

# 学位論文内容要旨

氏名：飯塚 直人

題目：網膜異常血管新生の抑制を指向した既存医薬品の応用に関する研究

## 背景

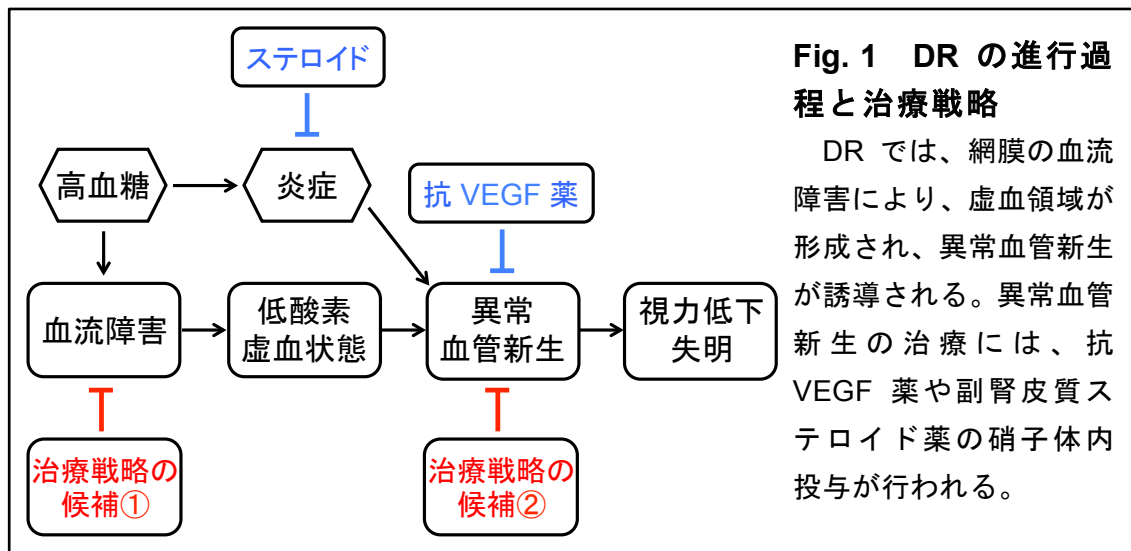
糖尿病網膜症 (DR) は、糖尿病 (DM) の三大合併症の 1 つであり、日本における後天性失明原因の第 3 位である<sup>[1]</sup>。日本では、DM 患者とその予備群を合わせると約 2000 万人にも及び<sup>[2]</sup>、その合併症である DR の予防・治療法の開発は社会的要請となっている。

DR では、高血糖などにより網膜血管が障害され、閉塞・退縮することで網膜に虚血領域が生じる。網膜虚血は、血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現を増大させ、異常血管新生を誘導する。異常新生血管は、非常に脆く、それが破綻すると著しい視力低下や失明へと至る<sup>[3, 4]</sup>。

現在、DR に関連する薬物治療として、抗 VEGF 薬や副腎皮質ステロイド薬の硝子体内投与が行われている<sup>[5]</sup>。しかしながら、硝子体内投与法は、手術に準ずる侵襲的な治療手段であり、安全な治療法の開発が望まれる (Fig. 1)。

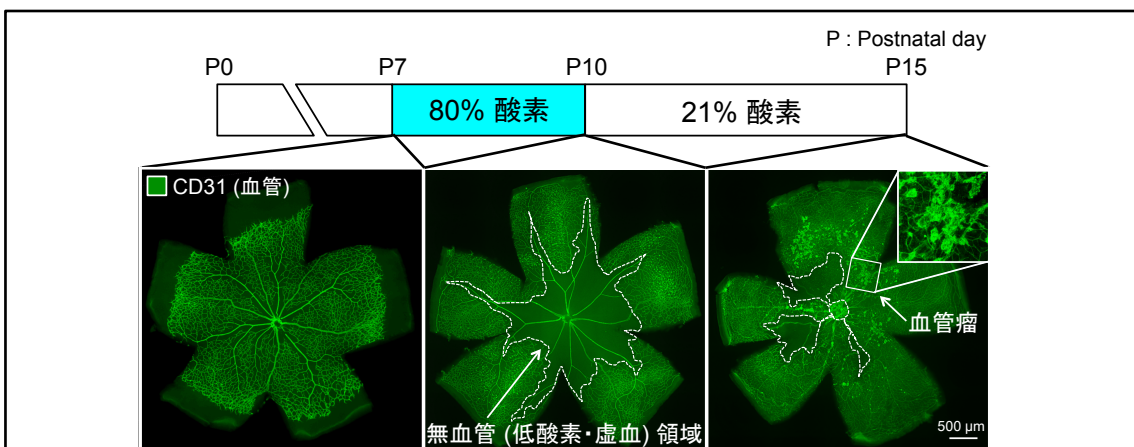
治療薬を開発する上では、新規化合物を発見する方法と既存医薬品から新規薬効を見出す方法がある。後者をドラッグリポジショニングというが、新規化合物の開発と比較すると、臨床応用されるまでに要する期間が短く、費用も抑えることができる。また、既存医薬品には、ヒトでの安全性や薬物動態に関する豊富なデータが存在し、それを有効活用できる<sup>[6]</sup>。

