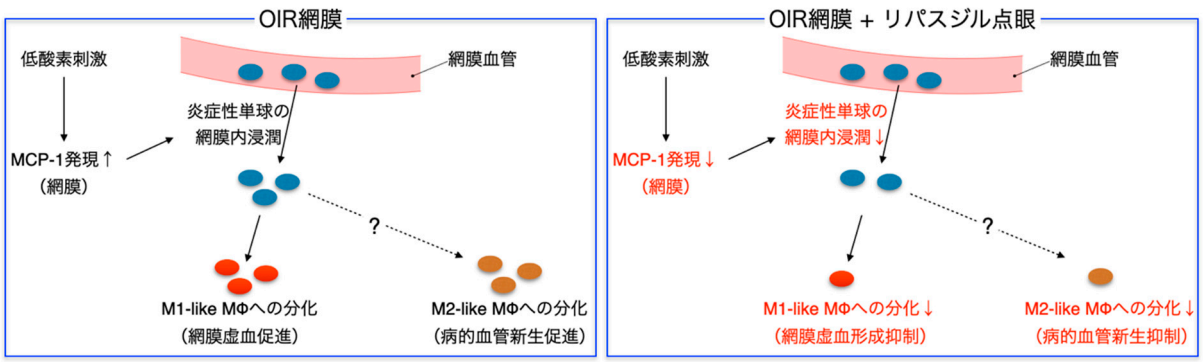
169　未熟児網膜症に対する点眼治療薬の創製	有馬　充

【目的】本研究は、未熟児網膜症（Retinopathy of prematurity：ROP）に対する点眼治療薬創製を目的とする。ROP は早産児虚血網膜に生じる血管増殖性疾患である。既存治療である網膜光凝固と抗血管内皮増殖因子抗体硝子体注射（抗 VEGF 治療）は、侵襲性が高く非可逆的神経合併症に関する懸念も大きい。我々はこれまでに、ROP 疾患モデル（Oxygen-induced retinopathy：OIR）マウス網膜の網羅的解析から、Rho キナーゼ（ROCK）の ROP 病態への関与を明らかにした。ROCK 阻害剤であるリパスジル点眼により ROP 病態の根幹である異常網膜血管新生、網膜虚血が減少したことから、点眼という世界初の ROP 低侵襲治療法開発に着手した。リパスジル点眼はグラナテック®点眼液として上市されている。そこでリパスジル点眼の ROP への適応拡大を目指し、リパスジルの薬効機序解明を行った。

【方法】我々は過去に OIR 網膜血管新生への M1-like、M2-like マクロファージ（MΦ）の関与を明らかにしている。本研究前に行った検証において、リパスジルにより OIR 網膜内炎症性サイトカインの発現が減少したことから、1. OIR 網膜における M1-like, M2-like MΦの局在と定量、2. 塩化ガドリニウム（GdCl3）およびクロドロン酸リポソーム（Cl2MDP-LIP）投与後の、OIR 表現型の変化、3. リパスジル点眼投与後の OIR 網膜における MΦの population・局在変化と OIR 表現型の変化、以上を免疫染色、FACS、PCR にて検証した。4. OIR 網膜 MΦの遺伝子発現解析および M1-like、M2-like MΦへの分化経路推定を目的とし、OIR マウス網膜から CD11b 陽性細胞を抽出し、シングルセル RNA シークエンスを行った。

【結果】1. OIR 網膜において、虚血領域では M1-like MΦが、異常血管新生周囲では M2-like MΦが増加した。2. GdCl3（M1-like MΦ消去）および Cl2MDP-LIP（M2-like MΦ消去）投与どちらにおいても、網膜虚血、異常血管新生領域はコントロールと比較して有意に減少したが、虚血抑制効果は GdCl3 の方が高く、異常血管新生抑制効果は Cl2MDP-LIP の方が高かった。3. リパスジル点眼により、OIR 網膜における M1-like、M2-like MΦはともに減少した。同時に OIR 網膜における単球走化因子 MCP-1 の発現も有意に減少した。そこで CCR2、F4/80、CD11b 共陽性細胞の定量を行ったところ、リパスジルにより有意に減少していた。OIR 網膜での同細胞の局在を確認したところ、虚血領域に存在していた。OIR に対して抗 MCP-1 抗体硝子体投与を行ったところ、リパスジルと同様に異常血管新生および網膜虚血が有意に減少した。解析の結果、CD11b 陽性細胞は九つのクラスターに分類された。今後 M1-like、M2-like MΦへの分化経路推定を行う予定である。

