子 C5a 抑制薬は半減期が短いため硝子体内での適正濃度が維持されるように叙放剤の開発が進められている。叙放剤の材質には生体分解性（中期叙放）と非生体分解性叙放剤（長期叙放）が検討されている。

（2）薬効試験に用いる黄斑変性カニクイザルの選別：これまで行ってきた C3a 抑制薬コンプスタチンの薬効試験の経験から、利用する疾患個体は黄斑部にドルーゼンが数十個ほど集中する 5-10 歳の疾患個体を性別の割合を均等にして利用することが望ましいと考えられる。評価の指標はドルーゼンの形状変化、数、体積とし、細胞あるいは分子レベルでの評価は安楽死後、網膜切片、網膜色素上皮細胞の初期培養、質量分析計を用いた網膜及び血漿の網羅的なプロテオーム解析を行い、同年齢、同性別の健常個体と比較する。

（3）C5a 補体抑制薬 AcPepA の黄斑変性カニクイザルへの硝子体投与：平成 21 年度は AcPepA の静注を 2mg/Kg/週の条件で 2 頭、200 µg/month の条件で硝子体投与を 3 頭について開始する。硝子体投与の方法は全身麻酔の状態ヒトと同様な眼球表面の消毒プロトコールに従って行う。投与前と投与後（1 日、7 日、14 日）の房水・及び血漿のサンプリングを行い、生体内の AcPepA 量が補体抑制に十分量か検討しながら実験を進める。世界眼科研究会の共通した倫理的認識及び規則から硝子体投与は片眼のみとし、もう片眼については何ら処置を行わない。

（4）C5a 補体抑制薬 AcPepA の黄斑変性カニクイザルに対する薬効評価：硝子体投与の期間は C3a 抑制薬コンプスタチンの経験から 12-24 ヶ月はかかると予想される。この期間中主に眼底カメラによる撮影に加え、ハイデルベルグスペクトラリス HRA+OCT によってドルーゼンの数、形状、大きさについて情報を収集し、網膜断層像から網膜の 3 次元構造を各タイムポイントで記録し、継時的な変化を比較検討する。また、PET による神経網膜の形態についても解析する。

（5）C5a 補体抑制薬 AcPepA の黄斑変性カニクイザルの網膜細胞への影響について解析する：投与前に比べて顕著な薬効が確認された場合、あるいは最大試験期間の 30 ヶ月に達した場合に、薬効試験の疾患個体は全て安楽

死させ、眼球の解析を行う。解析内容としては、1) 硝子体成分の分析、2) 網膜切片の作成と光学顕微鏡用、電子顕微鏡用による細胞内外の観察、3) 網膜色素上皮細胞の AcPepA による影響を 2 次元電気泳動による網羅的プロテオーム解析及び DNA マイクロアレー

（カニクイザル用、FILGEN）による遺伝子発現解析によって行う。免疫関連遺伝子の変動やタイトジャンクションタンパク質 ZO-1 の局在が正常化しているか検証する。4) 網膜と網膜色素上皮細胞+脈絡膜のタンパク質及び RNA の抽出によって網膜色素上皮細胞と同様な解析を行い、同年齢の健常個体のデータと比較する。

（6）予防・治療法の条件設定を支援するためのデータベース構築：研究期間中に収集するデータはドルーゼンの数、形状、体積、網膜像、蛍光造影像、網膜断層像、網膜血管走行、細胞の機能解析（プロテオーム、遺伝子発現）、PET など様々なデータを収集することになる。これらの形式の異なるデータを関連付けるデータベースを構築し、補体抑制効果が最大限に得られる条件を推測する。

C. 研究結果

（1）黄斑変性カニクイザルの病理学的、分子細胞生物学的解析：疾患カニクイザルのドルーゼンについて継時的な観測を行った結果、早い個体では 1 歳後半から黄斑を中心にドルーゼンが現れ、生後 2-5 歳の間に急激にその数が増加する。黄斑部の局所 ERG を測定した結果、黄斑を中心として 5°、10°、15° の範囲で光に対する網膜の反応が消失していることが明らかになった。この結果、疾患サルは萎縮型黄斑変性を発症しており、ヒトの 20 倍の進行速度でドルーゼンが蓄積し、視機能が障害されることが確認された。

（2）疾患個体から分離培養された網膜色素上皮細胞のマイクロアレーを用いた遺伝子発現解析及びプロテオーム解析による蛋白発現解析：網膜色素上皮細胞は神経網膜と脈絡膜層を分離する重要なバリアの役目を果たしており、視細胞外節のどん食作用や各種成長因子の放出など、網膜の恒常性維持には不可欠である。この細胞の機能低下によってドルーゼンの蓄積が起こると予測されている。今回我々は重症、軽症、健常個体の網膜色素上皮細胞（RPE 細胞）を分離培養し、その増殖やタイトジャンクションタンパク質について観

