

20110800/B

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21～23年度 総合研究報告書

平成24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-創薬-一般-002)

平成21～23年度 総合研究報告書

平成24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24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 臼倉治朗 阿部俊明	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 (H22. 5. 31 迄) 北里大学獣医畜産学研究科 (H22. 6. 1 より) 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 名古屋大学エコトピア科学研究所 東北大学医学系研究科創生応用センター	所長 教授 教授 教授 教授 准教授 教授 教授
事務局	能見けいこ	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） 分子細胞生物学研究室 〒152-8902 東京都目黒区東が丘2-5-1 TEL：03(3411)0111（内 8659） FAX：03(3411)1026 E-Mail：nomikeiko@kankakuki.go.jp	秘書
経理事務担当	薄根芳彦	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（内 2122） FAX：03-3411-0366 E-Mail：yusune @ntmc.hosp.go.jp	業務班長

目 次

I. 総合研究報告

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

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
岡田秀親	愛知淑徳大学医学福祉部視覚科学専攻
吉川泰弘	東京大学大学院農学生命科学研究科 (H22. 5. 31 迄) 北里大学獣医畜産学研究科 (H22. 6. 1 より)
村上 晶	順天堂大学医学部眼科
溝田 淳	順天堂大学医学部浦安病院眼科
安川 力	名古屋市立大学大学院医科学研究所
臼倉治朗	名古屋大学エコトピア科学研究所
阿部俊明	東北大学医学系研究科創生応用センター

II. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総合研究報告

平成21～22年度 厚生省科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

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：加齢黄斑変性は加齢、感受性遺伝子、環境因子によって発症する多因子性疾患と考えられている。その直接的な原因として網膜色素上皮細胞周辺における補体の活性化がある。補体の活性化の原因はまだ解明されていない。本研究は加齢黄斑変性の新規予防法の開発を目的として、若年性の黄斑変性カニクイザルを用いた補体 C5a, C3a の抑制薬、Compstatin および AcPepA によるドルーゼン抑制試験を目的とする。静注、硝子体投与から徐放剤を用いた長期的連続投与へと開発を進展させている。

分担研究者：溝田淳・帝京大学医学部眼科・教授、木村至・順天堂大学眼科・准教授、谷戸正樹・島根大学医学部眼科・講師、渡辺すみ子・東京大学医科学研究所再生基礎医科学寄付研究部門・特任教授、原英彰・岐阜薬科大学薬効解析室・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法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貪食作用があり、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)蛋白質科学研究所所長）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：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。株式会社蛋白質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）と非生体分解性叙法剤（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 について静注、硝子体投与を実施したが、静注による効果は一週間間隔でも確認できなかった。硝子体投与については一週間の間隔でのみ有効であることが明らかとなった。1 回の投与量は 100 μ l である。

(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。さらに平成 23 年度は次世代シーケンサーによるエクソーム配列解析によって原因遺伝子を解明する予定である。

(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-2 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 1.0×10^{-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

ー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細胞は視細胞の貪食を一生継続するが、貪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

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)

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)

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)

Chi Z, Yasumoto F, Sergeev Y, Minami M, Obazawa M, Kimura I, Takada Y, and Iwata T. Mutant WDR36 directly affects axon growth of retinal ganglion cells leading to progressive retinal degeneration in mice. Human Molecular Genetics (2010)

Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y, Fukuda Y, Ishiura H, Tsuji S, Hatase T, Nakamura M,

Ohde H, Itabashi T, Okamoto H, Takada Y, and Iwata T. Dominant mutations in RP1L1 gene are responsible for occult macular dystrophy. The American Journal of Human Genetics (2010)

Shen X, Ying H, Qiu Y, Park J-S, Shyam R, Chi Z-L, Iwata T, Yue BYJT. Processing of optineurin in neuronal cells. The Journal of Biological Chemistry. J Biol Chem (2011)

Zi-Bing Jin, S. Okamoto, F. Osakada, K. Homma, J. Assawachananont, Y. Hirami, T. Iwata, M. Takahashi. Modelong Retinal Degeneration Using Patient-Specific induced Pluripotent Stem Cells. PLOS One e17084 (2011)

