

186. 新規低酸素誘導因子阻害剤の探索

栗原 俊英

Key words : 低酸素誘導因子, 加齢黄斑変性, 血管新生, 神経変性

慶應義塾大学 医学部 眼科学教室

緒言

加齢黄斑変性は、先進国での 55 歳以上の主要な失明原因であり、浸出型と萎縮型に分類される。これまでにいくつかの加齢黄斑変性の危険因子が同定されてきたが、その根本的な病態メカニズムは分かっていない。過去 10 年において、抗血管内皮成長因子 (VEGF) 療法が滲出型加齢黄斑変性に対して導入され治療法として確立した。しかし、最近の臨床的な知見から抗 VEGF 療法は、局所投与でも全身投与でも腎臓や網膜を含む複数の臓器を障害する可能性があることが分かってきた。さらに、最近我々は、網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium: RPE) 細胞特異的に Vegf 遺伝子を成体で欠損させると、数日のうちに脈絡膜血管構造の破たんおよび視細胞機能の低下が生じることを見出した。これらの臨床・実験両方の知見から、滲出型加齢黄斑変性に対して従来の抗 VEGF 療法に加えて新しい治療法が必要になっている。さらに萎縮型加齢黄斑変性に対しては、現在有効な治療法は全くない。

低酸素誘導因子 (HIF) は細胞の酸素環境により転写後調節 (タンパク分解) によってそのタンパク発現量を変化させ、低酸素状態における細胞の生存に必要な遺伝子群すなわち造血 (EPO), 血管新生 (VEGF), エネルギー代謝 (GLUT), 炎症・免疫 (iNOS) に関する遺伝子の発現を調整する転写因子である。通常酸素下において、HIF の α サブユニットは、VHL (von Hippel-Lindau protein) によって特異的に認識され、ユビキチン化後プロテアソームによって分解される。低酸素下では、HIF α は VHL の認識に必要な水酸化を受けないため安定化し、核内に移動して下流の遺伝子群を発現させる。一方で HIF α は酸素による転写後調節だけでなく、炎症、代謝、栄養状態などさまざまなストレス刺激による入力でその発現量が調節されており、細胞・組織の恒常性の維持に寄与している。

これまで我々は、HIF の網膜発生および網膜疾患モデルにおける役割を研究してきた。その中で、網膜神経細胞またはアストロサイトで特異的に Vhl を欠損させると HIF α の恒常的なタンパク発現を介して、網膜における胎児-成体循環移行が停止し、パラクリンの血管系の再構築に VHL が重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究では、HIF のタンパクレベルでの異常な発現亢進が加齢黄斑変性の病態に寄与しているという仮説を立て、動物実験で検証するとともに、有効な HIF 阻害剤を開発することで、加齢黄斑変性治療の新たなアプローチを探索した。

方法、結果および考察

VEGF を標的とした抗血管新生治療は、浸出型加齢黄斑変性にはじまり、現在では他の網膜疾患に適応が拡大しつつある。一方で我々は、定常状態における VEGF の発現は網膜外層の既存の血管および神経細胞の維持に必要であるが HIF は必要ないこと、また VEGF と同程度に HIF は実験的脈絡膜血管新生の表現型に重要であることを報告した。そこで本研究の初年度では、4 種類の網膜血管新生モデルにおいて、伸長している血管先端の内皮細胞では Ras 経路が活性化しているが、成熟し安定した内皮細胞ではマイクロ RNA132 の発現低下が Ras 経路を内在的に抑制していることを見出した。また、アンチマイクロ RNA132 の眼内投与は、サイトカイン非特異的に血管内皮 Ras 経路を抑制し、抗 VEGF 薬以上に病的血管新生を抑制することが分かった。よってマイクロ RNA132 を標的とすることが、新たな血管新生性網膜疾患の治療戦略となる可能性が示唆された (図 1) ²⁾。