本研究で解明されたリパスジルの薬効機序



169. 未熟児網膜症に対する点眼治療薬の創製

有馬　充

*九州大学病院 眼科

Key words：未熟児網膜症，ROCK，血管新生，ドラッグ・リポジショニング

緒　言

未熟児網膜症（ROP）は代表的な小児失明原因疾患である。本邦で年間 5,000 人が ROP を発症し、うち約 1,000 人が重症化し治療を受ける。ROP は治療時期を逃すと永続的な視力障害を生涯残す重篤な疾患であり、視覚支援学級児童の原因疾患のうち 19%を占める。

ROP は早産児虚血網膜に生じる血管増殖性疾患である。網膜血管網は正産期（在胎 37 週）以降に完成するため、早産児では網膜周辺部に虚血領域が存在する。生後虚血領域へ網膜血管が伸長する必要があるが、一部の児では網膜前に異常新生血管が出現し、線維血管増殖膜の形成を経て網膜剥離に至る（図 1 左）。既存治療として光凝固術及び抗血管内皮増殖因子抗体硝子体注射（抗 VEGF 治療）が行われるが、どちらも疼痛を伴う侵襲性の高い治療法である上に、表 1 に示すような合併症リスクが存在する［1〜4］。

我々は興和株式会社と共同研究を行い、リパスジル（グラナテック®点眼液、成人緑内障に対する点眼治療薬として既承認）が ROP 進行抑制効果及び治療効果を有することを明らかにし、知財化を行った［5］。点眼は低侵襲であるため早期治療介入が可能であり、ROP が重症化する前に治癒へ導くことが期待できる（図 1 右）。既存治療には合併症リスクから治療適応のラインが存在し、このラインを越えるまで経過観察する他に手立てがない。点眼治療の有効性が証明されれば、ROP を既存治療適応ラインまで重症化させずに治癒させることが期待できる。本研究ではリパスジル点眼の ROP への適応拡大（ドラッグ・リポジショニング）を目指し、リパスジルの薬効機序解明を行った。

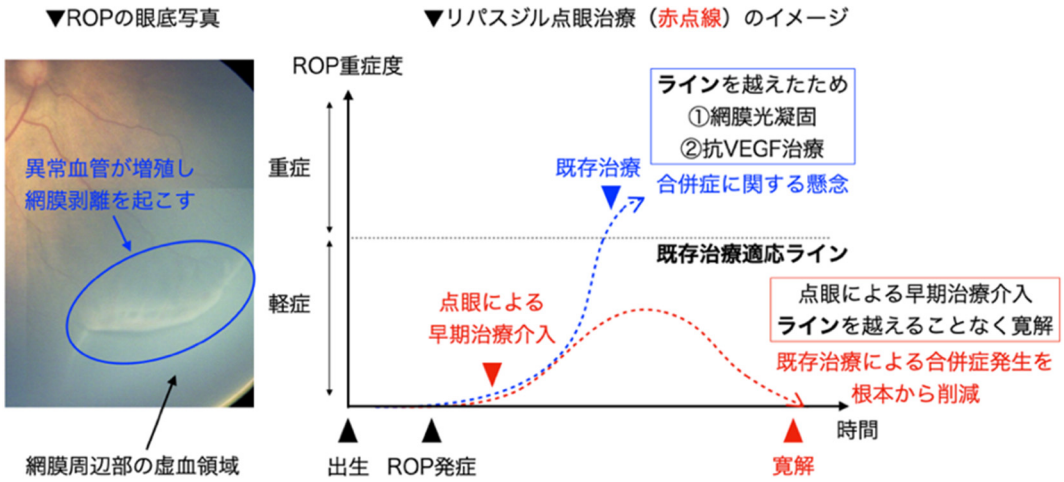


図 1. ROP の病態とリパスジル点眼治療のイメージ

*現在の所属：九州大学病院 ARO次世代医療センター

表 1. 既存治療（光凝固と抗 VEGF 治療）の問題点

	合併症
光凝固	凝固斑瘢痕化による、視野狭窄・強度近視・視力発達障害［1］ 医原性呼吸循環不全（長時間に渡る疼痛を伴う治療）
抗 VEGF 治療	高率で ROP 再発（30%超）［2］ 正常網膜血管形成阻害（4 歳で 80%に血管形成異常）［3］ 中枢神経発達に影響を及ぼす懸念［4］

