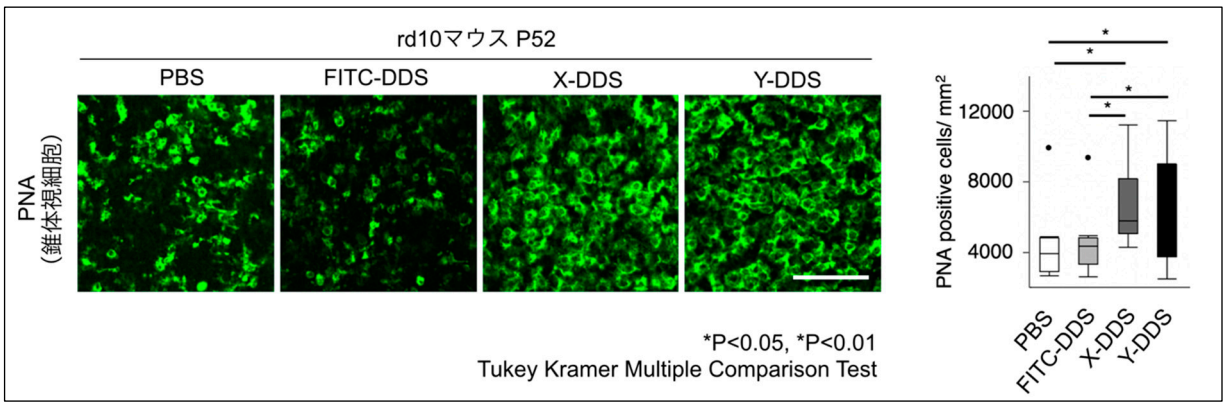
208　ネクローシス制御による網膜変性治療薬の開発	村上　祐介

【目的】細胞死の研究はアポトーシスの分子メカニズムを中心に進められてきたが、ネクローシスやオートファジーの責任分子が同定されるにつれ、非アポトーシス型細胞死の疾患への関与が注目されるようになってきている。網膜変性疾患の細胞死も長らくアポトーシスによって起こると考えられてきたが、以前の我々の研究から、網膜変性の病態にはアポトーシスのみならずネクローシスの関与もあること、ネクローシス誘導に重要な分子である Receptor interacting protein 1 kinase（RIP1K）-RIP3K 経路が、網膜変性の神経細胞死とそれに付随する炎症応答に大きく関わっていることが明らかとなった。本研究では、RIPK 阻害薬やネクローシス／炎症を標的とした薬剤を、新規のドラッグデリバリーシステム（DDS）で修飾し、網膜変性を効果的かつ安全に抑制しうる新規治療薬を開発する。

【方法】1. 新規 DDS の細胞・組織移行性の確認。FITC を封入した DDS（FITC-DDS）をマウスの静脈内または眼内に投与し、細胞や網膜への移行性をフローサイトメトリーで検討した。2. 網膜変性モデルにおける RIPK 活性局在の同定。*Rip3k*$^{f/f}$マウスを導入し、視細胞（*Rip3k*$^{f/f}$; *Nr1*^{Cre}）、マイクログリア（*Rip3k*$^{f/f}$; *Cx3cr1*^{CreERT}）、アストログリア（*Rip3k*$^{f/f}$; *GFAP*^{Cre}）特異的に RIPK 活性を阻害し、網膜変性モデル動物の表現型の変化を観察した。3. 薬剤封入 DDS の網膜変性抑制効果。RIPK 阻害薬である Necrostatin-1 を封入した Nec-1-DDS、抗炎症・細胞死抑制作用のある薬剤 X または Y を封入した X-DDS、Y-DDS を作製した。実験 1、2 で明らかとした DDS の細胞・組織移行性と、網膜変性における RIPK の活性局在を元に、網膜変性モデルに対する治療実験を行った。