そこで、私は、網膜異常血管新生抑制作用を有する既存医薬品を見出すことを目的として、新生仔期のマウスにおいて、Ca 拮抗薬 (amlodipine 及び nifedipine) が網膜の血流障害を改善し、虚血領域の形成を抑制する可能性について検討した (第一章)。次いで、近年、血管新生抑制作用が報告されている抗てんかん薬である valproic acid (VPA)<sup>[7]</sup> が網膜異常血管新生に及ぼす影響について検討した (第二章)。そして最後に、実臨床における VPA の異常血管新生抑制作用について検討した (第三章)。



## 第一章 高酸素曝露による網膜毛細血管の退縮過程及びそれに対する Ca 拮抗薬 (amlodipine 及び nifedipine) の効果

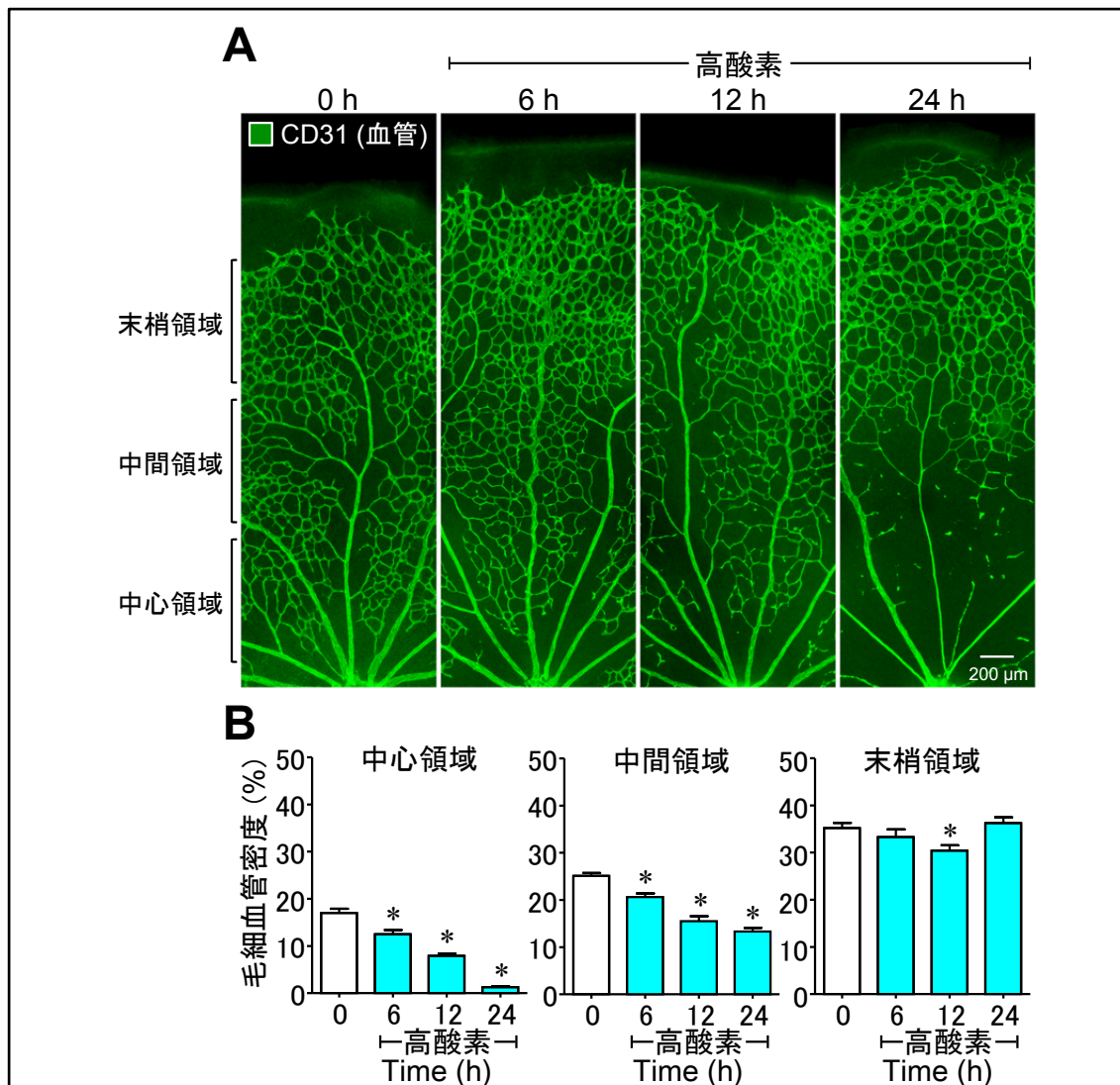
基礎研究に汎用されているマウスやラットなどの齧歯類に DM を発症させて長期間飼育しても、網膜血管障害は生じるものの、ヒトの DR で観察されるような異常血管新生は誘導されない<sup>[8]</sup>。そこで、本研究では、網膜異常血管新生の研究に広く用いられている高酸素を利用したマウスモデル (Fig. 2)<sup>[9]</sup>を使用して、異常血管新生の引き金である高酸素曝露による網膜毛細血管の退縮過程を詳細に観察し、その機序を解析すると共に、高酸素曝露による網膜血管の変化に対する Ca 拮抗薬 (amlodipine 及び nifedipine) の効果について検討した。