察した結果、重症個体の RPE 細胞は他個体に比較して増殖能が顕著に低下していることが明らかになった。また、タイトジャンクションタンパク質の ZO-1 の発現が健常 RPE 細胞と比較して重症個体では細胞周辺に局在が観察されず、バリア機能が破綻していることが明らかにされた。ドルーゼンが早期に蓄積する根拠となる。また、これらの RPE 細胞について、カニクイザル専用の遺伝子発現解析用 DNA マイクロアレーを用いて発現遺伝子の比較を行った結果、MHCI 遺伝子ファミリーに 20-30 倍の差で発現が上下していることが明らかになった。MHCI 遺伝子は獲得免疫に関与するだけでなく、細胞の貪食作用にも関与しており、これら一連の機能が破綻していることによって、早期ドルーゼンの蓄積から視機能低下へと進行すると考えられる。世界的には萎縮型加齢黄斑変性の患者数が最も多いことから、本研究事業によって得られた情報の応用が期待される。

(3) 補体抑制薬による動物実験：補体抑制薬として補体因子 C5a と C3b をそれぞれ抑制する AcPepA と Compstatin20 について薬効試験を実施中である。一部の疾患の個体のドルーゼンが消失しているが、さらに観察が必要である。平成 22 年度の 6 月に評価を行い、薬効試験の実施方法について検討を行う。

(4) 若年性加齢黄斑変性カニクイザルの原因遺伝子の解明：2006 年に発表されたマカカ属の連鎖解析マーカーを用いて生存する個体から抽出された DNA 検体についてフラグメント解析に続き、連鎖解析が行われた。また、2007 年にはマカカ属のアカゲザルのゲノム配列が論文として報告され、その後徐々にアノテーションが終了した遺伝子配列、遺伝子多型、新たな連鎖解析マーカーがデータベース上で整備されてきた。これらの情報を利用しながら詳しく解析した結果、15p 領域に強く相関することが明らかになった。この領域は免疫関連分子がクラスターを形成して存在する場所であり、遺伝子解析と RPE 細胞の解析によって加齢黄斑変性における獲得免疫と自然免疫の関与を強く示唆する結果となった。

(5) 加齢黄斑変性リスク遺伝子の探索：国立病院機構の付属病院と順天堂大学医学部浦安病院眼科を中心として滲出型加齢黄斑変性の DNA 250 検体が集められた。このうち 200 の DNA 検体とコントロールとなる加齢性

白内障対象 200 DNA 検体について

Affymetrix GeneChip Human Mapping 500K Array Set を用いて全ゲノム相関解析を行った。その結果、染色体 1 番-22 番の中でボンフェローニ補正をクリアした 3 つの SNP が p 値 10^{-14} の確からしさで検出された。これらの SNP は全て染色体 10 番の同じローカスに存在し、仮想遺伝子の LOC387715 と HTRA1 遺伝子が存在する。LOC387715 はウエスタンブロットによって内在タンパク質が確認されておらず、non-coding RNA としての機能について解析中である。HTRA1 についてはノックアウトマウスを作製したが、生後 12 ヶ月でも網膜の異常が観察されなかった。そこで HTRA1 を高発現するトランスジェニックマウスを作製したところ、脈絡膜層が薄くなり、一部 RPE 細胞の萎縮が観察され、滲出型加齢黄斑変性を発症する土台が作られたと考えられる。このマウスはきわめて衛生的な環境で適正な食事で飼育されており、強い青色光（環境因子）や喫煙（習慣因子）を加えることによって加齢黄斑変性に類似する異常を発症できる可能性がある。米国での同様な解析では染色体 10 番に加え、1 番の補対 H 因子も相関するが、この領域については日本人の滲出型加齢黄斑変性は相関していない。欧米に比較して日本での加齢黄斑変性の患者数が少ないことや、滲出型の加齢黄斑変性が多いことはこれまで謎であったが、本研究によって遺伝的な回答が得られたと考えられる。これらの情報は早期診断法の確立だけでなく、発症機序の解明にもきわめて重要な発見であり、特許も出願された。

(6) 加齢黄斑変性血漿バイオマーカーの探索：血漿成分によって疾患の早期発見が可能か検討した。東レ株式会社及び参天製薬株式会社と共同開発した低分子量蛋白分画装置を用いてアルブミンやグロブリンなどの主蛋白が除かれ、その残りの分画について逆相クロマトグラフィーを行った結果、加齢黄斑変性と白内障のクロマトグラムには大きな違いが観察された。これからフラクションについてトリプシン処理を行い、2 次元クロマトグラフィーでさらに分画した後にイオントラップ型質量分析計によってプロテオーム解析が行われた。この結果、ユビキチンを含む複数のタンパク質が患者血漿で優位に検出された。これらのタンパク質は加齢黄斑変性の生体内で特異的にユビキチン化され、分解されて血漿中に漏出されると予測され、早期診断マーカー

一として利用に加えて、発症機序との関係で分解機構について研究中である。これらの結果は特許として出願された。

(7) 予防・治療法の条件設定を支援するための支援情報システムの構築：症例情報に加え、患者遺伝子情報、患者血漿蛋白情報をデータベース化し、検索できるシステムを構築中である。