学会発表

感覚器シンポジウム (東京、2010, 3) 赤堀正和、加齢黄斑変性症およびポリープ状脈絡膜血管症における全ゲノム関連解析

第49回日本網膜硝子体学会 (大阪、2010, 11) 岩田岳、黄斑変性と黄斑ジスロトフィーの基礎研究

池 在龍、赤堀正和、安本史恵、Yuri Segreev、皆見政好、尾羽澤実、野田徹、Naoki Nakaya、Stanislav Tomarev、川瀬和秀、山本哲也、野田節子、笹岡正顕、島崎敦、木村至、高田雄一郎、岩田 岳、緑内障遺伝子 OPTN、WDR36 トランスジェニックマウスの作製とその解析

3rd Retina Research Meeting (東京、2010, 12) 赤堀正和、オカルト黄斑変性症原因遺伝子の解明

I. Kimura, H. Okamoto, Z.-L. Chi, M. Akahori, M. T. Suzuki, T. Iwata. Analysis of Colocalization of Rab8 and ERM Family in the Ocular Body. ARVO2010 ANNUAL MEETING (Fort Lauderdale, USA, 2010)

T. Iwata, Z.-L. Chi, M. Akahori, Y. Takada, N. Nakaya, S. Tomarev, Y. Sergeev. CHARACTERIZATION OF GLIA CELLS IN OPTN AND WDR36 TRANSGENIC MICE 19th International Congress for Eye

Research. (Montreal.CANADA.2010)
H. Okamoto, Z.-L. Chi, M. Minami, N. Terauchi, Y. Haruhata, M. Obazawa, T. Noda, M. Honda, A. Mizota, M. Tanaka, K. Matsuno, K. Tanahashi, J. Utsumi, T. Iwata.
ENRICHMENT AND ISOLATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT PROTEIN IN PLASMA FROM PATIENTS WITH OCULAR DISEASES USING A PROTEIN SEPARATOR. 19th International Congress for Eye Research. (Montreal.CANADA.2010)

Chi ZL, T. Toshida, K. Fujinami, Y. Miyake, A. Mizota, M. Suzuki, K. Terao, Y. Yoshikawa, J.D.Lambris, P. Olson, T. Iwata.
SUPPRESSION OF DRUSEN FORMATION BY COMPSTATIN (POT-4), A PEPTIDE INHIBITOR OF C3 ACTIVATION, ON CYNOMOLGUS MONKEY WITH EARLY-ONSET MACULAR DEGENERATION. 19th International Congress for Eye Research. (Montreal.CANADA.2010)

Chi ZL, Akahori M, Obazawa M, Minami M, Noda T, Nakaya N, Tomarev S, Kawase K, Yamamoto T, Noda S, Sasaoka M, Shimazaki A, Sergeev Y, Takada Y, Iwata T. Overexpression of mutant OPTN and WDR36 leads to a progressive retinal degeneration in mice. 50th American Society for Cell Biology. (Philadelphia.USA.2010)

書籍

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. Inflammation and retinal disease: complement biology and pathology. John D. Lambris Anthony P. Adamis. 127-135. Springer. (2010)

岩田岳、「眼科と補体」、『補体への招待』木下タロウ編、189-193、メディカルビュー社(2011)

岩田 岳、「視力・資格を司る黄斑の生理機能と黄斑変性の分子メカニズム」、『実験医学』、加我君孝編、526-532、羊土社(2011)

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)
なし

3. その他
なし

平成22～23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：加齢黄斑変性は加齢、感受性遺伝子、環境因子によって発症する多因子性疾患と考えられている。その直接的な原因として網膜下における補体の活性化がある。補体の活性化の原因はまだ詳細には明らかにされていないが、網膜色素上皮細胞周辺における酸化脂質の沈着、視細胞貪食作用の低下による細胞内への未消化タンパク質の蓄積などが考えられている。発症までに何十年もの時間があり、この期間に進行を遅らせる、あるいは止める手段が求められている。本研究は加齢黄斑変性の新規予防法を開発を目的として、若年性の黄斑変性カニクイザルを用いた補体 C5a, C3b の抑制薬、AcPepA および Compstatin によるドルーゼン抑制効果を検証することを目的とする。静注や硝子体投与から徐放剤を用いた長期的連続投与へと開発を進展させた。

分担研究者：岡田秀親・(株) 蛋白科学研究所・
所長、吉川泰弘・北里大学獣医畜産学研究所・
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、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法を開発を目的とする。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貪食作用があり、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。