方　法

我々は過去に ROP 疾患モデル（Oxygen-induced retinopathy：OIR）における網膜血管新生への M1-like、M2-like マクロファージ（MΦ）の関与を明らかにしている［6］。本研究前に行った検証において、リパスジル点眼により OIR 網膜における炎症性サイトカインの発現が減少したことから、以下の実験を行った。OIR 作製方法を図 2 に示す。

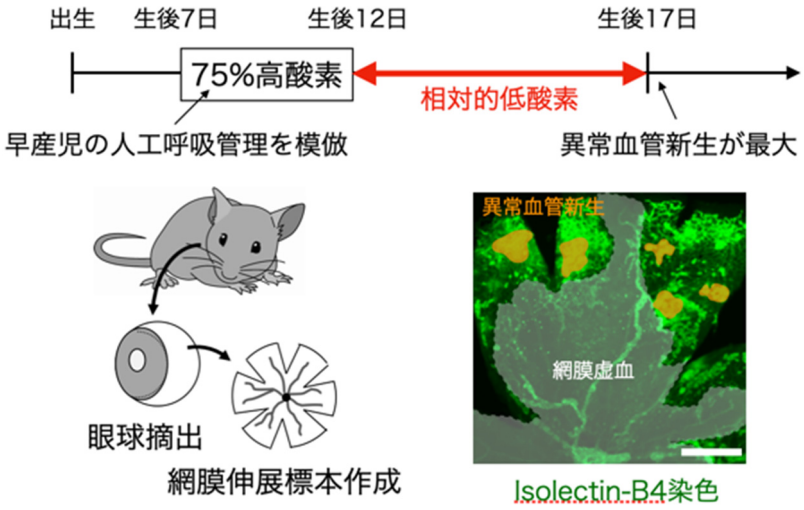


図 2. OIR 作製方法

一時的に高酸素に暴露し、相対的低酸素状態に陥らせることで、網膜異常血管新生を誘導する。Isolectin-B4 は血管染色のために使用。虚血領域を灰色で、異常血管を黄色で示す（スケールバー：500μm）。

1. OIR 網膜における M1-like、M2-like MΦの局在と定量

生後 17 日目の OIR マウスから網膜伸展標本を作製し、M1-like、M2-like MΦの局在を免疫染色にて確認した。また、眼球から網膜のみを回収し、PCR にて M1-like、M2-like MΦ関連遺伝子の発現を定量し、FACS にて M1-like、M2-like MΦ数を測定した。MΦマーカーとして CD11b、F4/80、CX3CR1 を、M1-like MΦマーカーとして CD68、CD80 を、M2-like MΦマーカーとして CD163、CD206 を、血管内皮細胞マーカーとして CD31 を用いた。

2. 塩化ガドリニウム（GdCl3）およびクロドロン酸リポソーム（Cl2MDP-LIP）投与後の OIR 表現型の変化

M1-like MΦを消去する目的で、270μM の GdCl3 を生後 12 日目と 15 日目の OIR マウスに腹腔内投与した。また、M2-like MΦを消去する目的で、5μg の Cl2MDP-LIP を生後 12 日目の OIR マウスに硝子体投与した。OIR 表現型の変化を免疫染色で確認した。

3. リパスジル点眼投与後、抗 MCP-1 中和抗体硝子体投与後の OIR 網膜における MΦの population・局在変化と OIR 表現型の変化

リパスジル点眼群では、生後 12 日目より 17 日目まで 0.8%リパスジルを 1 日 3 回両眼に点眼した。抗 MCP-1 中和抗体群では、生後 12 日目に 200 ng の抗 MCP-1 抗体（R&D）を両眼硝子体投与した。生後 17 日で眼球摘出を行い、MΦの population・局在変化と OIR 表現型の変化を免疫染色、FACS で確認した。また、網膜中の白血球走化因子、MCP-1、MIP1α、MIP1βの発現を PCR にて定量した。CCR2 陽性単球／MΦの定量、局在確認を、FACS、免疫染色を用いて行った。

