

Banyu Foundation Research Grant 2015—女性研究者支援—

研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	京都大学
氏 名	池田 華子
研究テーマ	生体ナノ材料を用いたクラミジア・ニューモニーに対する新規治療法の開発

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

加齢黄斑変性は、我が国の成人失明の第4位であり、人口の高齢化に伴い患者が増加の一途をたどっている。近年抗 VEGF 抗体薬により著名な治療効果が期待できるようになったが、抗 VEGF 抗体によって視機能改善する症例は、6% 程度にすぎない (HORIZON 研究)。視機能が悪化する前の、加齢黄斑変性の前段階を特徴づける病変として、ドルーゼンとよばれる網膜色素上皮下の脂質を中心とした沈着物が知られている。ドルーゼンが多数また大型であると、加齢黄斑変性に移行しやすい。ドルーゼンは 65 歳前後の 20-35% に認められ、環境要因、遺伝的要因により出現するとされる。環境要因としては古くから喫煙の影響が知られてきたが、近年クラミジア・ニューモニー抗体陽性が加齢黄斑症のリスク因子となることが、報告されたが、クラミジア・ニューモニーと加齢黄斑変性発症の関連性についてはまだ定説はない。現状では、ドルーゼンそのものに対する確立された治療はなく、またはドルーゼンそのもの、または産出のもととなる視細胞・網膜色素上皮細胞に高濃度で薬剤を到達させる方法も確立されていない。点眼は、全身毒性を回避する良好な投与経路であるが、点眼による薬剤の網膜への高濃度の到達は困難である。

我々は、Banyu Foundation Research Grant 2013 による助成をいただき、クラミジアと加齢黄斑変性の関係を調べるために、平成 9 年から 11 年にかけて加齢黄斑変性による脈絡膜新生血管に対して黄斑下手術を受けた 6 人 6 眼から採取した網膜下新生血管組織から、RNA を抽出し、次世代シーケンスによる発現解析を行った。その結果、全 6 検体からクラミジア・ニューモニーの配列が検出され、実際に、新生血管組織にクラミジア・ニューモニーが生存することが示唆された。

また、リポプロテイン変異体、細胞親和性ペプチド融合 High-Density Lipoprotein (cpHDL) に着目して、網膜への新たなドラッグデリバリーシステムの開発に取り組んできた。まず cpHDL に蛍光物質であるクマリン 6 を内包させ、その cpHDL_クマリン 6 をマウス眼へ点眼することにより、その蛍光物質が網膜に到達することを明らかにした。次いで、クラミジア・ニューモニーの治療を見据え、抗生剤の cpHDL への内包を試みたが、抗生剤の疎水化などの試行にも拘わらず、安定した内包剤は得られなかった。

一方、我々が開発した新規化合物にドルーゼンの抑制効果がある可能性が明らかになった。そして、その化合物は、安定して cpHDL に内包され、網膜に到達することが明らかになった。つまり、新たなドルーゼン消失治療につながる可能性がある。

今後、加齢黄斑変性とクラミジア・ニューモニーの関連をより大規模に調べるため、前向き臨床研究を予定する予定である。

Banyu Foundation Research Grant 2015—女性研究者支援—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	京都大学
氏 名	池田 華子
研究テーマ	生体ナノ材料を用いたクラミジア・ニューモニーに対する新規治療法の開発