【結果】1. FITC-DDS を静脈内に投与すると、単球の中でも特に Ly6c^{high} 炎症性単球に、効率良く FITC が導入されることが分かった。また網膜変性モデルマウス（rd10 マウス）に FITC-DDS を静脈内投与すると、網膜内のマクロファージに FITC が導入されることを確認した。FITC-DDS の眼内投与による網膜移行性については、現在検討中である。2. *Rip3k*$^{f/f}$マウスを凍結胚から個体化し、施設に導入した。今後 *Nr1*^{Cre}マウス、*Cx3cr1*$^{Cre-ERT}$マウス、*GFAP*^{Cre}マウスと交配し、網膜変性モデルでの表現型解析を進めていく予定である。3. DDS の素材や大きさなどを調整して、Nec-1 の薬剤含有率や均質性の高い DDS 作製条件を調整している。先に作製が完了した X-DDS、Y-DDS を rd10 マウスの静脈内に投与し、コントロールと比較して視細胞死ならびに網膜炎症が有意に抑制されることを明らかとした。薬剤 X、Y の経口投与では、副作用を生じる高濃度で投与しなければ治療効果が得られなかったため、DDS により低容量で高い有効性を達成することができた。今後 Nec-1-DDS の治療効果ならびに他の網膜変性モデルでの治療効果を検討する予定である。

新規 DDS 製剤の網膜変性抑制効果



208. ネクローシス制御による網膜変性治療薬の開発

村上　祐介

九州大学 大学院医学研究院 眼科学分野

Key words：ネクローシス，RIPK，DDS，網膜変性

緒　言

網膜は高度に分化した中枢神経組織であり、疾病によって視覚を司る神経細胞が失われると、視力を回復させることは困難である。網膜神経細胞の死は、未だ治療法の確立されていない網膜色素変性（Retinitis Pigmentosa：RP）や萎縮型加齢黄斑変性（Age-related Macular Degeneration：AMD）などの網膜変性疾患の根幹となる病態であり、その分子機構の解明は眼科領域のアンメットニーズ克服に向けて重要な課題である。

細胞死の研究はアポトーシスの分子メカニズムを中心に進められてきたが、ネクローシスやオートファジーの責任分子が同定されるにつれ、非アポトーシス型細胞死の疾患への関与が注目されるようになってきている。Receptor interacting protein 1 kinase（RIP1K）はネクローシス誘導に最も重要な分子であるが、2005 年に薬剤スクリーニングから RIP1K 阻害薬（Necrostatin-1：Nec-1）が同定されたこと［1］、さらに 2009 年に RIP3K が RIP1K 活性化のマスターレギュレーターであることが明らかになったこと［2～4］から、ネクローシスの研究が爆発的に加速している。

網膜変性疾患の細胞死も長らくアポトーシスによって起こると考えられてきたが、逆説的にも代表的なアポトーシス誘導因子である caspase ファミリーを阻害しても、網膜変性は十分に抑制されなかった［5］。そこで我々は網膜変性の病態に非アポトーシス型細胞死が関与する可能性を検証し、網膜変性の病態にはアポトーシスのみならずネクローシスの関与もあること、さらにネクローシス誘導に重要な分子である RIP1K～RIP3K 経路が、網膜変性の神経細胞死とそれに付随する炎症応答に大きく関わっていることが明らかとなった［6～8］。

このようにネクローシス経路の阻害薬は網膜変性疾患の治療に向けた有望なシーズであるものの、未だ臨床応用に至っていない。その大きな理由として、薬剤の半減期が短く難溶性であること、全身投与した場合には細胞死抑制により発癌リスク増加の懸念があることなどが挙げられ、その克服には標的臓器に効率的かつ持続的に薬剤を到達させうるドラッグデリバリーシステム（Drug Delivery System：DDS）の開発が必須である。そこで本研究では、国産の新規 DDS 技術を用いて、溶解性・移行性・徐放性を飛躍的に向上させたネクローシス阻害薬を作製し、その有効性について網膜変性モデル動物を用いて検証する。本研究成果から世界初の網膜変性治療薬の開発を目指す。

方　法

1.　新規DDSの細胞・組織移行性の確認

FITCを封入したDDS（FITC-DDS）をマウスの静脈内または眼内に投与し、細胞や網膜への移行性をフローサイトメトリーで検討する。WTマウスに加えて網膜変性モデル動物でも同様の実験を行い、導入細胞・導入効率の変化について比較した。