4. OIR 網膜 MΦの遺伝子発現解析および M1-like、M2-like MΦへの分化経路推定

生後 17 日目の OIR マウスから網膜を回収し、CD11b 陽性細胞のみを抽出した。10× Genomics Chromium を用いて single-cell RNA-seq ライブラリを作製した。遺伝子数が 200 未満または 2,500 以上の細胞、ミトコンドリア遺伝子の転写産物が 10%以上ある細胞は除外した。コントロールマウスの網膜 1,497 個の細胞、OIR マウス網膜の 3,096 個の細胞、リパスジルを投与した OIR マウス網膜の 2,947 個の細胞を解析した。バッチ効果と細胞周期の影響を補正し、3 群の発現プロファイルを統合した。主成分分析を用いて次元削減を行った。統合された発現プロファイルを SNN 法によりクラスタリングし、UMAP により可視化した。リンパ球と網膜神経細胞のクラスターは除外した。

結果および考察

1. OIR 網膜における M1-like、M2-like MΦの局在と定量

生後 17 日目の OIR から網膜伸展標本を作製し F4/80 染色を行った（図 3A）ところ、網膜表層の異常新生血管周囲と網膜内層の虚血領域に MΦが集積していた（図 3B）。PCR では M1-like MΦマーカーである CD80、CD68、M2-like MΦマーカーである CD206、CD163 の発現量はどちらも有意に上昇していた（図 3C）。免疫染色を行ったところ、虚血領域の網膜内層 MΦでは CD80 が、異常血管周囲の網膜表層 MΦでは CD206 が優位に発現していた（図 3D、E）。つまり低酸素刺激により、主に虚血領域には M1-like MΦが、異常血管周囲には M2-like MΦが集積していた。

2. GdCl3 腹腔内投与および Cl2MDP-LIP 硝子体投与後の、OIR 表現型の変化

既報に従い［7］、GdCl3 投与で M1-like MΦを、Cl2MDP-LIP 投与で M2-like MΦを消去し、OIR 表現型が変化するかどうか免疫染色にて確認した（図 4A、C）。どちらも網膜虚血や異常血管を有意に減少させたが（図 4B、D）、虚血抑制効果は GdCl3 の方が高く、異常血管新生抑制効果は Cl2MDP-LIP の方が高い傾向にあった（図 4E）。以上から、網膜虚血形成には M1-like MΦが、異常血管新生形成には M2-like MΦが主に関与していることが示唆された。

3. リパスジル点眼後の OIR 網膜における MΦの population・局在変化と OIR 表現型の変化

我々は過去に、リパスジル点眼により OIR 網膜における網膜虚血、異常血管新生がともに減少することを報告している［5］。FACS にて MΦの population を確認したところ、M1-like、M2-like MΦ数はともに減少しており（図 5A、B）、免疫染色でも虚血領域の M1-like MΦ、異常血管周囲の M2-like MΦが有意に減少することを確認した（図 5C、D）。