D. 考察

本研究は霊長類医学科学研究センターの加齢黄斑変性カニクイザルの病理学的、分子細胞生物学的解析と補体抑制による加齢黄斑変性の予防法の開発を中心にヒト加齢黄斑変性の感受性遺伝子の解明や機能解析による萎縮型と滲出型の違いについて研究を行った。当初予定されていた研究内容については全て実行あるいは実行準備に着手したが、一部の実験については必要性の低下、あるいは研究期間内の実行が難しくなった。本研究によって加齢黄斑変性の基礎的情報から創薬について多くのことが明らかになり、引き続きこの研究を継続する予定である。

本研究の解析対象である黄斑変性カニクイザルは国内外の多数の研究者に注目されている。その原因として、生後2年でドルーゼンが観察され、ドルーゼンが過度に蓄積することによって黄斑の視機能が顕著に低下するような霊長類モデルが世界的に存在しないからである。優性遺伝によって疾患サルから生まれる半数が疾患個体であり、その確認に2年間しか要しないことから多数の疾患個体が確保されている。これまでに国内外の複数の企業から加齢黄斑変性の予防薬について薬効試験の依頼が寄せられている。

本研究が実施されている期間中に米国を中心に10社ほどが他の病気で開発された補体抑制薬を加齢黄斑変性に転用することを発表しており、2008年のアメリカ眼科アカデミーでも可能性が示された。しかし、多くの会社は補体活性経路（古典経路、2次経路、レクチン経路）の始点をターゲットにしており、2社のみがC3、C5をターゲットにしている。本研究は世界に先駆けて補体抑制の効果を示すことができた。

また、疫学調査が進んでいる先進国において、日本人に占める加齢黄斑変性の有病率や種類が異なっていることがこれまで指摘されてきたが、その理由に遺伝的な特徴が存在することを発見できたことは、日本人に適した

今後の予防・治療法の開発に方向性を示すことができたと考える。中国、韓国、台湾などでの同様な解析が注目される。

黄斑変性カニクイザルの連鎖解析やRPE細胞の遺伝子、プロテオーム解析から獲得免疫と自然免疫の双方が疾患の発症と強く関与していると考えられる。RPE細胞は視細胞の食食を一生継続するが、食食された細胞はオートファージ機構を使って分解され、そのペプチド断片がMHC分子によって認識・制御されている可能性がある。ドルーゼンの生成を解明する基礎的な研究として今後の進展が期待される。血漿プロテオーム解析においてユビキチン化されたタンパク質断片が加齢黄斑変性の患者血漿から検出されている。これらのタンパク質がどこに由来しているのか不明であるが、加齢黄斑変性の進行を組織中のタンパク質分解量で診断できる可能性が示唆された結果である。本研究で得られた遺伝子多型情報や血漿タンパク質情報は今後開発される予防薬の対象となる患者を分類するために必要な情報として利用され、テーラーメイド医療へと応用されることを期待する。

本研究は霊長類を疾患動物モデルとし、硝子体投与による薬効試験を行ったことにより、予想よりも実験に時間を要した。高い純度の補体抑制薬が調製され、毎週の硝子体投与にもかかわらず、炎症反応も観察されず1年間の薬効試験を無事に終わらせることができた。

E. 結論

本研究は加齢黄斑変性の原因解明と予防法の開発を目的として1) 世界で唯一の若年性黄斑変性カニクイザルの病理学的解析、2) 疾患サルを用いた補体抑制による予防法の開発、3) ヒト加齢黄斑変性のバイオマーカーの探索を目的とした感受性遺伝子の探索と機能解析、4) 血漿プロテオーム解析を行った。補体因子C4およびC3の活性化を抑えることにより、一部の疾患個体において、約半年でドルーゼンの拡散あるいは消失が確認された。また、日本人の滲出型加齢黄斑変性患者を対象とした感受性遺伝子の探索では染色体10番のLOC387715とHTRA1遺伝子領域に p 値 1.0×10^{-14} のSNPが3つ検出された。HTRA1のノックアウトマウスとトランスジェニックマウスを作製したところ、後者で脈絡膜の異常が観察された。血漿プロテオーム解析ではユビキチン化によって分解されたタンパク質が複数検出された。本研究で得られた補体抑制による予

防法、感受性遺伝子、血漿タンパク質に関する情報は加齢黄斑変性の今後研究に応用されると期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Chi Z, Yoshida T, Lambris JD, and Iwata T. Suppression of drusen formation by compstatin, a peptide inhibitor of complement C3 activation, on Cynomolgus monkey with early-onset macular degeneration. *Current Topics on Complement and Eye Disease, Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer (2010)

Okamoto H, Umeda S, Nozawa T, Suzuki MT, Yoshikawa Y, Matsuura ET, and Iwata T. Comparative proteomic analyses of macular versus peripheral retina in Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Experimental Animal* (2010)

