

公益財団法人富山第一銀行奨学財団

理事長 金岡 純二 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山大学	助成金額 :	770 千円
研究代表者 : 山本誠士	所属 : 大学院医学薬学研究部(医学)	職位 : 講師
研究題目 : 眼科領域における画期的新薬創出のための研究—糖尿病網膜症の完全克服を目指して—		

研究概要

ヒト糖尿病網膜症は病的血管新生による網膜破壊と増殖膜形成による網膜剥離による視力喪失の危険性が高い疾患である。この疾患に対して効果的な治療薬を開発するために、多くの研究がなされており、上市された治療薬もあるが効果は限定的である。その理由の一つとして、ヒト糖尿病網膜症を忠実に再現する動物モデルが存在せず、病的血管新生と増殖膜形成による網膜剥離の分子メカニズムについて理解が深化していないことが挙げられる。我々はヒト糖尿病網膜症の効果的な治療法を開発するために、糖尿病網膜症の主症状である病的血管新生と増殖膜形成による網膜剥離を再現するマウスモデル開発に取り組み、世界最高水準の糖尿病網膜症の主症状を再現するマウス(N-PRβ-KO)の開発に成功した。本マウスの網膜病変の詳細な解析から、病態進行中の網膜で 3 種類の分泌蛋白質 PDGF-BB, PIGF, VEGF-A が高発現しており、それらが結合する 3 タイプの受容体 PDGFR α , PDGFR β , VEGFR1 の異常な活性化が病態増悪の原因であると推測された。分泌蛋白質 PDGF-BB, PIGF, VEGF-A のうち、網膜症の治療ターゲットとして新規性の高いものは PDGF-BB と PIGF である。また、受容体 PDGFR α , PDGFR β , VEGFR1 の中で新規性が高いものは PDGFR α と VEGFR1 である。糖尿病網膜症治療薬開発において、新規性の高い分子種にターゲットを絞ることがファーストインクラスを狙えると考えられたため、本計画では PDGF-BB-PDGFR α シグナルカスケードと PIGF- VEGFR1 シグナルカスケードに特異性の高い抗体医薬や低分子阻害薬を開発し、これらを複合的に投薬することによって、糖尿病網膜症の完全克服を目指す計画である。

成果要約

製薬会社と提携した上で、上述した 2 種類のシグナルカスケードに対する阻害効果のある低分子化合物や抗体の作製を行い、マウスにおける網膜症治療効果を判定する目的で製薬会社と交渉したが、交渉には時間を要することが判明した。そのため、増殖膜阻害効果(PDGFR 阻害効果)の検討は、コマーシャルベースで入手可能な低分子阻害剤を用い、マウスにおける治療効果を検討した。PDGFR 阻害剤のクレノラニブを生後 1 週目から N-PRβ-KO マウスの腹腔内に投与し、4 週目の網膜に増殖膜マーカーの α SMA 抗体で蛍光免疫染色を施し、増殖膜形成阻害効果を評価した。その結果、 α SMA 陽性領域はクレノラニブ投与群で縮小することが明らかとなり(図 1)、統計処理の結果有意差が確認された(図 2)。病的血管新生増悪分子カスケードに対しては、多くの研究が VEGFR2 シグナルをターゲットとしており、阻害抗体などの開発も進んでいるが、我々は N-PRβ-KO 網膜で PIGF の発現が優位に高かったことから、ほとんどの研究者が注目していない PIGF-VEGFR1 シグナルカスケードを対象とし解析に着手した。N-PRβ-KO と VEGFR1 の細胞内ドメインを欠失したマウス(Flt1TK^{-/-})を交配した N-PRβ-KO-Flt1TK^{-/-}網膜を解析した結果、優位に病的血管新生が抑制されていた(図 3, 4)。

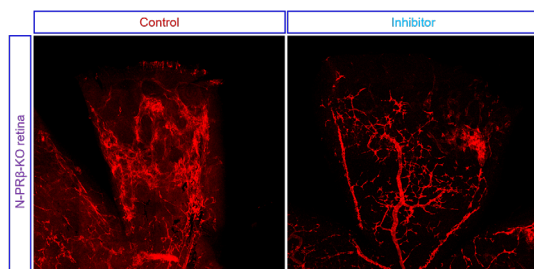


図 1. PDGFR 阻害剤を用いた増殖膜阻害効果. N-PRβ-KO に対し、PDGFR 阻害剤のクレノラニブを投与した 4 週目の網膜. Control と比較して、クレノラニブ投与分では α SMA 陽性領域(赤)が減少している。