**Fig. 2 高酸素を利用した網膜異常血管新生モデル**

新生仔期のマウスを 7 日齢から 10 日齢まで、高酸素環境下で飼育すると、網膜中心部の広範囲に及ぶ毛細血管が退縮し、無血管 (低酸素・虚血) 領域が形成される。その後、大気下で飼育すると、無血管領域への血管新生 (正常血管新生) が生じ、それと共に、硝子体側へと逸脱した血管瘤 (異常血管新生) が形成される。

新生仔期のマウスを 7 日齢から、高酸素 (80%) に曝露すると、網膜の中心領域から中間領域にかけて存在する毛細血管が酸素曝露時間に依存して退縮した。高酸素曝露開始 24 時間後では、網膜中心領域に無血管 (低酸素・虚血) 領域が形成された。一方、末梢領域の血管網は、高酸素曝露の影響をほとんど受けなかった (**Fig. 3**)。



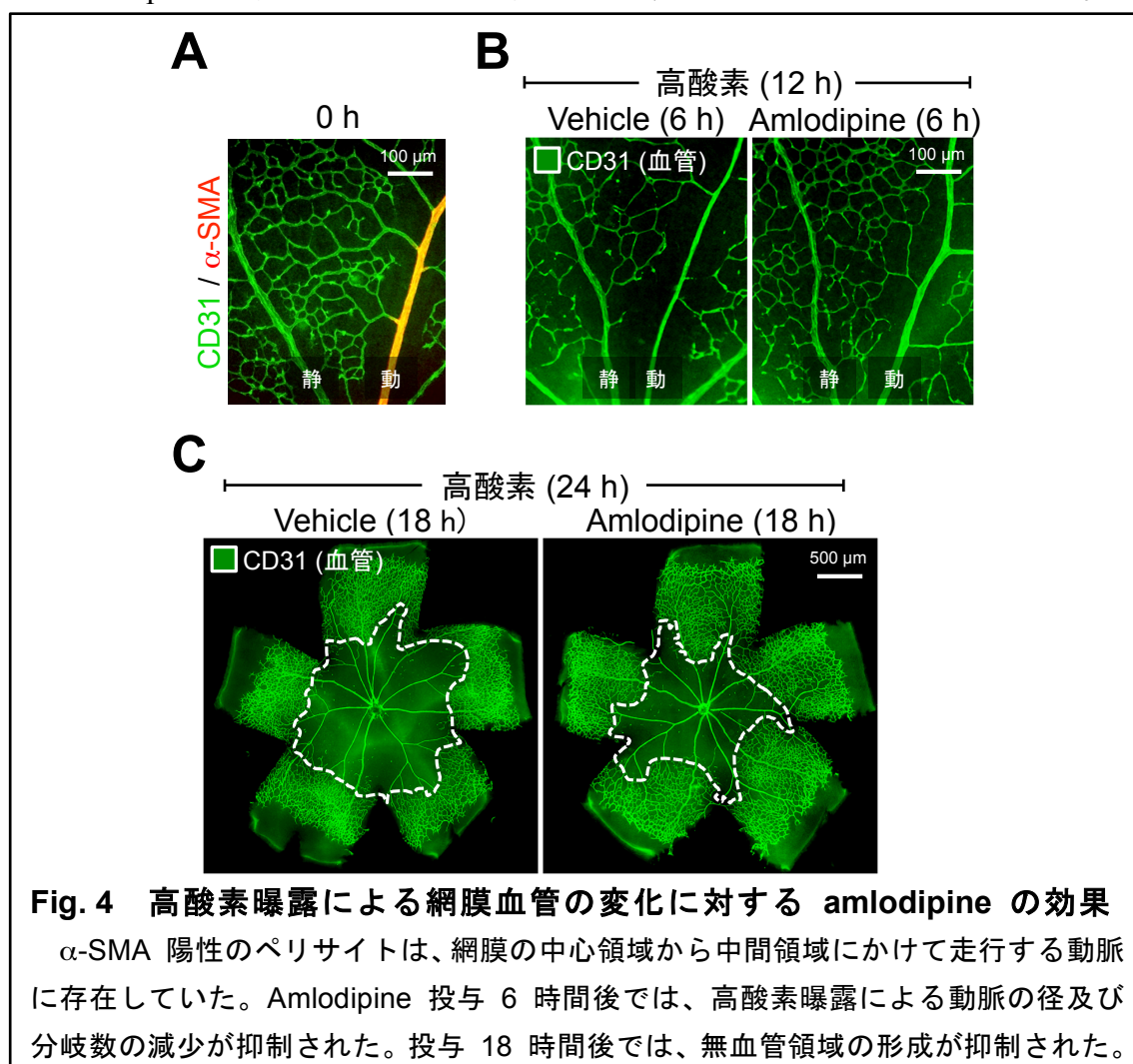
**Fig. 3 高酸素曝露による網膜毛細血管の退縮**

新生仔期のマウスを 7 日齢から高酸素環境下で飼育した。高酸素の曝露時間に依存して網膜の中心領域から中間領域にかけて存在する毛細血管が退縮した。一方、末梢領域の血管網は、高酸素曝露の影響をほとんど受けなかった。\* $p < 0.05$  vs. 0 h.

次に、高酸素曝露による毛細血管の退縮機序を明らかにするために、血管構成成分であるペリサイトについて検討したところ、収縮能を有する  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 陽性のペリサイトは、網膜の中心領域から中間領域にかけて走行する動脈に存在していることが示された (**Fig. 4A**)。高酸素曝露開始 12

時間後では、 $\alpha$ -SMA 陽性のペリサイトが存在する動脈の径及び動脈・静脈両方の分岐数の減少が認められた (**Fig. 4B**)。これらの結果は、高酸素曝露により  $\alpha$ -SMA 陽性のペリサイトが存在する動脈が収縮し、血流が障害され、その結果、毛細血管が退縮する可能性を示唆している。

次に、高酸素曝露による網膜血管の変化に対する長時間作用型の Ca 拮抗薬である amlodipine の効果について検討した。高酸素曝露開始 6 時間後に amlodipine (10 mg/kg, s.c.) を投与して、その 6 時間後に動脈の径及び分岐数について検討すると、溶媒投与群に比べて amlodipine 投与群において、動脈の径が大きく、分岐数が多いことが示された。また、amlodipine 投与 18 時間後では、高酸素曝露により形成される無血管領域が小さかった (**Fig. 4**)。他の Ca 拮抗薬である nicardipine を用いた場合においても、ほぼ同様な結果が得られた。これらの結果より、amlodipine 及び nicardipine が血流障害を改善することで、虚血領域の形成を抑制している可能性が示された。このことは、amlodipine 及び nicardipine が、その後の異常血管新生を抑制する可能性を示唆している。