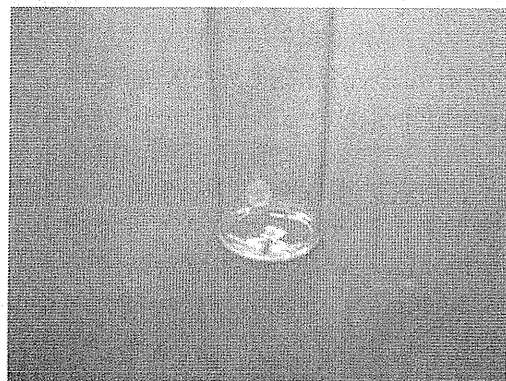
そこで補体活性経路のC3aの下流に位置し、生体内に存在する分子数もC3aの1/100のC5aを抑制する方法が考えられ、岡田秀親（名古屋市立大学名誉教授、(株)蛋白科学研究所所長）が開発したC5抑制薬AcPepAを今年度から静注によって投与を開始した。薬効評価は眼底観察、自発蛍光観察、黄斑部の視機能を評価するための局所網膜電図を毎月行っている。さらに、生体内でのAcPepAの分解速度を考慮して、生体分解性素材に埋め込む徐放剤の開発を開始した。

B. 研究方法

(1) C5a 補体抑制薬 AcPepA の合成と徐放剤の開発：cGMP 規格の AcPepA を依託合成し、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に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 C3b 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した。

(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 頭について行った。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。世界眼科研究会議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。さらに 23 年度は AcPepA を徐放剤(わかもろ製薬製造、特許検討中)に封入し(下写真)、疾患個体 6 頭に硝子体に 3 粒投与した。



(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 Compstatin について静注、硝子体投与、徐放剤の硝子体投与を実施したが、静注による効果は一週間間隔でも確認できなかった。硝子体投与については一週間の間隔でのみ有効であることが明らかとなった。1回の投与量は $100 \mu\text{l}$ である。徐放剤は一定期間に連続的に投与できることからより鮮明な効果が得られる。しかし最長でも1年の徐放効果かしくなく、手術する必要性から患者への負担が大きい。

(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。さらに平成23年度は次世代シーケンサーによるエクソーム配列解析によってエクソン配列が解読され、アカゲザルのゲノム配列に対してきれいなマッピングに成功した。家系内の疾患と健常個体を比較して、原因遺伝子が絞り込まれた。今後は機能解析によって網膜下での補体活性との関連を研究中である。

(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 はウエスタンプ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因子も関連するが、この領域については日本人の滲出型加齢黄斑変性は関連していない。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 I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り利用され、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C5aおよびC3b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製作したところ、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

Shen X, Ying H, Qiu Y, Park J-S, Shyam R, Chi Z-L, Iwata T, Yue BYJT. Processing of optineurin in neuronal cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2011;286:3618-29

Kabuto T, Takahashi H, Goto-Fukuura Y, Igarashi T, Akahori M, Kameya S, Iwata T, Mizota A, Yamaki K, Miyake Y, Takahashi H. *Molecular Vision* 2012;18:1031-9

Hara K, Akahori M, Tanito M, Kaidzu S, Ohira A, Iwata T. Analysis of LOXL1 gene variants in Japanese patients with branch retinal vein occlusion. *Molecular Vision* 2011;17:3309-13

Tsunoda K, Usui T, Hatase T, Yamai S, Fujinami K, Hanazono G, Shinoda K, Ohde H, Akahori M, Iwata T, Miyake Y. Clinical characteristics of occult macular dystrophy in a large family with mutation of RP1L1 gene. *Retina* 2012; Mar 29 epub

Fujinami K, Akahori M, Fukui M, Tsunoda K, Iwata T, Miyake Y. Stargardt disease with preserved central vision: identification of a putative novel mutation in ATP-binding cassette transporter gene. *Acta Ophthalmologica* 2011;89(3):e297-8. doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01848.x

Jin ZB, Okamoto S, Osakada F, Homma K, Assawachananont J, Hirami Y, Iwata T, Takahashi M. Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2011;6(2):e17084

書籍

岩田岳、「眼科と補体」、『補体への招待』木下タロウ編、189-193、メディカルビュー社 (2011)

岩田 岳、「視力・資格を司る黄斑の生理機能と黄斑変性の分子メカニズム」、『実験医学』、加我君孝編、526-532、羊土社 (2011)