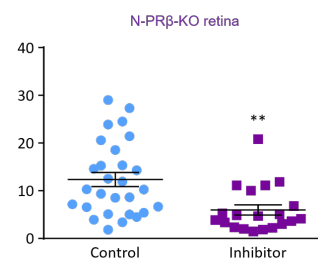


図 2. クレノラニブの治療効果判定. 図 1 の結果を定量し、グラフ化するとともに、統計処理を行った。その結果、クレノラニブ投与群では有意に増殖膜形成が阻害されていた。

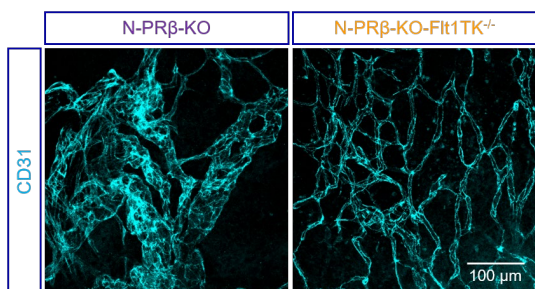


図 3. VEGFR1 をターゲットとした病的血管新生阻害効果. N-PRβ-KO に VEGFR1 の細胞内ドメインを欠失したマウス (Flt1TK^{-/-})を交配した結果, 病的血管新生が著しく軽快したことから, これまで注目されてきた VEGFR2 シグナルではなく, VEGFR1 シグナルが重要であることが明らかとなった.

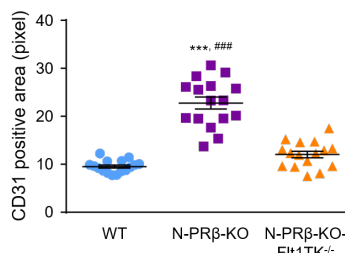


図 4. 病的血管新生阻害効果の定量解析. 図 5 の結果を定量し, グラフ化するとともに, 統計処理を行った. その結果, ダブル KO マウス(N-PRβ-KO-Flt1TK^{-/-})では有意に病的血管新生が抑制されていた.

<p>研究成果 発表状況</p>	<p>【雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況】</p> <p>英文原著論文 (*, corresponding author)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kitahara H, Kajikawa S, Ishii Y, Yamamoto S*, Hamashima T, Azuma E, Sato H, Matsushima T, Shibuya M, Shimada Y, Sasahara M: The novel pathogenesis mediated by multiple RTK signals is uncovered in newly developed retinopathy mouse model. <i>EBioMedicine</i> 31, 190-201, 2018. (IF=6.183) 2. Yamada K, Hamashima T, Ishii Y, Yamamoto S*, Okuno N, Yoshida Y, Yamada M, Huang TT, Shioda N, Tomihara K, Fujimori T, Mori H, Fukunaga K, Noguchi M, Sasahara M: Different PDGF receptor dimers drive distinct migration modes of the mouse skin fibroblast. <i>Cell Physiol Biochem</i> 51, 1461-1479, 2018. (IF=5.500) 3. Dang TC, Ishii Y, Nguyen VD, Yamamoto S*, Hamashima T, Noriko O, Nguyen QL, Sang Y, Ohkawa N, Saitoh Y, Shehata M, Takakura N, Fujimori T, Inokuchi K, Mori H, Andrae J, Betsholtz C, Sasahara M: Powerful homeostatic control of oligodendroglial lineage by PDGFRα in adult brain. <i>Cell Rep</i>, 2019, <i>Accepted</i>. (IF=8.032) <p>新聞掲載</p> <p>Kitahara et al., <i>EBioMedicine</i> 31, 190-201, 2018. <u>北日本新聞、富山新聞の朝刊に研究内容掲載</u></p>		
<p>経費の 執行状況</p>	<p>区分</p> <p>【物品費】</p> <p>免疫染色用抗体 遺伝子解析用試薬 細胞培養関連試薬 顕微鏡用ハロゲンランプ マウス購入 インヒビター PCおよびソフトウェア</p> <p>【旅費】</p> <p>東京出張</p> <p>【謝金】</p> <p>研究指導料</p> <p>【その他】</p> <p>なし</p> <p>合計</p>	<p>執行額 (円)</p> <p>252,000 225,000 36,000 5,000 15,000 60,000 125,000</p> <p>42,000</p> <p>10,000</p> <p>0</p> <p>770,000 円</p>	<p>備考</p> <p>抗体 4 種類 PCR 関連試薬等 培地等</p> <p>インヒビター 2 種類 解析用</p> <p>AMED ヒアリング出席等</p> <p>日本医大福原先生</p>