

201324134A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
VCP阻害剤を用いた眼難治疾患に対する新規治療法開発に関する研究

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 池田 華子

平成26（2014）年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
VCP阻害剤を用いた眼難治疾患に対する新規治療法開発に関する研究-----	1
池田華子	

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

VCP阻害剤を用いた眼難治疾患に対する新規治療法開発に関する研究
研究代表者 池田 華子 京都大学大学院医学研究科 眼科学 助教

研究要旨

細胞保護作用が明らかになったVCP ATPase阻害剤であるKUS剤を用い、難治眼疾患である網膜中心動脈閉塞症および虚血性視神経症に対して、第一相医師主導治験実施に向けての諸準備を実施している。平成25年度には、薬効薬理試験として網膜中心動脈閉塞モデルでのKUS剤の効果を確認し、KUS剤のGMP製造に向けた合成法検討を行った。また、GLP毒性試験の準備として、KUS剤のバリデーション、血中濃度測定法確立、血中濃度の予備検討を行った。疾患レジストリ構築目的で、網膜中心動脈閉塞症および虚血性視神経症に対する前向き自然経過観察臨床研究のプロトコルを作成した。

研究分担者

吉村 長久：京都大学大学院医学研究科 教授
宮本 和明：京都大学大学院医学研究科 講師
辻川 明孝：京都大学大学院医学研究科 講師
垣塚 彰：京都大学大学院生命科学研究所 教授
清水 章：京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター 教授
池田 隆文：京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター 教授
三村 治：兵庫医科大学医学部 教授
石川 裕人：兵庫医科大学医学部 助教

起こす過程で重要な働きをする蛋白質である。京都大学ではVCPと呼ばれる細胞内の主要 ATPaseに対する阻害剤（KUS：Kyoto University Substance化合物）の開発に成功し、細胞種を超えて*in vivo*での細胞死を防御する作用、網膜の細胞を細胞死から保護する作用を有し、緑内障や網膜変性モデルマウスへの投与実験にて、網膜神経節細胞、視細胞の変性抑制効果のみならず網膜電図での機能保持が認められることが明らかになってきた（Ikeda OH et al. 投稿中）。したがって、この薬剤は緑内障や網膜色素変性のみならず、虚血性視神経症や中心動脈閉塞症など眼難治疾患に対しても、新たな治療薬となる可能性を検証する意義が生じてきた。

本研究では、希少眼難治疾患である虚血性視神経症および網膜中心動脈閉塞症に対し、京都大学で開発されたKUS剤を用い、医師主導治験を実施していく礎として、1) 両疾患に対する非臨床薬効薬理試験をおおまかに完了させること、2) KUS剤のGMP製造検討を行い、GMP製造体制を確立すること、3) 第I相医師主導治験に必要最低限のGLP毒性試験に着手・完了を目指すこと、4) さらに、被験者リクルートの観点から疾患レジストリの構築を行うこと、5) PMDA対面助言を通して、治験プロトコル作成準備を行うことを目的とする。本研究終了後、第I相医師主導治験準備予定である。

A. 研究目的

虚血性視神経症は、50歳以上の年間発症率が2-10人/10万人とされる希少疾患であり（*Am. J. Ophthalmol.*, 1997）、同様に眼虚血症候群に分類される網膜中心動脈閉塞症は、さらに発症人数が少なく、ともに網膜神経節細胞を中心とした網膜内層の変性・脱落による不可逆的な極度の視力・視野障害がおこる。両疾患ともに、詳細な発症機構は不明であり、確立した治療法が存在しないため、生活面での永続的な支障は大きい。

VCP(valosin-containing protein)（Kakizuka Aら*J. Biol. Chem.* 2010）は、細胞がストレス応答を引き

B. 研究方法

平成25年度は、以下を実施した。

1) KUS剤の急性神経節障害モデルに対する非臨床薬効薬理試験

網膜神経節細胞が蛍光標識されるthy1-CFPトランスジェニックマウスを用い、眼内（硝子体内）に*N*-methyl-D-aspartate (NMDA)を注射することで、急性網膜神経節細胞障害モデル（Nakano N, Ikeda OH ら *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 8754-8762 (2011)) を使用し以下の実験を行った。即ち、KUS121の全身（50mg/kg/day）投与、ならびに、硝子体内注射（5μg単回）投与を行い、同時蛍光眼底撮影の可能な光干渉断層計（Spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT); *Multiline OCT* (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany)) を用いて、網膜断層のSD-OCT画像およびCFP蛍光眼底撮影を行った（図1）。SD-OCT網膜断層像で網膜厚（GCC厚：網膜神経線維層、神経節細胞層、内網状層）を、CFP蛍光眼底撮影画像で、神経節細胞数を計測した。対照として、生理食塩水を全身・硝子体内投与したマウスを用いた。