学会発表

第115回日本眼科学会 (東京、2011年5月) 小林宏明、岡本はる、池在龍、村上晶、岩田岳、黄斑変性カニクイザルにおける血漿プロテオーム解析

Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y, Fukuda Y, Ishiura H, Tsuji S, Usui T, Hatase T, Nakamura M, Ohde H, Itabashi T, Okamoto H, Takada Y, and Iwata T. Dominant mutations

in RP1L1 are responsible for occult macular dystrophy. ARVO (Fort Lauderdale, USA, May 2011)

Chi Z, Katakai Y, Shimozawa N, Suzuki MT, Iwata T. Microarray analysis of RPE cells isolated from cynomolgus monkey with early-onset drusen formation. ARVO (Fort Lauderdale, USA, May 2011)

Kobasyashi H, Okamoto H, Chi Z, Murakami A, Iwata T. Plasma proteome analysis on cynomolgus monkey pedigrees with early onset drusen formation. ARVO (Fort Lauderdale, USA, May 2011)

Iwata T, Chi Z, Yoshida T, Fujinami K, Miyake Y, Mizota A, Katakai Y, Suzuki MT, Shimozawa N, Yoshikawa Y, Lambris JD. Inhibition of drusen formation by Compstatin in cynomolgus monkey with early-onset macular degeneration. 5th International Complement Therapeutics Conference, Aegean Conferences (Rhodes, Greece, June 2011)

Iwata T, Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y, Fukuda Y, Ishiura H, Tsuji S, Usui T, Hatase T, Nakamura M, Ohde H. Dominant mutations in RP1L1 are responsible for occult macular dystrophy (Miyake's Disease). ASHG (Montreal, Canada, October 2011)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録（平成20-21年度）

なし

3. その他

なし

平成21～23年度 厚生省科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

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

分担研究課題：「補体因子C5aの抑制薬AcPepAの合成」

分担研究者 岡田 秀親（蛋白質科学研究所 所長）

研究要旨：補体活性経路のC3の下流に位置し、生体内に存在する分子数もC3の1/100のC5から生成されるC5aは強い起炎作用を持つ。このC5aをターゲットとして抑制する相補性ペプチドを創生する方法を開発した。我々が新規に開発したC5a抑制薬AcPepAは、すでにカニクイザルの敗血症モデルで毒性試験や薬効試験ですぐれた成績を示している。本研究では加齢黄斑変性の新規予防・治療薬として国立医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターの黄斑変性カニクイザルに対する補体抑制ペプチドの薬効試験ならびに叙放剤の開発を目的とするものである。

A. 研究目的

C5a アナフィラトキシンは、敗血症や多臓器不全等の重篤な病態の要因のひとつである。我々は、C5a アナフィラトキシンに対して特異的に強い阻害作用を持つ17アミノ酸から成るペプチドPepAを創生した。100%のラットがショック死を起こす動物実験モデルにおいて、PepAの静脈注射で全例を救命できた。PepAのアミノ末端をアセチル化したAcPepAはさらに強い効果を発揮した。致死量のLPS(4mg/kg)を投与したカニクイザルにAcPepAを静脈内持続投与すると7頭のサル全てを救命できた。ブタ新生児の開腹を行い、回盲部を結札して穿孔して糞便が腹腔内に漏出して起こさせた致死的急性腹膜炎モデル(CLPモデル)でも延命効果を認めた。その際、炎症に伴って血中に増加するHMGB1の上昇が抑えられている知見を得た。AcPepAの投与でC5aを阻害すると、HMGB1の放出を抑えサイトカインストームの悪循環を防ぐことが分かった(Nature Precedings 5727.1 2011; Anticancer Res, 31:2522, 2011)。そのメカニズムは以下のごとくである。侵入異物に対する補体反応の結果生成されるC5aアナフィラトキシンが、好中球やマクロファージなどの炎症細胞のC5aレセプター(C5aR)に反応して炎症細胞を活性化すると、新規な第二のC5aRであるC5L2が発現誘導され、そのC5L2に、C5aが作用するとHMGB1を放出する。HMGB1は核内タンパク質で遺伝子発現にかかわる分子であるが、細胞が破壊されると漏出し、細胞破壊を起こす事象が起こったこ