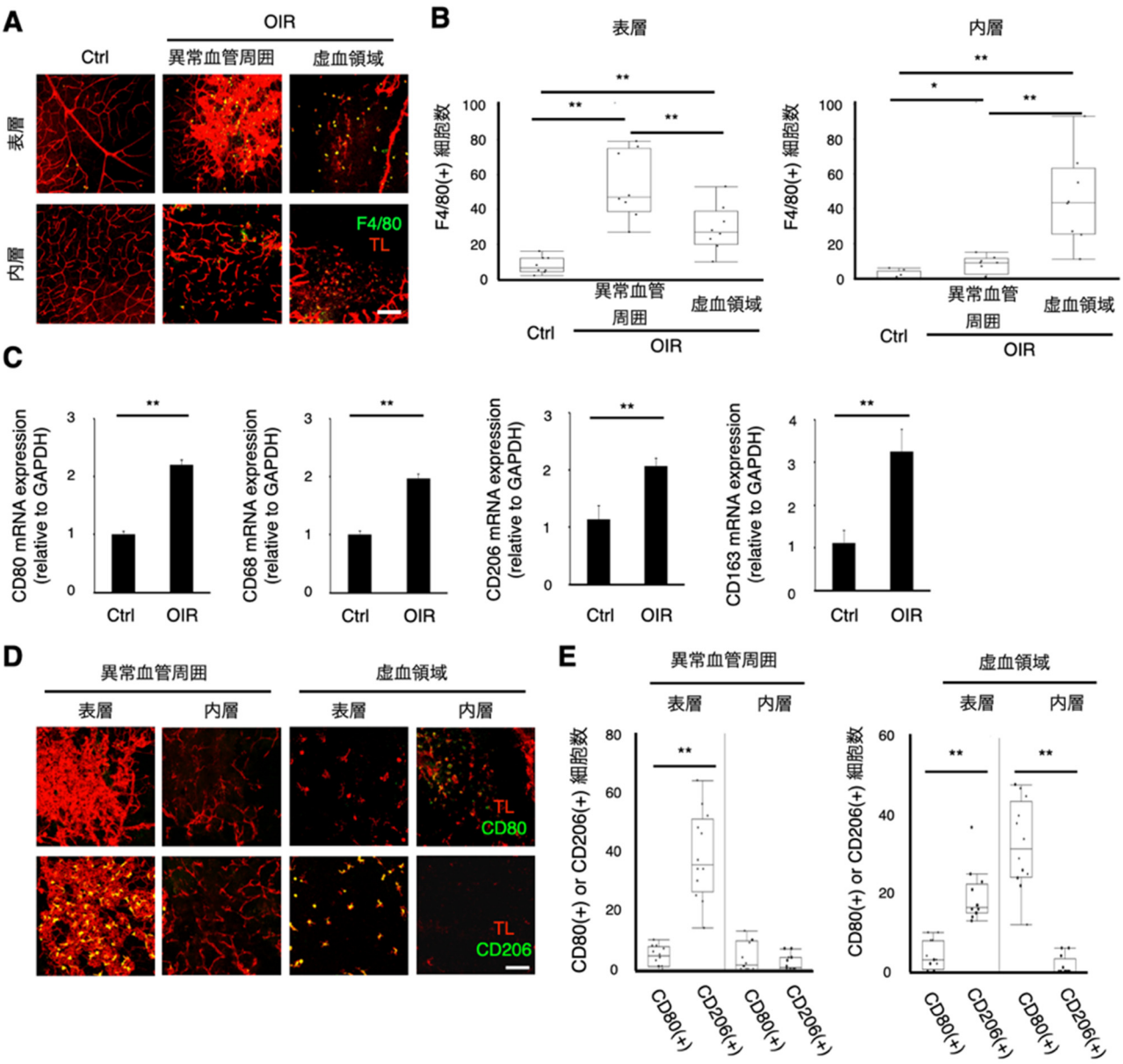


図 3. OIR 網膜における MΦの局在と定量

A) OIR 網膜の免疫染色。F4/80 は MΦ染色、TL（tomato lectin）は血管染色のために使用。スケールバー：100μm。

B) 異常血管周囲と虚血領域に存在する MΦ数の比較。左は網膜表層、右は網膜内層。N＝8、*P＜0.05、**P＜0.01、Wilcoxon rank sum test。

C) M1-like MΦ関連遺伝子（CD80、CD68）、M2-like MΦ関連遺伝子（CD206、CD163）の発現比較。N＝6、**P＜0.01、Wilcoxon rank sum test。

D) OIR 網膜における、CD80 陽性 MΦ（M1-like MΦ）、CD206 陽性 MΦ（M2-like MΦ）の局在。スケールバー：100μm。

E) 異常血管周囲と虚血領域における CD80 陽性 MΦ（M1-like MΦ）、CD206 陽性 MΦ（M2-like MΦ）数の比較。N＝12、**P＜0.01、Wilcoxon rank sum test。