図1 最新型同時蛍光眼底撮影可能な光干渉断層計

2) KUS剤の網膜中心動脈閉塞症に対する非臨床薬効薬理試験

網膜中心動脈閉塞症モデルとしては、虚血再灌流を用いた。網膜神経節細胞が蛍光標識された、thy1-GFPラット（*Archives of Facial Plastic Surgery* **12**, 315-320, 2010）の前房内に33Gカニューレを挿入し、眼圧を120mmHgまで上昇させた。眼底を観察し、網膜血管が虚脱していることを確認し、60分虚血を継続させた（図2）。

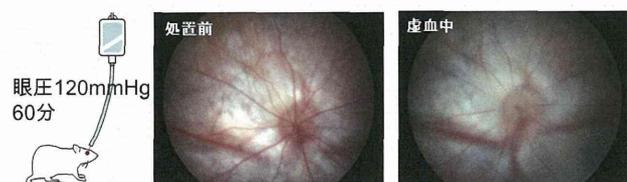


図2 網膜中心動脈閉塞モデル（虚血再灌流）ラット

KUS剤は腹腔内投与（50mg/kg/day）を行い、*Multiline OCT* を用いて網膜断層のSD-OCT撮影および、眼底GFP蛍光撮影を行った。SD-OCT網膜断層像で網膜内層（神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層）厚を、GFP蛍光眼底撮影画像で、神経節細胞数を計測した。対照として、生理食塩水を腹腔内投与したラットを用いた。

3) KUS剤の製造法・プロセス検討

KUS121剤のGMP製造に向けて、原薬の純度をあげ、安定した品質での製造が可能となるように、合成法の検討を行った。改良プロトコルにて製造したKUS121原薬に関して、試験項目設定を行い、HPLCにて、純度確認を行った。

4) GLP安全性試験予備検討

KUS121剤のGLP安全性試験に向けて、原薬の測定法確立、分析法バリデーションを行った。また、カニクイザルを用い、KUS 100 μgを硝子体内注射し、1, 2, 4, 24時間後に血液を採取し、血漿中のKUS濃度をHPLCにて測定した。

5) 疾患レジストリ構築

網膜中心動脈閉塞症および虚血性視神経症に関して、1) KUS剤の投与タイミングを確定、2) 無治療コントロールとしての自然経過、3) 発症早期での患者紹介体制構築を行う。自然経過観察に対する、臨床研究に関して、倫理委員会に申請した。

（倫理面への配慮）

動物実験に関しては、眼科動物研究のスタンダードであるARVOのガイドラインを遵守し、京都大学の「動物実験委員会」に申請し、承認を受けている（MedKyo13221）。患者臨床研究に際しては、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、すでに京都大学の倫理委員会にて承認済である（E1613, E1615）。

C. 研究結果

1) KUS剤の急性神経節障害モデルに対する非臨床薬効薬理試験

KUS全身投与および、硝子体注射投与ともに、網膜内層（GCC）厚は、対照生食投与群と比べて有意に厚く、NMDAによる菲薄化が抑制されていた。残存網膜神経節細胞に関しても、KUS投与群では、対照に比べて、有意に多く、細胞死の抑制効果があることが明らかになった。

2) KUS剤の網膜中心動脈閉塞症に対する非臨床薬効薬理試験

虚血再灌流ラットにおいては、2週間後に内層網膜の菲薄化が認められた。KUS剤投与群では、その菲薄化が有意に抑制されていた。また、網膜神経節細胞は、虚血再灌流後急速に減少したが、KUS剤投与群では、その減少が有意に抑制された。

3) KUS剤の製造法・プロセス検討

KUS剤の中で、動物実験での薬効、いくつかの安全性試験の結果、水溶性等の性質から、GMP原薬にはKUS121を用いることとした。結果、これまでのKUS121剤の製造工程を変更し、より高純度の原薬製造が可能となった。スケールアップ合成されたKUS121は、HPLCでの純度が99.4 area%であり、表のごとく、原薬としてほぼ問題ないことが確認できた。

	試験項目	Lot. 6328
1	外観	暗赤色、粉末
2	純度試験	
	(1) 塩化物	0.014%以下
	(2) 重金属	20ppm以下
	(3) ヒ素	2ppm以下
	(4) 類縁物質	総計0.65% (最大0.17%)
	(5) エタノール	0.55%
3	水分	0.57%

4) GLP安全性試験予備検討

生理食塩水を媒体とした調整液中のKUS121濃度測定を実施するために、特異性・検量線の直線性・オートサンプラー内の安定性・真度および併行精度に各々問題がないことを確認し、HPLC測定法が妥当であることが明らかになった。