Chi Z, Akahori A, Obazawa M, Minami M, Noda T, Nakaya N, Tomarev S, Kawase K, Yamamoto T, Noda S, Sasaoka M, Shimazaki A, Takada Y, and Iwata T. Overexpression of optineurin E50K disrupts Rab8 interaction and leads to a progressive retinal degeneration in mice. *Human Molecular Genetics* (2010)

Fujinami K, Akahori M, Fukui M, Tsunoda K, Iwata T, and Miyake Y. Stargardt disease with preserved central vision: identification of a putative novel mutation in ATP-binding cassette transporter gene. *Acta Ophthalmologica* (2010)

Fujikawa K, Iwata T, Inoue K, Akahori M, Kadotani H, Fukaya M, Watanabe M, Chang Q, Barnett EM, and Swat W. Vav2 and Vav3 as candidate disease gene for spontaneous glaucoma in mice and human. *PLOS One*

5:e9050 (2010)

Goto A, Akahori A, Okamoto H, Minami M, Terauchi N, Haruhata Y, Obazawa M, Noda T, Honda M, Mizota A, Tanaka M, Hayashi T, Tanito M, Ogata N, and Iwata T. Genetic analysis of typical wet-type age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Japanese population. *Journal of Ocular Biology, Disease, and Informatics* 2:164-175 (2009)

岩田岳、緑内障遺伝子改変動物の基礎、眼薬理 23:67-70 (2009)

学会発表

第113回日本眼科学会総会 (東京、2009, 4)
岩田岳、遺伝情報を応用した病態解析とモデル作成

第113回日本眼科学会総会 (東京、2009, 4)
関麻子、赤堀正和、岡本はる、皆見政好、寺内直毅、尾羽澤実、野田徹、本田美樹、溝田淳、田中稔、林彰、岩田岳、日本人における滲出型加齢黄斑変性のゲノムワイド相関解析

第113回日本眼科学会総会 (東京、2009, 4)
池在龍、皆見政好、安本史恵、尾羽澤実、赤堀正和、木村至、岩田岳、緑内障遺伝子WD R36トランスジェニックマウスの解析

第113回日本眼科学会総会 (東京、2009, 4)
木村至、岡本はる、池在龍、皆見政好、岩田岳、毛様体におけるRab8とERM Familyの局在についての検討

第34回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー (東京、2009, 9) 「失明に至る眼の疾患に挑む」岩田岳、加齢黄斑変性の霊長類モデル、遺伝子解析からの創薬ターゲット

第63回国立病院総合医学会 (仙台、2009, 10)
岩田岳、加齢黄斑変性の発症機序とモデル動物を用いた予防・治療法の開発

Iwata T, Chi Z, Akahori M, Obazawa M, Minami M, Noda T, Nakaya N, Tomarev S, Kawase K, Yamamoto T, Noda S, Sasaoka M, Shimazaki A. Susceptibility genes and animal models of

glaucoma. Asia Association for Research in Vision and Ophthalmology, (Hyderabad, India, 2009)

Iwata T. Japanese contribution to the global eye research—past, present and future. Asia Association for Research in Vision and Ophthalmology, (Hyderabad, India, 2009)

Iwata T. Proteomic analysis of low molecular weight plasma proteins from patients with ocular diseases. Asia Association for Research in Vision and Ophthalmology, (Hyderabad, India, 2009)

Iwata T, Chi Z, Akahori M, Obazawa M, Minami M, Noda T, Nakaya N, Tomarev S, Kawase K, Yamamoto T. Overexpression of Mutated Optineurin and WDR36 Leads to Normal Tension Glaucoma in Mice. Association for Research in Vision and Ophthalmology, (USA, Fort Lauderdale, 2009)

Chi Z, Okamoto H, Suzuki M, Terao K, Yoshikawa Y, Iwata T. Characterization of RPE Cells Isolated From Cynomolgus Monkey With Early-Onset Macular Degeneration. Association for Research in Vision and Ophthalmology, (USA, Fort Lauderdale, 2009)

Iwata T, Chi Z, Yoshida T, Fujinami K, Miyake Y, Mizota A, Suzuki MT, Terao K, Yoshikawa Y, Lambris JD, Olson P. Suppression of drusen formation by Compstatin (POT-4), a peptide inhibitor of complement component C3 activation, on cynomolgus monkey with early-onset macular degeneration. Aegean Conference (Crete, Greece, 2009)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録（平成20-21年度）

岩田岳
特願2008-091522 神経障害の検定のための

組成物、キットおよび方法

岩田岳
特願2008-092021 代謝障害を伴う疾患の検定のための組成物、キットおよび方法

岩田岳
特願2008-092245 老化、および血管障害を伴う疾患の検定のための組成物、キットおよび方法

岩田岳
特願2008-257469 コラーゲン線維の萎縮による組織障害の検査のための方法、組成物及びキット

岩田岳
特願2008-257430 糖尿病性末梢血管障害の検査のための方法、組成物およびキット

岩田岳
特願2008-257691 細胞増殖を伴う糖尿病合併症の検査のための方法、組成物およびキット

岩田岳
特願2008-241209 トランスジェニック動物

岩田岳
特願2008-267716 緑内障のリスクの予測方法

岩田岳
特願2008-272161 滲出型加齢黄斑変性のリスクの予測方法

3. その他

なし

II. 研究成果の刊行物・別刷

Suppression of Drusen Formation by Compstatin, a Peptide Inhibitor of Complement C3 activation, on Cynomolgus Monkey with Early-Onset Macular Degeneration