とを生体防御反応系に感知させる指令分子としての役割を果たす。ところが、このHMGB1は、炎症性細胞(好中球やマクロファージなど)が活性化されると発現するC5L2にC5aが反応すると、細胞破壊なしにHMGB1が放出されることが明らかになった。すなわち、補体活性化を起こすような事態になると、C5aが生成され、C5aが炎症性細胞を活性化するとともに、発現誘導されたC5L2にC5aがさらに反応して刺激するとHMGB1の放出を起こす反応を起こす。このHMGB1はTLR4(Toll-Like Receptor 4)にLPSと同様に反応して活性化炎症細胞から種々の炎症性サイトカインを放出させる内因性リガンドとして働き、炎症拡大反応を促進する。これがサイトカインストームの基本原則と考えることができる。したがって、C5aを阻害する作用を持つAcPepAを投与することにより致死的サイトカインストームを防ぎ救命効果を発揮したと解釈できた。

このようにセプシスショック病態に救命効果を発揮するAcPepAを臨床に応用実用化するために、GLP基準での非臨床安全性試験(前臨床安全性試験)を実施し、安全性に問題はないとの知見が得られている。このGLP-AcPepAが加齢黄斑変性の予防と治療にも有用であることを明らかにするために、GLP-AcPepAを当該研究班に提供して臨床応用への展開を図るのが目的である。

B. 研究方法

cGMP-AcPepAペプチドを(株)クラボウがエージェントになっている、米国のPoplypeptide Kaboratries San Diego (PPL-SD社)に依頼し

て合成する。cGMP-AcPepA を(株)わかもと社に
供与し、徐放剤化をしてもらう。この徐放剤
化した粒子を黄斑変性を起こすカニクイザル
の眼球内に注入し、黄斑変性に対する防止効
果、治療効果の有無を観察する。

(倫理面への配慮)

動物実験においては、いずれの実験も動物へ
の苦痛を軽減する処置を取ること、使用動物
数を最小限にすること、苦痛を与えないよう
十分な麻酔をかけること、手術処置は両眼で
なく片眼のみに行う等、invitro 試験等の代
替法を導入するなど動物愛護上の注意を心が
け、所属施設の「動物実験倫理委員会」の承
認を得る。

C. 研究結果

GMP-AcPepA を徐放剤とした粒剤を黄斑変性
カニクイザルの眼球内に投与して観察を実施
した。しかし、黄斑変性の病態を抑制する効
果は眼底観察検査では認めるには至らなかつ
た。GMP-AcPepA を、週に1回ずつ点滴静注す
る試みでも、黄斑変性を抑制する治験は得ら
れていない。

D. 考察

眼球内に AcPepA 徐放剤を投与しても、黄
斑部の組織に充分量を到達させることの効率
について検討を重ねる必要があると考えられ
る。それに対し、点滴静注する場合には動脈
血流から黄斑部への分布を期待できるので、
点滴静注の頻度を高めて実施する試みは検討
してみたい。

E. 結論

目下のところでは、治療効果を認めるには
至っていない。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nakamura, M., Tanaka, H., Nagayoshi, Y.,
Nakashima, H., Tsutsumi, K., Ohtsuka, T.,
Takahata, S., Tanaka, M., and Okada, H.
Targeting the hedgehog signaling pathway
with interacting peptide to Patched-1. *J.*
Gastroenterol. 47: 452-460, (2012).
Okada, H., Imai, M., Ono, F., Okada, A.,
Tada, T, Mizue, M., Terao, K. and Okada, N.
Novel therapeutic agents designed as a
complementary peptide to target molecules

Anticancer Res. 31:2511-2516 (2011)

Okada, N., Imai, M., Okada, A., Ono, F.
Okada, H. HMGB1 release by C5a anaphyl-
atoxin is an effective target for sepsis
treatment. *Nature Precedings*, 5727.1
(2011)

Tokodai, K., Goto, M., Inagaki, A.,
Nakanishi, W., Nilsson, B., Okada, N.,
Okada, H., Satomi, S. Attenuation of the
cross-talk between the complement and
coagulation cascades by C5a blockade
improves early outcomes after intraportal
islet transplantation. *Transplantation*
90(12) 1358-2010 (2011)

2. 学会発表

1 Asai, S., Imai, M., Kimbara, N., Tada, T.,
Campbell, W., Okada, H., Okada, N.
Procarboxypeptidase R deficiency causes
increased lethality in concanavalin
A-induced hepatitis in female mice. XXIII
International Complement Workshop Aug
1-5, 2010, New York *Mol Immunol* 47, issue
13, p2199, Aug 2010