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

<背景>

加齢黄斑変性は、我が国の成人失明の第4位であり、先進国では第1位となっている。近年抗 VEGF 抗体薬により著名な治療効果が期待できるようになったが、抗 VEGF 抗体によって視機能改善する症例は、6% 程度にすぎない (HORIZON 研究)。視機能が悪化する前の、加齢黄斑変性の前段階を特徴づける病変として、ドルーゼンとよばれる網膜色素上皮下の脂質を中心とした沈着物が知られている。ドルーゼンが多数また大型であると、加齢黄斑変性に移行しやすい。ドルーゼンは 65 歳前後の 20-35% に認められ、環境要因、遺伝要因により出現するとされる。環境要因としては古くから喫煙の影響が知られてきたが、近年クラミジア・ニューモニー抗体陽性が加齢黄斑症のリスク因子となることが、豪州の大規模コホート研究で報告された。応募者のグループが参加する、滋賀県長浜市で実施されている長浜 1 万人 0 次コホート研究において、日本人でもクラミジア・ニューモニー抗体は、加齢黄斑症と関連がみられることが明らかになってきた。一方遺伝要因としては、全ゲノム関連研究から、脂質代謝系と補体系の遺伝子で加齢黄斑症との高い相関が繰り返し報告されている。特に補体 H 因子が与えるオッズ比は 2 倍を超えるが、補体 H 因子がクラミジア・ニューモニーにたいして親和性が高いことが知られている。過去の病理報告ではドルーゼンには、脂質、補体、アミロイドの集簇が報告されているのに加え、加齢黄斑変性の病変部にクラミジア・ニューモニーが確認されたという報告もある。しかし、クラミジア・ニューモニーと加齢黄斑変性発症の関連性に関してはまだ定説はない。

現状では、ドルーゼンそのものに対する確立された治療はなく、またはドルーゼンそのもの、または産出のもととなる視細胞・網膜色素上皮細胞に高濃度で薬剤を到達させる方法も確立されていない。点眼は、全身毒性を回避する良好な投与経路であるが、点眼による薬剤の網膜への高濃度の到達は困難である。網膜は光を受容し神経信号に変換する点が他の神経組織にみられない特徴であるが、近年の基礎的研究から、リポプロテインを中心とした脂質代謝が機能維持の中心にあると考えられるようになってきている。申請者のグループではリポプロテイン変異体、細胞親和性ペプチド融合 High-Density Lipoprotein (cpHDL) に着目して、新たなドラッグデリバリーシステムの開発に取り組んできた。

我々は、Banyu Foundation Research Grant 2013 による助成をいただき、cpHDL に蛍光物質であるクマリン 6 を内包させ、その cpHDL_クマリン 6 をマウス眼へ点眼することにより、その蛍光物質が網膜に到達することを明らかにした。

また、クラミジアと加齢黄斑変性の関係を調べるために、平成 9 年から 11 年にかけて加齢黄斑変性による脈絡膜新生血管に対して黄斑下手術をうけた 6 人 6 眼から採取した網膜下新生血管組織から、RNA を抽出し、次世代シーケンスによる発現解析を行った。その結果、全 6 検体からクラミジア・ニューモニーの配列が検出され、実際に、新生血管組織にクラミジア・ニューモニーが存在することが示唆された。

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

<目的>

本研究では、これまでの研究をさらに発展させ、cpHDL を用い、網膜・網膜色素細胞およびドルーゼンへの薬剤到達法の確立をめざし、さらに抗生物質を効率よく内包させる条件を検討し、加齢黄斑変性の新たな治療薬となりうるか検討することを目的とする。