Zai-Long Chi¹, Tsunehiko Yoshida², John D. Lambris³, and Takeshi Iwata⁴

¹Division of Molecular & Cellular Biology, National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan, chizai-long@kankakuki.go.jp

²Division of Molecular & Cellular Biology, National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan, yoshidatsunehiko@kankakuki.go.jp

³Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA, lambris@mail.med.upenn.edu

⁴Division of Molecular & Cellular Biology, National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan, iwatatakeshi@kankakuki.go.jp

Abstract. For the past ten years, number of evidence has shown that activation of complement cascade has been associated with age-related macular degeneration (AMD). The genome wide association study in American population with dominantly dry-type AMD has revealed strong association with single nucleotide polymorphism (SNP) of complement genes. Protein composition of drusen, a deposit observed in sub-retinal space between Bruch's membrane and retinal pigment epithelial (RPE), contains active complement molecules in human and monkey. These evidences have leaded us to consider the possibility of suppressing complement cascade in the retina to delay or reverse the onset of AMD. To test is hypothesis we used the C3 inhibitor Compstatin on primate model with early-onset

macular degeneration which develop drusen in less than 2 years after birth. Our preliminary result showed drusen disappearance after 6 month of intravitreal injection.

1 AMD and association of complement related genes

The most prevalent eye disease for elderly Europeans and Americans is AMD. AMD is a blinding disorder characterized by a marked decrease in central vision associated with retinal pigment epithelial (RPE) atrophy with or without choroidal neovascularization (CNV). The non-neovascular type is called the dry-type AMD and includes more than 80% of the cases, and the neovascular type is called the wet-type AMD which is progressive with a higher probability of blindness. In some cases of CNV, the new vessels penetrate Bruch's membrane and pass into the subretinal space. The progressive impairment of the RPE and damage to Bruch's membrane and choriocapillaris results in retinal atrophy and photoreceptor dysfunction.

Genetic, behavioral, and environmental factors are believed to be involved for the onset of this disease. The prevalence of AMD differs considerably among the different ethnic groups, but the incidence increases with age in all groups. Epidemiological studies have shown that genetic factor play critical role for AMD. However, only a small proportion of the families with AMD show Mendelian inheritance, and the majority of the individuals inherit AMD in a complex multi-gene pattern. With the help of the haplotype marker project (HapMap Project), genome wide scanning has identified at least 13 loci linked to AMD on different chromosomes (Iyengar et al. 2004; Schick et al. 2003; Majewski et al. 2003). Other risk factors such as cigarette smoking, obesity, hypertension, and atherosclerosis are also associated with the disease.

Recently, a polymorphism of complement factor H (CFH) gene (Y402H) was shown to be associated with an increased risk for AMD (Klein

et al. 2005; Edwards et al. 2005; Haines et al. 2005; Hageman et al. 2005). These results were confirmed in many of the countries with large Caucasian populations but not in Japan (Okamoto et al. 2006; Gotoh et al. 2009). This gene is located on chromosome 1q25-31 where one of the candidate loci was identified by whole genome association studies by linkage markers. Another recent study reported that a haplotype association of tandemly located complement 2 and factor B (Gold et al. 2006) was protective and C3 (Yates et al. 2007) as risk for AMD. HTRA1, a serine protease 11 was recently discovered to be strongly associated with AMD (Yang et al. 2006; Dewan et al. 2006). Unlike the CFH, our study shows strongly association with this gene for Japanese AMD patients (Yoshida et al. 2007). This difference of gene association is probably related to the difference of AMD type dominant in each country. Our genome wide association study on Japanese population with typical wet-type AMD and polypoidal choroidal vasculopathy (PCV) shows significant association at p-value of 10^{-14} and 10^{-7} respectively for ARMS2/Htra1 locus. However when much lower associated SNPs of CFH or C3 or combined the odds ratio significantly increased (Goto, Akahori, et al. 2009)

2 Activated complement component in drusen

The early stage of the dry-type AMD is characterized by thickening of Bruch's membrane, aggregation of pigment granules, and increasing numbers of drusen. Drusen are small yellowish-white deposits that are composed of lipids, proteins, glycoproteins, and glycosaminoglycans. They accumulate in the extracellular space and the inner aspects of Bruch's membrane. Drusen are not directly associated with visual loss but represent a risk factor for dry-type AMD. The classification of hard and soft drusen is based on their size, shape, and color; hard drusen are yellowish with diameters $<50 \mu\text{m}$ and are found in eyes that are less likely to progress to advanced stages of the disease,

while soft drusen are darker yellow and larger in size, and are found in eyes more likely to progress to more advanced stages of AMD.