また、カニクイザルを用い、KUS121を硝子体内

注射すると、注射後2時間をピークに、KUS121が血中で検出されることが明らかになった。また、注射後24時間では、血中にKUS121はほとんど検出されず、速やかに再分布またはクリアランスを受けることが明らかになった。

KUS121濃度					
血漿 (ng/mL)	0 h	1 h	2 h	4 h	24 h
	ND	4.71	6.82	4.83	ND

ND: Not determined, 定量値が得られなかった。

5) 疾患レジストリ構築

網膜中心動脈閉塞症および虚血性視神経症に関して、自然経過をみる前向き臨床研究に関し、分担研究者である、三村および石川と話し合いを持ち、研究プロトコルを作成した。主な測定項目および、測定タイミングは表のとおりである。

	初診	3日	1週	2週	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	6ヶ月
視力検査	○	○	○	○	○	○	○	○
中心フリッカー*	○	○	○	○	○	○	○	○
眼科一般臨床検査	○	○	○	○	○	○	○	○
視野検査	○	○	○	○	○	○	○	○
網膜感度検査	○	○	○	○	○	○	○	○
眼底写真撮影	○	○	○	○	○	○	○	○
OCT	○	○	○	○	○	○	○	○
MRI*	○							
一般採血	○							
蛍光眼底造影検査	○							

本臨床研究は、京都大学倫理委員会に申請し、E2047として承認された。

D. 考察および結論

KUS剤の薬効薬理試験、GMP製造検討、GLP安全性試験に対する予備検討が、順調に実施され、特に問題となる事項はなかった。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

投稿中、投稿準備中。

2. 学会発表

1) Tomoko Hasegawa, Hanako O. Ikeda, Yuki Muraoka, Akira Kakizuka, Nagahisa Yoshimura.

Neuroprotective effect of a valosin-containing-protein ATPase inhibitor on late-stage retinal degeneration in a mouse model. World Ophthalmology Congress 2014, 2014. 4. 2—6. Tokyo.

2) Masayuki Hata, Hanako O. Ikeda, Tomoko Hasegawa, Noriko Nakano, Yuki Muraoka, Akira Kakizuka, Nagahisa Yoshimura. Neuroprotective effects of a VCP modulator on rat models of ischemia and reperfusion-induced retinal degeneration. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2014. 5. 4—8. Orlando, Fla, USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1) 発明の名称：「ナフタレン誘導体」

発明者：垣塚彰、堀清次、首藤敏之、淵上智弘。

出願人：国立大学法人京都大学他一社。

優先日：平成 22 年 7 月 30 日、特願 2010-172467

国際出願日：平成 23 年 7 月 28 日、PCT 出願 (PCT/JP2011/067320)

米国出願

出願日：平成 23 年 7 月 28 日

出願番号：13/813,190

米国移行日：平成 25 年 3 月 18 日

欧州出願

出願日：平成 23 年 7 月 28 日

出願番号：11812583.0

欧州移行日：平成 25 年 2 月 27 日

日本出願

出願日：平成 23 年 7 月 28 日

出願番号：特願 2012-526571

移行日：2013 年 1 月 22 日

2) 発明の名称：「眼疾患処置薬」

発明者：垣塚彰、堀清次、池田華子、吉村長久、中野紀子、首藤敏之、淵上智弘。

出願人：国立大学法人京都大学、他一社。

優先日：平成 22 年 9 月 30 日、特願 2010-221873

国際出願日：平成 23 年 9 月 30 日、PCT 出願 (PCT/JP2011/073160)

欧州出願

出願日：平成 23 年 9 月 30 日

移行日：平成 25 年 4 月 30 日、

欧州出願番号：11829440.4

米国出願

出願日：平成 23 年 9 月 30 日

移行日：平成 25 年 7 月 3 日、

米国出願番号：13/876596

日本出願

出願日：平成 23 年 9 月 30 日

出願番号：特願 2012-536615

移行日：2013 年 3 月 28 日

3) 発明の名称：「眼疾患処置薬」

発明者：垣塚彰、池田華子、吉村長久、村岡勇貴。

出願人：国立大学法人京都大学

優先日：平成 25 年 2 月 20 日、特願 2013-031190

国際出願日：平成 26 年 2 月 19 日、PCT 出願 (PCT/JP2014/053898)

4) 発明の名称：「虚血性眼疾患の処置およびまたは予防用の医薬組成物」

発明者：垣塚彰、池田華子、吉村長久、畑匡侑。

出願人：国立大学法人京都大学

出願日：平成 26 年 2 月 28 日、特願 2014-038457