2.　網膜変性モデルにおけるRIPK活性局在の同定

これまでの研究では*Rip3k*ノックアウトマウスやNec-1を用いてRIPKを全身または眼局所で非特異的に抑制していたため、どの細胞（視細胞、マイクログリア、アストログリアなど）のRIP1K～RIP3K活性が、網膜変性に重要な役割を担っているかは不明であった。そこで本研究では*Rip3k*$^{f/f}$マウスを導入し、視細胞（*Rip3k*$^{f/f}$;*Nr1*^{Cre}）、マイクログリア（*Rip3k*$^{f/f}$; *Cx3cr1*^{CreERT}）、アストログリア（*Rip3k*$^{f/f}$; *GFAP*^{Cre}）特異的にRIPK活性を阻害した。それぞれの条件での網膜変性モデル動物の神経細胞死ならびに炎症の変化について、組織学的並びに電気生理学的に検討した。

3.　薬剤封入DDSの網膜変性抑制効果

実験1、2で明らかとしたDDSの細胞・組織移行性と、網膜変性におけるRIPKの活性局在を元に、網膜変性モデルへの最適なDDS薬剤の投与法を検証した。RIPK阻害薬であるNecrostatin-1を封入したNec-1-DDS、抗炎症・細胞死抑制作用のある薬剤XまたはYを封入したX-DDS、Y-DDSを作製し、網膜変性モデルで治療効果を検証した。薬剤の投与濃度・投与頻度・投与開始時期を段階的に調整して有効性と安全性を評価し、臨床的な治療介入を意識した最適な薬剤投与プロトコールを確立した。

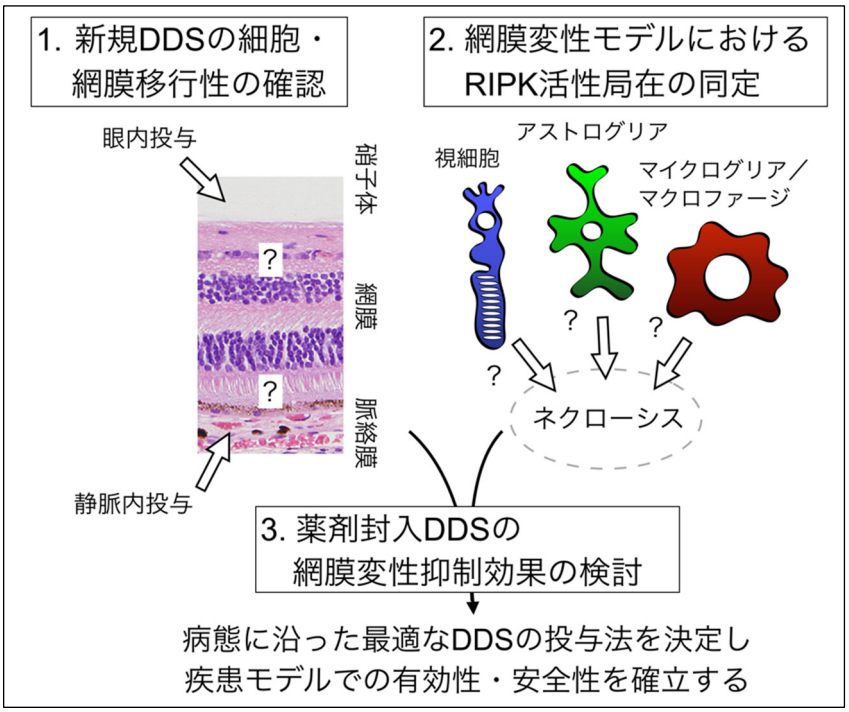


図 1.　研究計画の概要

結果および考察

1.　新規DDSの細胞・組織移行性の確認

FITC-DDSを静脈内に投与すると、CD11b^{+}の単球に80%近くの効率で、CD11b^{+}Ly6c^{high}の炎症性単球に95%以上の効率でFITCが導入されることが分かった（図2A）。