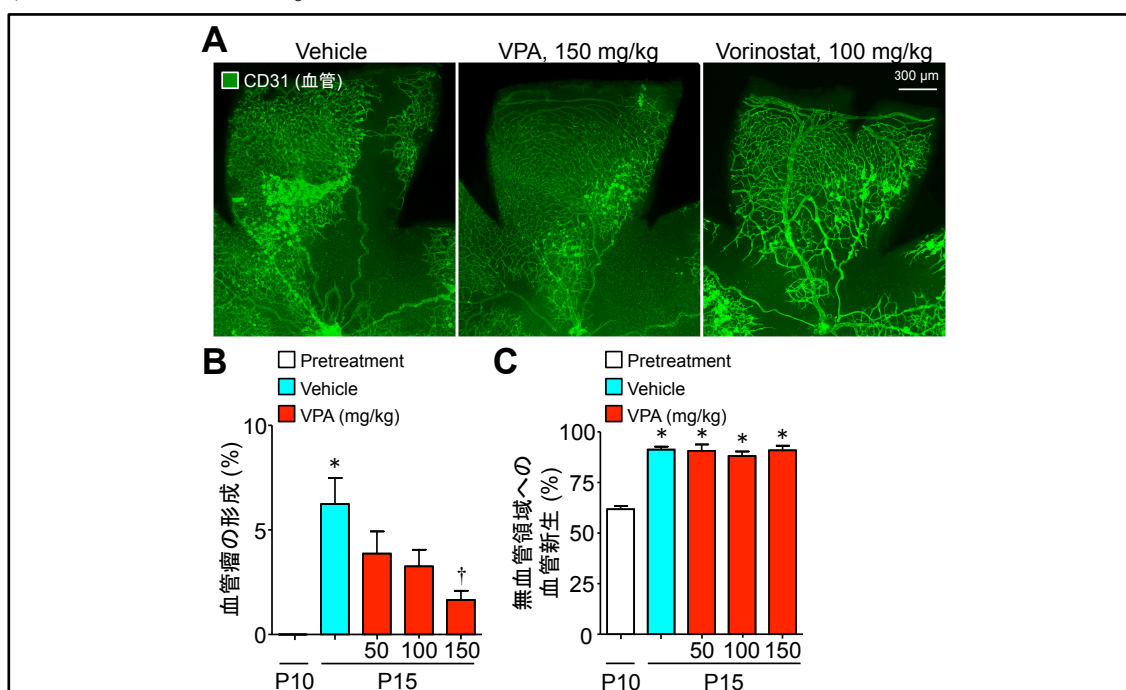




## 第二章 酸素誘導網膜症モデル (OIR モデル) マウスにおける異常血管新生に対する valproic acid (VPA) の効果

Valproic acid (VPA) は、てんかん全般発作に対する第一選択薬である<sup>[10]</sup>。VPA は、GABA トランスアミナーゼ及び電位依存性  $\text{Na}^+$  チャネルを阻害することにより、てんかん発作を抑制すると考えられている<sup>[11, 12]</sup>。近年、VPA には、遺伝子の発現調節に関与するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を阻害する作用が見出され<sup>[13]</sup>、HDAC 阻害作用を介して血管内皮細胞の増殖及び腫瘍における血管新生を抑制することが示されている<sup>[7, 14]</sup>。しかし、VPA の網膜異常血管新生に対する効果は明らかでない。そこで本章では、VPA 及び HDAC 阻害薬である vorinostat が網膜異常血管新生に及ぼす影響について検討した。

実験は **Fig. 2** に示すプロトコールに従って行った。高酸素曝露を終了した 10 日齢から 14 日齢まで、VPA (50, 100 又は 150 mg/kg/day, s.c.) 又は vorinostat (50 又は 100 mg/kg/day, s.c.) を投与すると、15 日齢における血管腫の形成が抑制されることが示された。両薬物は、無血管領域に生じる血管新生に対しては抑制作用を示さなかった (**Fig. 5**)。これらの結果より、VPA 及び vorinostat は、網膜の正常血管新生には影響を及ぼすことなく、異常血管新生を選択的に抑制することが示された。