Both immunohistochemistry and proteomic techniques have shown that drusen are composed of molecules that mediate inflammatory and immune processes (Russell et al. 2000; Mullins et al. 2000). These molecules include components of the complement pathway and modulators of complement activation, viz., vitronectin, clusterin, membrane cofactor protein, and complement receptor-1. In addition, molecules triggering inflammation, amyloid P component, α 1-antitrypsin, and apolipoprotein E, were identified in drusen. Cellular debris from macrophages, RPE cells, and choroidal dendritic cells has been identified in drusen. Additional proteins such as crystallins, EEFMP1, and amyloid-beta have been also found in drusen. The presence of immunoreactive proteins and the oxidative modifications of many proteins in drusen imply that both oxidation and immune functions are involved in the pathogenesis of AMD. Finding of these molecules suggest that complement activation triggers innate immune responses in the subretinal space.

3 Cynomolgus monkey with early-onset macular degeneration

Over the past years non-human primates with well-defined fovea has been the target for AMD research. A monkey with macular degeneration was first described by Stafford et al in 1974. They reported that 6.6 % of the elderly monkeys they examined showed pigmentary disorders and drusen-like spots (Stafford et al. 1984). We also observed at approximately the same rate of disorder in elderly cynomolgus monkeys in the Philippines primate facility (SICONBREC) (Umeda et al. 2005). El-Mofty et al reported that the incidence of maculopathy was 50% in a colony of rhesus monkeys at the Caribbean Primate Research Center of the University of Puerto Rico (El-Mofty et al. 1978). In 1986, a single cynomolgus monkey (*Macaca*

fascicularis) with large number of small drusen in the macula was found in Tsukuba Primate Research Center at Tsukuba City, Japan (Nicolas et al. 1996; Nicolas et al. 1996; Suzuki et al. 2003). This single affected monkey has been bred to a large pedigree of more than 300 monkeys. Drusen are observed in the macula as early as two year after birth, and the number increase and spread toward the peripheral retina throughout life. Histological abnormalities of the retina and abnormal electroretinogram (ERG) were observed in sever case showing physiological dysfunction of the macula.

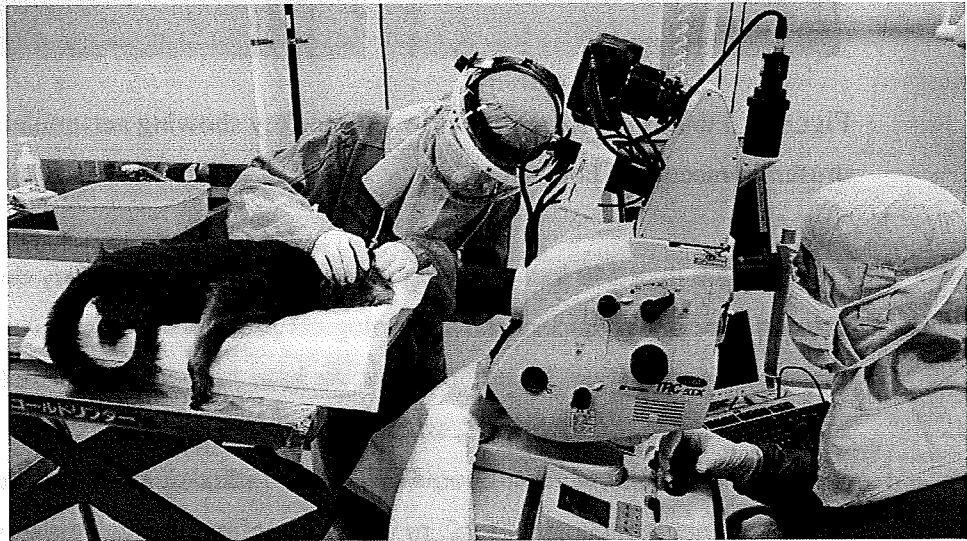


Figure 1. Fundus photography of affected monkey at TPRC.

Immunohistochemical and proteomic analyses of the drusen from these monkeys showed that the drusen were very similar to those in other monkeys with aged macular degeneration sporadically found in older monkeys and also with human drusen (Umeda et al. 2005; Umeda et al. 2005; Ambati et al. 2003). These observations have shown that TPRC monkeys produce drusen that are biochemically similar to those in human AMD patients, but the development of the drusen occurs at an accelerated rate.