次にFITC-DDSを静脈内に投与24時間後、網膜への移行性について検討した。WTマウスではFITCの網膜への移行を認めなかったが、RPモデルマウス（rd10マウス）では網膜内のマクロファージ（CD45^{high}CD11c^{high}）にFITCが導入されていた（図2B）。一方で、内在性のマイクログリア（CD45^{low}CD11c^{low}）にはFITCの導入を認めなかった。RPモデルでは血管のバリア機能が低下しているため、FITCを取り込んだ炎症型単球が網膜内に浸潤した結果と考察した。FITC-DDSの眼内投与による網膜移行性については、現在検討中である。

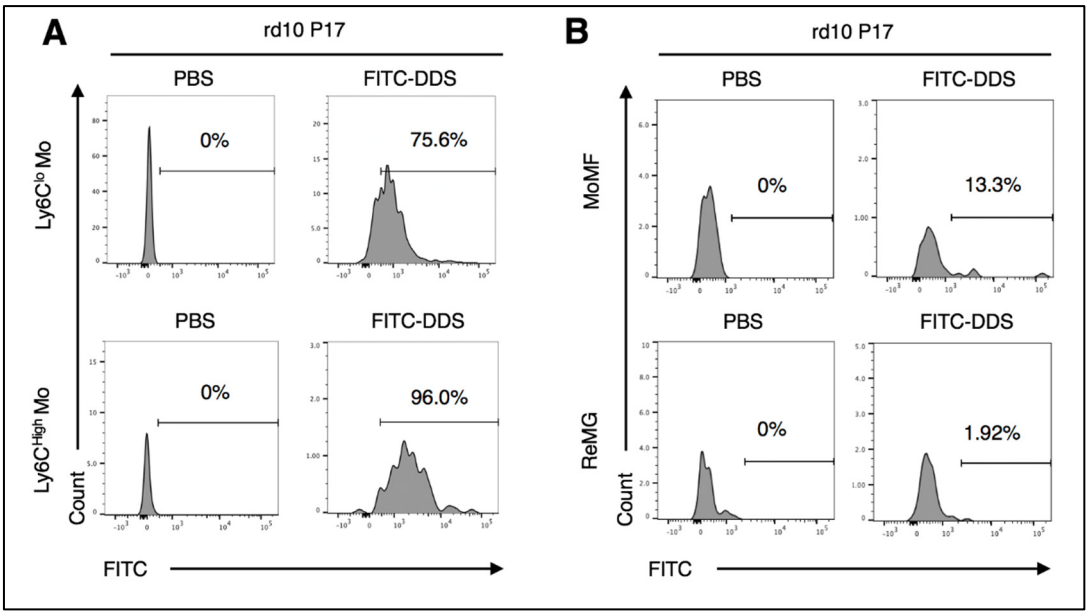


図 2. 新規 DDS により炎症性単球や網膜内マクロファージに効率的に薬剤が導入される

A) 新規 DDS による末梢血単球への薬剤導入。PBS または FITC-DDS を rd10 マウスの静脈内に投与し、その 2 時間後に末梢血を採取した。CD11b 陽性の単球のうち、特に Ly6c^{high} の炎症性単球では、95%以上の細胞に FITC が強く取り込まれていた。

B) 新規 DDS による網膜マクロファージ／マイクログリアへの薬剤導入。PBS または FITC-DDS を rd10 マウスの静脈内に投与し、その 24 時間後に網膜を採取した。既報に従い CD45^{high}CD11c^{high} の分画をマクロファージ（Monocyte-derived macrophage : MoMF）、CD45^{low}CD11c^{low} の分画をマイクログリア（Resident microglia : ReMG）と定義した。FITC-DDS 投与群では、MoMF の 13%に FITC の取り込みを認めた。一方で ReMG には FITC の取り込みは認めなかった。

2. 網膜変性モデルにおける RIPK 活性局在の同定

Rip3k$^{f/f}$ マウスの導入にあたりクリーニングが必要であったため、凍結胚から個体化し施設に導入した。予定よりも実験の開始が遅くなったが、十分なマウス数が確保できたため、今後 *Nr1*^{Cre} マウス、*Cx3cr1*$^{Cre\text{-}ERT}$ マウス、*GFAP*^{Cre} マウスと交配し、網膜変性モデルでの表現型解析を進めていく予定である。