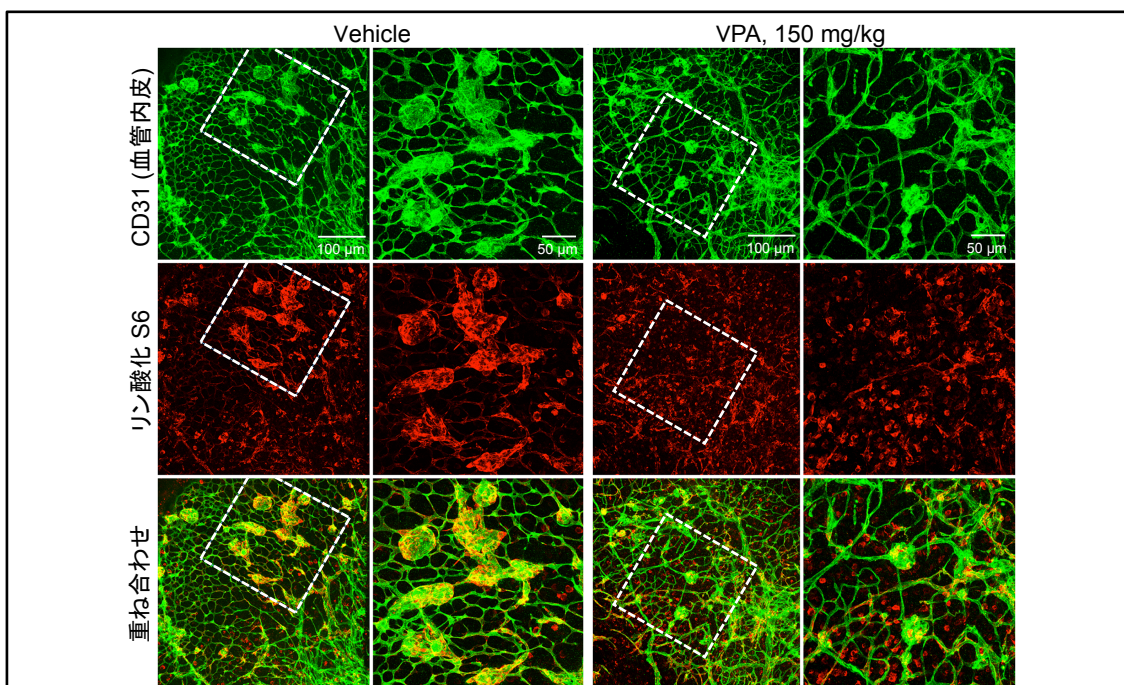
**Fig. 5 網膜異常血管新生に対する VPA 及び vorinostat の効果**

高酸素曝露を終了した 10 日齢 から 14 日齢まで、VPA 又は vorinostat を投与した。15 日齢において、溶媒投与群と比較して、VPA 投与群及び vorinostat 投与群では、血管腫の形成が抑制された。VPA 及び vorinostat は、無血管領域への血管新生には影響を及ぼさなかった。\* $p < 0.05$  vs. Pretreatment; † $p < 0.05$  vs. Vehicle.

次に、VPA の異常血管新生抑制作用の機序を明らかにするために、血管瘤における内皮細胞の VEGF 応答に対する VPA の効果について検討した。血管内皮細胞の VEGF 応答の評価には、網膜の新生血管内皮細胞において mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路が VEGF 受容体の刺激により引き起こされるシグナル経路の下流に位置し、増殖に関与している<sup>[15, 16]</sup>ことを利用した。血管内皮細胞が VEGF により刺激されると mTOR 経路が活性化し、下流の S6 タンパク質がリン酸化される<sup>[15, 16]</sup>。そこで、血管内皮細胞とリン酸化 S6 の抗体を用いて蛍光免疫染色し、共局在領域を VEGF により刺激されている血管内皮細胞であると定義して評価した。

その結果、VPA 投与群では、血管瘤の内皮細胞におけるリン酸化 S6 が減少することが見出された (Fig. 6)。この結果より、VPA は、増殖活性の高い血管瘤を形成する内皮細胞における VEGF 応答を抑制する可能性が示された。

本章の結果より、VPA には、網膜異常血管新生を抑制する効果が期待できると考えられた。



**Fig. 6 血管瘤の内皮細胞における VEGF 応答に対する VPA の効果**

15 日齢において、溶媒投与群では、血管瘤の内皮細胞における顕著な S6 タンパク質のリン酸化が観察された。一方、VPA 投与群では、血管瘤の内皮細胞における S6 タンパク質のリン酸化が抑制された。