<方法及び結果>

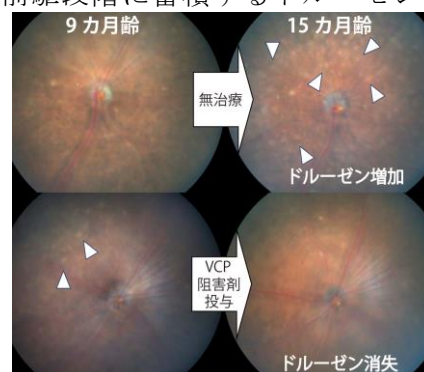
1) 抗生物質内包 cpHDL の作製

これまでの研究にて、クラミジア・ニューモニーに対して抗菌作用がある抗生物質（テトラサイクリン・エリスロマイシン・レボフロキサシン）の cpHDL への内包を試みたが、安定的な内包はできなかった。これら抗生物質は、親水性が高く、このことが、安定した内包が得られない原因であると考えている。そこで、これら抗生物質を、アルキルアンモニウム塩化する2つの方法で抗生物質を疎水化し、①抗生物質存在下で cpHDL を作製、②cpHDL を作製後、抗生物質を混合し 50～60℃の温度で一定時間静置、の二通りで、内包を試みた。ゲル濾過カラム（Nap-5 Columns[®]）および超遠心法により cpHDL に内包されていない抗生物質を除去した後、蛍光分光光度計もしくは高速液体クロマトグラフィーを用いて抗生物質を定量し、抗生物質が cpHDL に内包されたか検討した。その結果、いずれの条件においても、ゲルろ過時には抗生物質の検出が可能であったが、超遠心による精製後には、抗生物質が検出されず、疎水化後も、安定した抗生物質内包は不可能であった。以上のことから、一旦、抗生物質内包 cpHDL の作成、それを用いた諸検討は pending とすることにした。

2) ドルーゼン消失剤の検討

KUS121 (Kyoto University Substance 121)は、VCP の ATPase 阻害活性をもつ化合物として京都大学で開発されたものである。種々の細胞に対し、小胞体ストレス、並びに細胞保護活性を持つことが明らかになっている。加齢黄斑変性の前駆段階に蓄積するドルーゼンは、網膜色素上皮の加齢変化によって、小胞体ストレスなどを介して悪化するとされているため、この KUS 剤がドルーゼン消失効果を持つか、検討することにした。

眼底にドルーゼンが多数出現するドルーゼンモデルである Ccr2 欠損マウスを用い、KUS121 を内服させる群と対照群に分け、その後のドルーゼン数の経過を眼底写真をもとに観察した。その結果、KUS121 投与群では対照群とくらべて有意にドルーゼン数の増加が抑制された（図）。また網膜電図検査から、KUS121 投与群では有意に視機能が保たれていることが明らかになった。



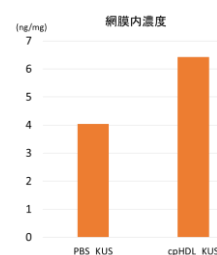
3) ドルーゼン消失剤の cpHDL への内包

上記のように、ドルーゼン消失剤として KUS121 を cpHDL に内包させ、点眼投与にて網膜および網膜下のドルーゼンに到達させることが可能か、検討を行う事にした。cpHDL を作製後、KUS121 を様々な割合で混合し 50～60℃の温度で一定時間静置し、内包を試みた。その結果、非常に効率よく、KUS121 は cpHDL に内包されることが明らかになった。

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

4) cpHDL 内包ドルーゼン消失剤の点眼実験

上記 cpHDL_KUS121 を KUS121 濃度で 2.8 mM に調整し、ラットに点眼をし、30 分後に網膜を摘出、網膜に KUS121 が到達しているか、LC/MS/MS で測定した。その結果、PBS に溶解させた KUS121 より cpHDL_KUS121 の方が網膜内濃度が上昇している事、また、ドルーゼンの存在する網膜下や脈絡膜組織にも十分量 KUS121 が移行することが明らかになった。



<考察および今後の課題>

本研究により、本来抗生剤をより効率よく網膜へ到達させるべく、生体ナノ素材である cpHDL に内包させることを試みたが、いろいろな改良にもかかわらず、安定的な内包は達成できなかった。全身への影響を鑑み、抗生剤の点眼化を目的としたが、大学のラボレベルでの改良には限界があると考えられる。代わりに、新規ドルーゼン消失剤として KUS 剤の可能性を見出し、その KUS 剤を cpHDL に効率よく内包できること、十分な濃度で網膜・脈絡膜に到達させることが可能であることを明らかにした。ドルーゼン治療薬は長期にわたり使用する必要があるため、全身副作用の危険性を考えなくても良い点眼剤の開発は非常に有用であると考ええる。