2 Mizuno, M., Ito, Y., Mizuno, T., Suzuki,
Y., Noda, Y., Yamada, K., Harris, CL.,
Okada, N., Margan, BP., Matsuo, S. Membrane
complement regulators may protect against
encapsular peritoneal inflammation model
of zymosan peritonitis in the rat. XXIII
International Complement Workshop Aug
1-5, 2010, New York *Mol Immunol* 47, issue
13, p2270, Aug 2010

3 Okada, N., Ono, F., Okada, A., Asai, S.,
Imai, M., Terao, K., Okada, H. An
inhibitory peptide of C5a anaphylatoxin
rescues monkeys from lethal endotoxin
shock by suppressing HMGB1 release. 14th
International Congress of Immunology Aug
23-27, 2010, Kobe *Int Immunol* 22 Sup.1:
ii137, Aug 2010

4 Okada, H., Goto, T., Hussein, MH., Kato,
S., Daoud, GH., Kato, T., Suguria, Y.,
Kakita, H., Nobata, M., Mizuno, H., Ito, T.,
Kato, I., Suzuki, S., Okada, N., Togari, H.
Endothelin receptor antagonist attenuates
inflammatory response and prolongs the
survival time in a neonatal sepsis model.
14th International Congress of Immunology

Aug 23-27, 2010, Kobe Int Immunol 22 Sup. 1: iii130, Aug 2010

5 Tokodai, K., Goto, M., Inagaki, A., Nakanishi, W., Okada, N., Okada, H., Satomi, S. Interruption of a cross-talk between the complement and coagulation cascade improves early outcomes after intraportal islet transplantation XXIII International Congress of the Transplantation Society Aug 15-19, 2010 Vancouver

6 新型 H1N1 インフルエンザの重症化における補体アナフィラトキシンの関与 太田里永子、伊藤嘉規、鳥居ゆか、木村宏、岡田則子、今井優樹 第47回補体シンポジウム講演集 47:26-27 (2010) 9/10-11 福島

7 正常ラット腹膜における膜補体制御因子の機能的解析 水野智博、水野正司、伊藤恭彦、鈴木康弘、野田幸裕、山田清文、丸山彰一、岡田則子、BP Morgan、松尾清一 第47回補体シンポジウム講演集 47:44-45 (2010) 9/10-11 福島

8 Tokodai, K., Goto, M., Inagaki, A., Nakanishi, W., Okada, N., Okada, H., Satomi, S. A strong candidate approach to prevent the instant blood-mediated inflammatory reaction in clinical islet transplantation Joint Meeting on IPITA-XTA 2009 Oct 12-16, 2009 Venice

9 Mohamed Hamed Hussein, Shin Kato, Tatenobu Goto, Ghada A. Daoud, Tetsuya, Ineko Kato, Satoshi Suzuki, Hajime Togari, Masaki Imai, Noriko Okada, Hidechika Okada An Acetylated Anti-C5a complementary peptide reduced cytokines and free radicals and prolongs survival time in a neonatal sepsis model 12th European Meeting on Complement in Human Diseases September 5-8, 2009 Visgrad Mol Immunol 46:2825, 2009

10 Mizuno, T., Mizuno, M., Morgan, B.P., Okada, N., Noda, Y., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Ito, Y. Specific collaboration between rat membrane complement regulators, Crry and

CD59, protects peritoneum from damage by autologous complement activation in peritonealdialysate fluid. 12th European Meeting on Complement in Human Diseases September 5-8, 2009 Visgrad Mol Immunol 46:2859-2860, 2009

11 今井優樹、Verera JC, Atkinson C, 太田里永子、岡田則子、Rapiserdo M, Tmolinson S 腫瘍細胞上の補体制御因子による T 細胞応答の制御 第46回補体シンポジウム講演集 46:24 (2009) 8/21-22 福岡

12 戸子台和哲、後藤昌史、稲垣明子、中西渉、岡田則子、岡田秀親、里見進 C5a を標的とした補体阻害ペプチド AcPepA 導入による移植後早期膵島障害の抑制 第46回補体シンポジウム講演集 46:45-46 (2009) 8/21-22 福岡

G. 知的所有権の取得状況

1 特許取得

* 『アナフィラトキシン C5a を不活性化するペプチド』特許権者: 岡田秀親、岡田則子 特許第4106691号 平成20年4月11日

* 『SIRS または強毒性インフルエンザ感染症処置のための医薬品組成物』発明者 岡田秀親、岡田有武、岡田則子 国際特許番号 W02011/004843 A1 国際公開日 2011年1月13日