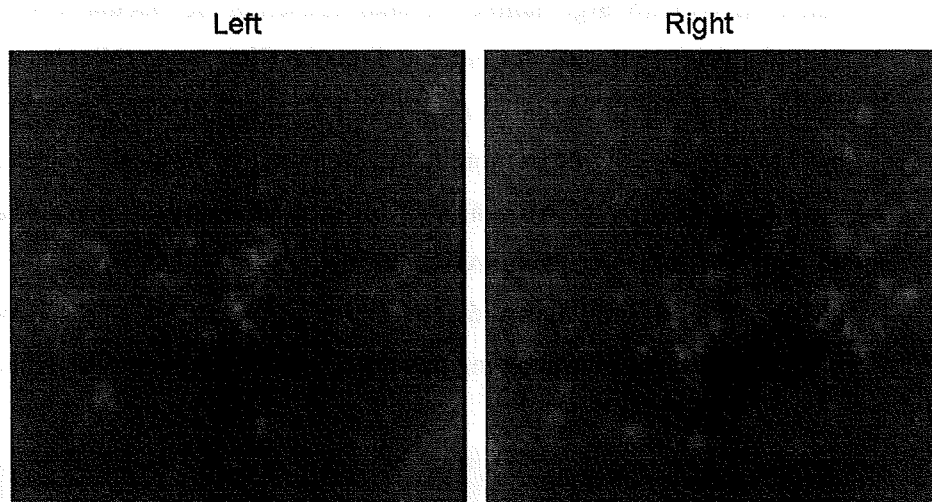


Figure 2. Fundus photograph of affected monkey showing accumulation of drusen in macula of both eyes.

More than 240 loci are being investigated to try to identify the disease causing gene and to understand the biological pathways leading to complement activation. Simultaneously, we have been studying a colony of aged monkeys in SICONBREC, which develop drusen after 15 years of birth. Drusen components of these sporadically found affected monkeys were compared with human and TPRC monkeys by immunohistochemistry and proteomic analysis using ion spray mass spectrometer. Significant finding was that drusen contained protein molecules that mediate inflammatory and immune processes. These include immunoglobulins, components of complement pathway, and modulators for complement activation (e.g., vitronectin, clusterin, membrane cofactor protein, and complement receptor-1), molecules involved in the acute-phase response to inflammation (e.g., amyloid P component, α 1-antitrypsin, and apolipoprotein E), major histocompatibility complex class II antigens, and HLA-DR antigens (Umeda et al. 2005). Cellular components have also been identified in drusen,

including RPE debris, lipofuscin, and melanin, as well as processes of choroidal dendritic cells, which contribute to the inflammatory response. The presence of immunoreactive proteins and oxidative modified proteins implicate both oxidation and immune functions in the pathogenesis of affected monkeys.

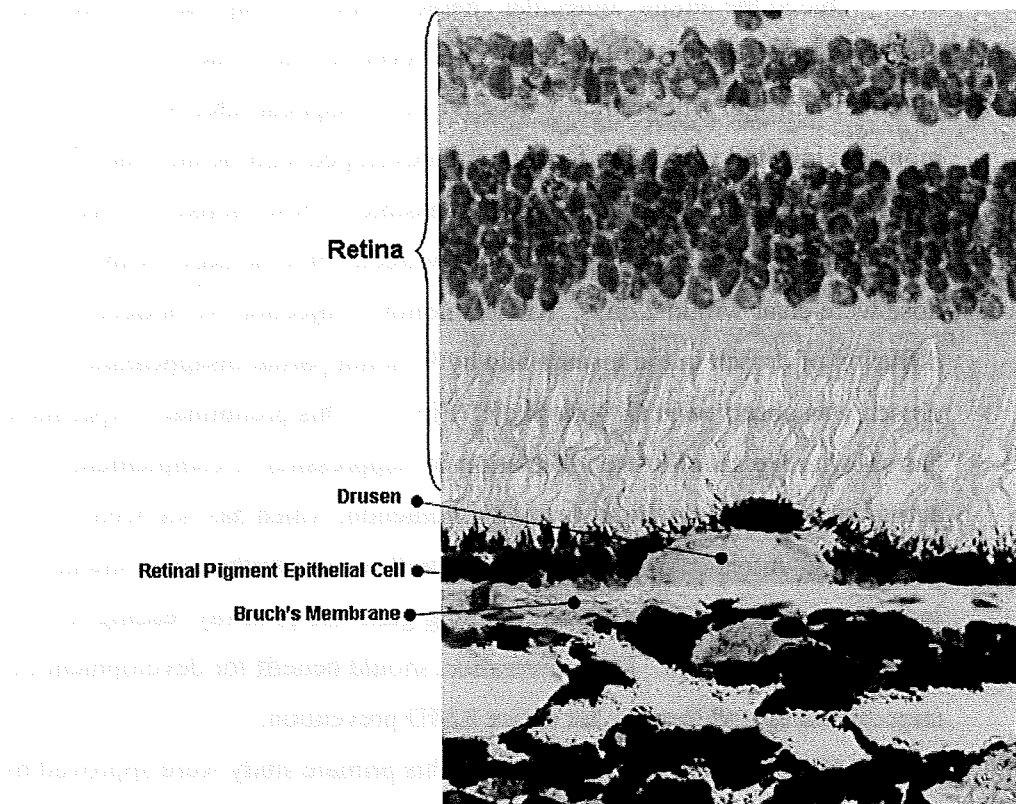


Figure 3. Retinal histological section of affected monkey showing the accumulation of drusen.