一方、加齢黄変性とクラミジア・ニューモニーの関係に関しては、前回報告時のデータが RNA を素材とした発現解析（次世代シーケンス）データであり、基本的に、RNA は生細胞由来であるため、加齢黄斑変性患者の網膜組織に、クラミジア・ニューモニーが生存していることは明らかであると考えている。今回、他疾患患者の網膜組織を使用して比較検討する予定であったが、現在の眼科手術は低侵襲化しており、網膜組織を摘出することが倫理的に難しくなっている（切除吸引による処理が基本となっている）ため、前回解析と同様の素材をもとにコントロール実験を行う事は断念した。代わりに、今後、無治療加齢黄斑変性患者から初回抗 VEGF 硝子体注射治療時に前房水（眼内水）を採取しクラミジア・ニューモニー DNA の有無を PCR 法にて検出する前向き研究を予定している。この研究では、白内障手術時の眼底健常人を対照とし、各々 100 名を対象に検証を行う事で、クラミジア・ニューモニーと加齢黄斑変性の関連を大規模に調査する予定である。

Banyu Foundation Research Grant 2015—女性研究者支援—
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

所 属	京都大学
氏 名	池田 華子

1. 論文発表実績 (主要 5 報)	
<ul style="list-style-type: none"> ・ 主要論文5報については PDF を添付。 ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ・ 国内外雑誌を問わない。印刷中は in press と記入。 	
1	Hata M, <u>Ikeda OH</u> , Kikkawa C, Iwai S, Muraoka Y, Hasegawa T, Kakizuka A, Yoshimura N. KUS121, a VCP modulator, attenuates ischemic retinal cell death via suppressing endoplasmic reticulum stress. <i>Sci Rep</i> 7, 44873, 2017.
2	Hasegawa T, Muraoka Y, <u>Ikeda HO*</u> , Tsuruyama T, Kondo M, Terasaki H, Kakizuka A, Yoshimura N. Neuroprotective efficacies by KUS121, a VCP modulator, on animal models of retinal degeneration. <i>Sci Rep</i> , 6, 31184, 2016.
3	Nakano N#, <u>Ikeda HO*#</u> , Hasegawa T, Muraoka Y, Iwai S, Tsuruyama T, Nakano M, Fuchigami T, Shudo T, Kakizuka A, Yoshimura N. Neuroprotective effects of VCP modulators in mouse models of glaucoma. <i>Heliyon</i> , 2, e00096, 2016. # equal contribution
4	Hasegawa T, <u>Ikeda HO*</u> , Nakano N, Muraoka Y, Tsuruyama T, Okamoto-Furuta K, Kohda H, Yoshimura N. Changes in morphology and visual function over time in mouse models of retinal degeneration: an SD-OCT, histology, and electroretinography study. <i>Jpn J Ophthalmol</i> , 60, 111-125, 2016.
5	Hasegawa T, Ooto S*, Takayama K, Makiyama Y, Akagi T, <u>Ikeda HO</u> , Nakanishi H, Suda K, Yamada H, Uji A, Yoshimura N. Cone integrity in glaucoma: An adaptive-optics scanning laser ophthalmoscopy study. <i>Am J Ophthalmol</i> , 171, 53-66, 2016.
2. 学会発表実績 (主要 5 報)	
<ul style="list-style-type: none"> ・ 主要5件の学会アブストラクト、プログラム等の PDF を添付 ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 	
1	2016. 11. 13 VCP モジュレーターを用いた眼難治疾患の治療法開発 第 3 回 弘前医療技術イノベーションシンポジウム
2	京大眼科同窓会学会 2016/10/30 口演(一般演題) 池田華子, 村岡勇貴, 畑匡侑, 村上智昭, 飯田悠人, 三輪裕子, 鈴間潔, 大音壮太郎 網膜中心動脈閉塞症に対する神経保護治療薬 KUS121 の開発
3	2016. 9. 17 緑内障マウスモデルを用いた神経保護研究 第27回 日本緑内障学会 シンポジウム4 叡智! 緑内障基礎研究の最前線
4	京都眼科学会 2016/6/19 口演(一般演題) 池田華子, 村岡勇貴, 畑匡侑, 村上智昭, 飯田悠人, 三輪裕子, 鈴間潔, 大音壮太郎 網膜中心動脈閉塞症に対する神経保護治療法開発の取り組み
5	