## 総括

私は、第一章において、高酸素曝露による網膜の動脈径の減少及び毛細血管の退縮を降圧薬である amlodipine 及び nicardipine が抑制することを明らかにした。第二章では、抗てんかん薬である VPA が、網膜異常血管新生を選択的に抑制することを見出した。

以上のように、本研究は、既存医薬品の新たな可能性を拓くものであり、薬物治療学の発展に大きく寄与するものと考えられる。

第三章の内容は、学術雑誌へ投稿する予定があるため、公表を延期致します。なお、学術雑誌への投稿後は、全文を公表致します。

## 参考文献

- [1] 白神史雄. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業「網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する調査研究」平成 28 年度 総括・分担研究報告書
- [2] 2016 年国民健康・栄養調査. 厚生労働省
- [3] Saint-Geniez et al. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 1045-1058. (2004)
- [4] Alon et al. *Nat. Med.* 1, 1024-1028. (1995)
- [5] 小椋祐一郎ら. 黄斑疾患に対する硝子体内注射ガイドライン. 日眼会誌. 120, 87-90. (2016)
- [6] Li and Jones. *Genome Med.* 4, 27. (2012)
- [7] Zhang et al. *Mol. Med. Rep.* 9, 443-449. (2014)
- [8] Hammes et al. *Diabetes.* 51, 3107-3112. (2002)
- [9] Smith et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 101-111. (1994)
- [10] 森本展年ら. てんかん治療ガイドラインについて. 岡山医学会雑誌. 126, 55-58. (2014)
- [11] 医療用医薬品添付文書：デパケン®錠, 協和発酵キリン株式会社, 2014 年 11 月改訂 (第 21 版)
- [12] Van den Berg et al. *Exp. Brain Res.* 93, 279-287. (1993)
- [13] Phiel et al. *J. Biol. Chem.* 276, 36734-36741. (2001)
- [14] Michaelis et al. *Mol. Pharmacol.* 65, 520-527. (2004)
- [15] Yagasaki et al. *Biol. Pharm. Bull.* 37, 1838-1842. (2014)
- [16] Yagasaki et al. *Exp. Eye Res.* 129, 127-134. (2014)

## 研究業績

### (1) 学術論文

1. Iizuka N, Nakahara T, Ushikubo H, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Retinal region-dependent susceptibility of capillaries to high-concentration oxygen exposure and vascular endothelial growth factor receptor inhibition in neonatal mice. *J. Pharmacol. Sci.* 129(2), 107-118, 2015.
2. Iizuka N, Morita A, Kawano C, Mori A, Sakamoto K, Kuroyama M, Ishii K, Nakahara T. Anti-angiogenic effects of valproic acid in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *J. Pharmacol. Sci.* 138(3), 203-208, 2018.

### (2) 学会発表

#### 【シンポジウム】

1. 飯塚直人, 中原努, 牛久保裕子, 森麻美, 坂本謙司, 石井邦雄. 新生仔マウスにおける網膜血管退縮機序の解析, 日本薬学会第 135 年会 (2015)
2. 飯塚直人, 森田茜, 川野千尋, 浅野大樹, 森麻美, 坂本謙司, 黒山政一, 中原努. 糖尿病網膜症に及ぼす valproic acid の影響 -基礎から臨床に向けて-, 日本薬学会第 139 年会 (2019)

#### 【口頭発表】

1. 飯塚直人, 中原努, 牛久保裕子, 森麻美, 坂本謙司, 石井邦雄. 新生仔マウスにおける高酸素暴露による網膜血管退縮様式, 第 27 回北里大学バイオサイエンスフォーラム (2014)
2. 飯塚直人, 中原努, 牛久保裕子, 森麻美, 坂本謙司, 石井邦雄. 新生仔マウスにおける高酸素と VEGF 受容体阻害薬による網膜血管退縮様式の相違, 第 34 回日本眼薬理学会 (2014)
3. 飯塚直人, 川野千尋, 牛久保裕子, 森麻美, 平山武司, 坂本謙司, 黒山政一, 中原努. バルプロ酸は網膜血管新生を抑制する, 日本薬理学会 136 回関東部会 (2017)