4 Suppression and reversal of drusen formation by compstatin

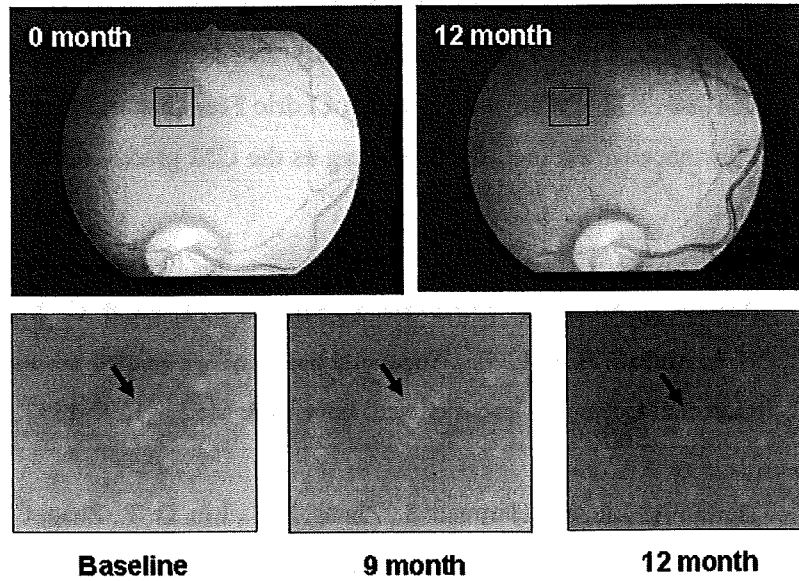
To test the effect of long term suppression of complement activation in the retina, an cyclic analogue (Ac-I[CV(1MeW)QDWGAHRC]T-NH₂) of the small cyclic synthetic peptide compstatin (Katragadda, M. et al. 2006) was

intravitreally injected into 8 affected monkeys at different dose and intervals. Four affected monkeys were injected at 1 mg dose at one month interval while other four affected monkeys at 50 μ g dose at one week interval. Both 1 mg or 50 μ g dose were dissolved in 100 μ l of saline solution, filtrated and intravitreally injected using 30G needle.

Due to the unique molecular characteristic of compstatin, immediately after injection, compstatin precipitate and form gel-like structure in the vitreous. This gel will gradually dissolve and disappear after 6 month. Four monkeys injected with 1 mg for 3 month developed significant opacity to the point where fundus observation was impossible. These monkeys were halted for further injection. On the other hand, vitreous of 4 monkeys with 50 μ g dose were clear within 2 days. After 6 month of injection we noticed diffusion of drusen in the macula and by 9 month partial disappearance of drusen was observed in all 4 monkeys (Fig. 4). This preliminary experiment has shown reversal of drusen formation by suppression of complement activation. To explain this reversal phenomenon, which has not been observed in untreated affected monkeys, will require further experiments including identification of disease causing gene and pathway leading to complement activation. The information should benefit for development of improved drug and therapy for future AMD prevention.

All experimental procedures for this primate study were approved by the Animal Welfare and Animal Care Committee of the TRPC and the Experimental Animal Committee of the National Tokyo Medical Center. The facilities are accredited by the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC International). Monkeys were routinely examined for physical and ophthalmic conditions by veterinarians and by ophthalmologists, respectively.

A) Affected Monkey 1 (♀ 16 years old)



B) Affected Monkey 2 (♂ 4 years old)

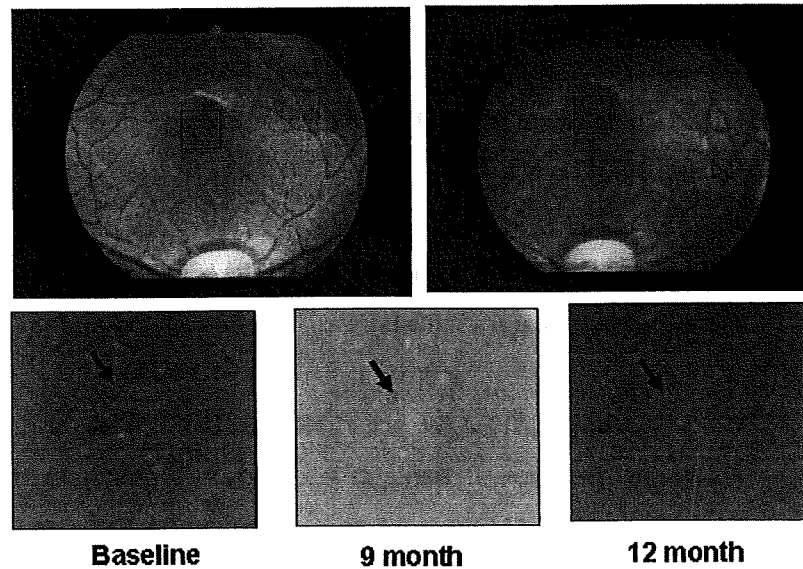


Figure 4. Suppression and reversal of drusen formation after 9 month of intravitreal injection of 50 μ l compstatin at one week interval.