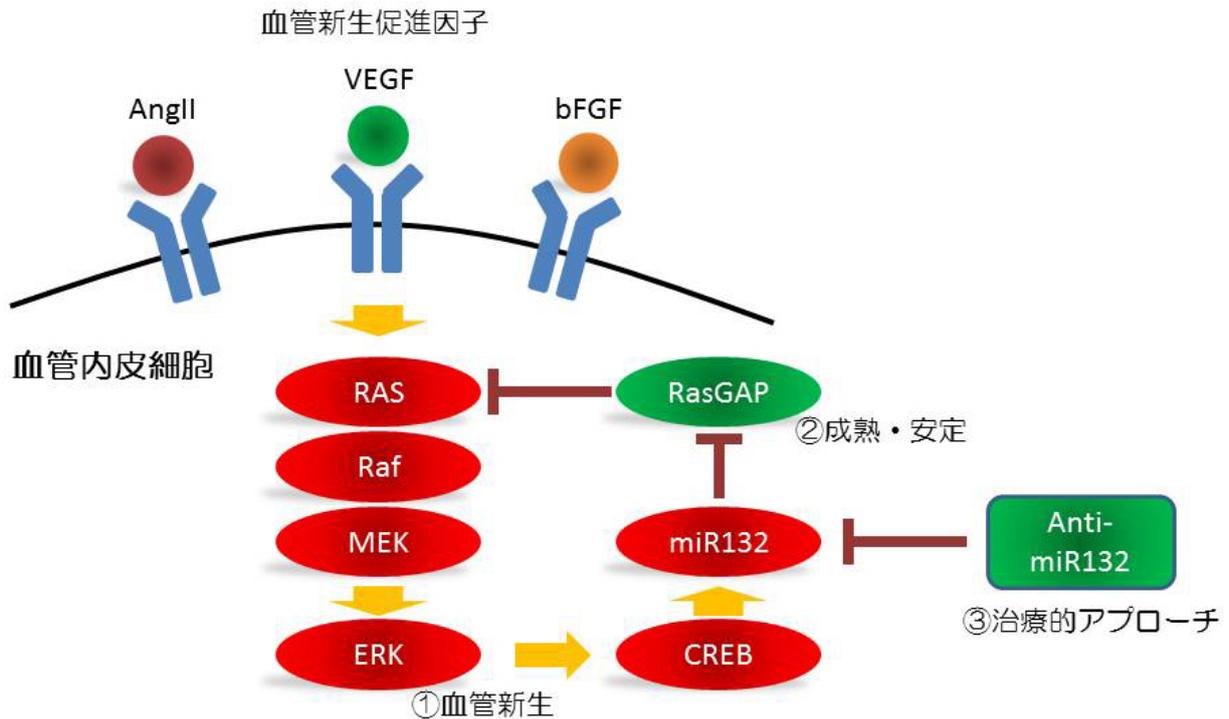


図1. miRNA132を介した血管新生.

伸長している血管先端の内皮細胞では VEGF やその他のサイトカインにより Ras 経路が活性化している (①) が, 成熟し安定した内皮細胞では miR132 の低下により内在性の Ras 抑制因子である RasGAP の発現が亢進している (②). Anti-miR132 は RasGAP の発現を上昇させ, サイトカイン非特異的に内皮細胞の Ras 経路を抑制する抗血管新生療法の新たな治療戦略となる (③).

次に, 既存の抗 VEGF 治療の問題点として, 頻回の硝子体注射が挙げられる. そこで, VEGF 中和抗体にヘパリン結合ドメインを有する「Sticky-trap (粘着型 VEGF 阻害剤)」を開発した. この Sticky-trap では, 網膜の神経活動に影響を与えることなく, 病的な網膜血管新生を長期に渡って, 既存の抗 VEGF 薬より抑制することが明らかとなった³⁾.

VEGF の血管内皮細胞への作用はこれまで詳細に明らかにされてきたが, 網膜神経細胞への作用は, いまだ解明されていない点も多い. そこで, 神経網膜に発現する VEGF の主要な受容体 VEGFR2 をノックアウトすることで, その作用を検討した. 網膜神経特異的 VEGFR2 ノックアウトマウスは, 網膜の神経機能において, 野生型コントロールと変化はなかった. 一方で, 神経網膜に存在する VEGF 濃度が高まることで, 網膜血管走行の発生異常を誘導した. これは, 神経網膜における HIF のタンパク発現を高めることでも同様な表現が見られ, 適切な低酸素応答が, 網膜血管の正常発生に重要であることを見出した⁴⁾.

さらに, 網膜の中間層に存在するアマクリン細胞, 水平細胞における HIF の役割について検討した. 特異的ノックアウトマウスを作製することで, これら細胞に発現する HIF は網膜中間層の血管構築および視細胞の機能維持に重要であることを明らかにした⁵⁾.

これまでの結果から, HIF-VEGF 経路の適切な制御が発生段階から血管新生, 神経萎縮に至るまで重要であることが分かってきた. 現在, NIH3T3 cell line および RPE の不死化細胞株に HRE (hypoxia-response element) の下流にレポーター遺伝子をつなげたコンストラクトを遺伝子導入し, 既存の天然化合物および合成化合物のライブラリから HIF 阻害剤のスクリーニングを行っている. 特異性の高い合成 HIF 阻害剤だけでなく天然物ライブラリから比較的特異的な HIF 阻害物質を見出すことができれば, 栄養補助食品として食事内容に組み込むまたは食事構成を変えることにより, 加齢黄斑変性の発症そのものを予防できる可能性がある.

文 献

- 1) Kurihara, T., Westenskow, P. D. & Friedlander, M. : Hypoxia-inducible factor (HIF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in the retina. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **801** : 275-281, 2014.
- 2) Westenskow, P. D., Kurihara, T., Aguilar, E., Scheppke, E. L., Moreno, S. K., Wittgrove, C., Marchetti, V., Michael, I. P., Anand, S., Nagy, A., Cheresch, D. & Friedlander, M. : Ras pathway inhibition prevents neovascularization by repressing endothelial cell sprouting. *J. Clin. Invest.*, **123** : 4900-4908, 2013.
- 3) Michael, I. P., Westenskow, P. D., Hacibekiroglu, S., Greenwald, A. C., Ballios, B. G., Kurihara, T., Li, Z., Warren, C. M., Zhang, P., Aguilar, E., Donaldson, L., Marchetti, V., Baba, T., Hussein, S. M., Sung, H. K., Iruela-Arispe, M. L., Rini, J. M., van der Kooy, D., Friedlander, M. & Nagy, A. : Local acting Sticky-trap inhibits vascular endothelial growth factor dependent pathological angiogenesis in the eye. *EMBO Mol. Med.*, **6** : 604-623, 2014.
- 4) Okabe, K., Kobayashi, S., Yamada, T., Kurihara, T., Tai-Nagara, I., Miyamoto, T., Mukoyama, Y. S., Sato, T. N., Suda, T., Ema, M. & Kubota, Y. : Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. *Cell*, **159** : 584-596, 2014.
- 5) Usui, Y., Westenskow, P. D., Kurihara, T., Aguilar, E., Sakimoto, S., Paris, L. P., Wittgrove, C., Feitelberg, D., Friedlander, M. S., Moreno, S. K., Dorrell, M. I. & Friedlander, M. : Neurovascular crosstalk between interneurons and capillaries is required for vision. *J. Clin. Invest.*, **125** : 2335-2346, 2015.