3. 薬剤封入DDSの網膜変性抑制効果

企業と共同で、新規 DDS を共同開発している。Nec-1 を封入した DDS に関しては、DDS の構成素材や大きさなどを調整して、薬剤含有率や均質性の高い DDS 作製条件を調整中である。

先に作製が完了した X-DDS、Y-DDS について、rd10 マウスに対する治療効果を検討した。生後 21 日より週 2 回静脈内投与を行い、FITC-DDS、PBS 投与群をコントロールとした。炎症に対する影響を検討したところ、X-DDS、Y-DDS 静脈内投与により末梢血中の CD11b^{+}Ly6c^{high} 炎症性単球が減少し（図 3A）、X-DDS 投与により網膜内の CD45^{high}CD11c^{high} マクロファージが減少した（図 3B）。生後 52 日で視細胞数（PNA 陽性細胞密度）を解析したところ、コントロールと比較して X-DDS、Y-DDS 投与群では、視細胞死が有意に抑制されていた（図 3C）。また薬剤 X または Y を経口投与した場合には、通常の投与量では治療効果が得られず、その 10 倍量の高濃度投与群でのみ視細胞死の抑制効果が得られた。高濃度の投与では副作用が懸念されるため、DDS により低容量で高い有効性を達成することができた。

今後 Nec-1-DDS の治療効果ならびに他の網膜変性モデルでの治療効果を検討する予定である。

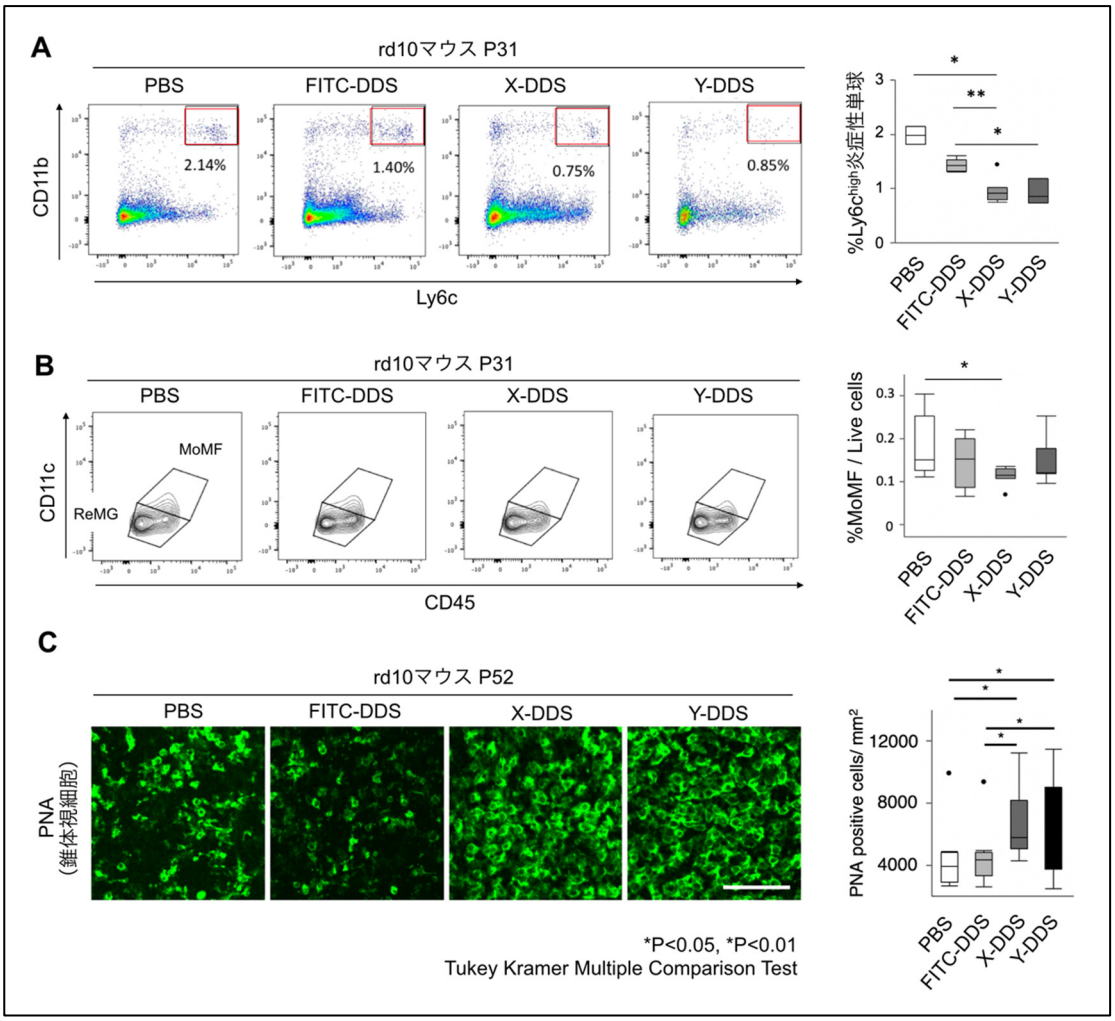


図 3. 薬剤封入 DDS の網膜炎症・変性抑制効果

A) 炎症性単球に対する薬剤封入 DDS の作用。rd10 マウスに対して生後 21 日より PBS、FITC-DDS、X-DDS、Y-DDS を週 2 回の頻度で静脈内に投与した。31 生日で末梢血を採取し、$CD11b^{+}Ly6c^{high}$ の炎症性単球の割合を比較した。X-DDS、Y-DDS 投与群では、炎症性単球の減少を認めた。*P < 0.05、**P < 0.01, Tukey-Kramer Multiple Comparison Test。

B) 網膜マクロファージ／マイクログリアに対する薬剤封入 DDS の作用。上記と同様の実験を行い、31 生日で網膜を採取し、$CD45^{high}CD11c^{high}$ のマクロファージ（Monocyte-derived macrophage：MoMF）と $CD45^{low}CD11c^{low}$ のマイクログリア（Resident microglia：ReMG）の割合を比較した。X-DDS 投与群では、コントロールと比較してマクロファージの減少を認めた。一方でマイクログリアの割合には変化を認めなかった。*P < 0.05、Tukey-Kramer Multiple Comparison Test。

C) 錐体視細胞死に対する薬剤封入 DDS の作用。上記と同様の実験を行い、52 生日で網膜を採取し、PNA で錐体細胞を染色した。X-DDS、Y-DDS 投与群では、コントロールと比較して錐体細胞密度が保持されていた。*P < 0.05、Tukey-Kramer Multiple Comparison Test。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院医学研究院眼科学教室の舩津淳、池田康博、柴田健輔、園田康平である。研究をサポートしていただいた上原記念生命科学財団に心より感謝致します。

文　献

1) Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. Nat Chem Biol. 2005;1(2):112-9. PMID: 16408008. doi: 10.1038/nchembio711.

2) Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. Cell. 2009;137(6):1112-23. PMID: 19524513. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.037.

3) He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. Cell. 2009;137(6):1100-11. PMID: 19524512. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.021.

4) Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. Science. 2009;325(5938):332-6. PMID: 19498109. doi: 10.1126/science.1172308.

5) Doonan F, Donovan M, Cotter TG. Caspase-independent photoreceptor apoptosis in mouse models of retinal degeneration. J Neurosci. 2003;23(13):5723-31. PMID: 12843276.

6) Trichonas G, Murakami Y, Thanos A, Morizane Y, Kayama M, Debouck CM, et al. Receptor interacting protein kinases mediate retinal detachment-induced photoreceptor necrosis and compensate for inhibition of apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010. PMID: 21098270. 10.1073/pnas.1009179107.

7) Murakami Y, Matsumoto H, Roh M, Suzuki J, Hisatomi T, Ikeda Y, et al. Receptor interacting protein kinase mediates necrotic cone but not rod cell death in a mouse model of inherited degeneration. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109(36):14598-603. PMID: 22908283. doi: 10.1073/pnas.1206937109.

8) Murakami Y, Matsumoto H, Roh M, Giani A, Kataoka K, Morizane Y, et al. Programmed necrosis, not apoptosis, is a key mediator of cell loss and DAMP-mediated inflammation in dsRNA-induced retinal degeneration. Cell death and differentiation. 2014;21(2):270-7. PMID: 23954861. doi: 10.1038/cdd.2013.109.