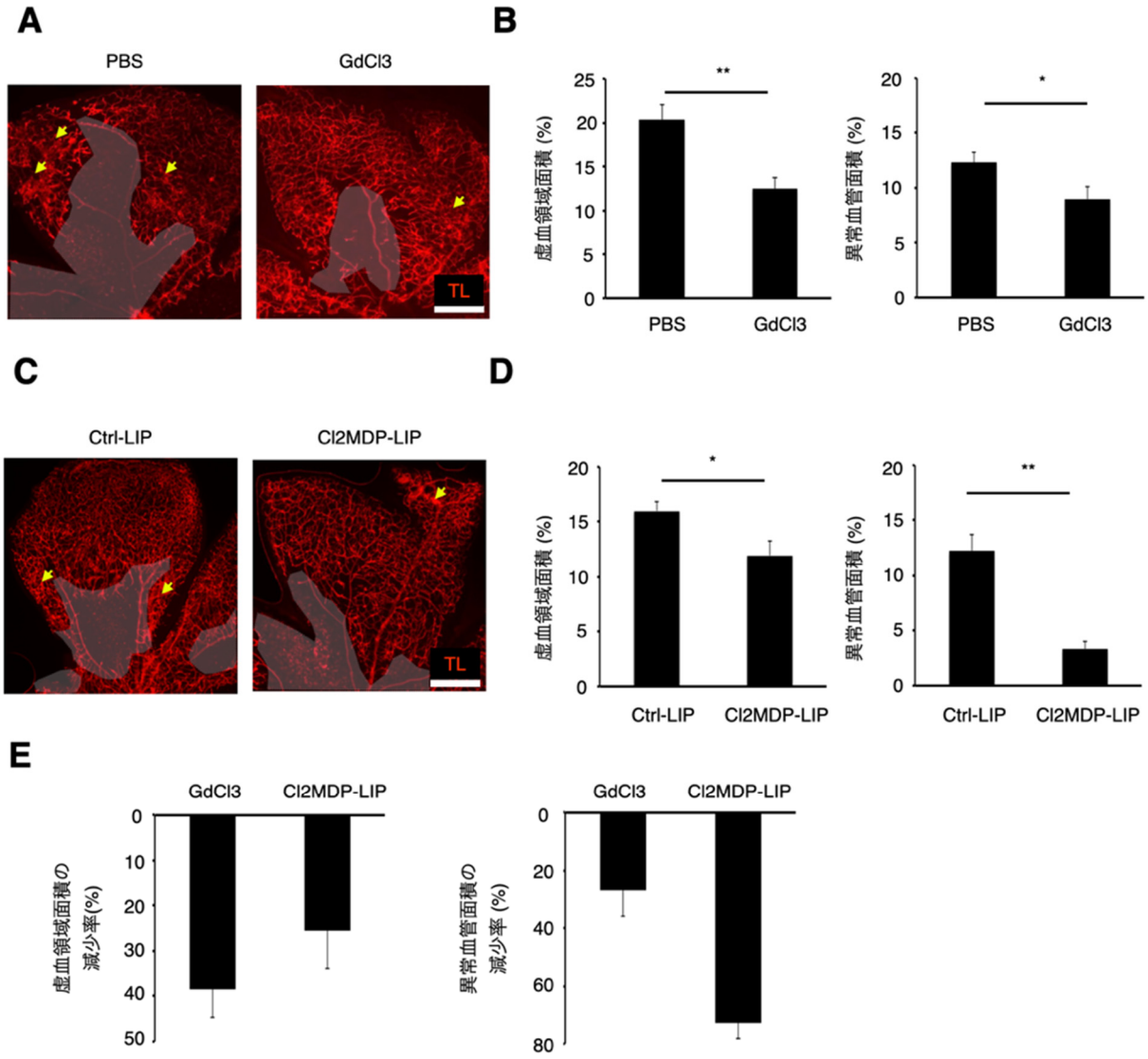


図 4. GdCl3 および Cl2MDP-LIP 投与後の、虚血領域・異常血管面積の変化

A、C）OIR 網膜の免疫染色。TL（tomato lectin）は血管染色のために使用。虚血領域を灰色で、異常血管を黄色矢印で示す。スケールバー：500μm。

B、D）虚血領域・異常血管面積の比較。n＝12、*P＜0.05、**P＜0.01、Student's t-test。

E）　虚血領域・異常血管面積の減少率の比較。N＝12、Student's t-test。

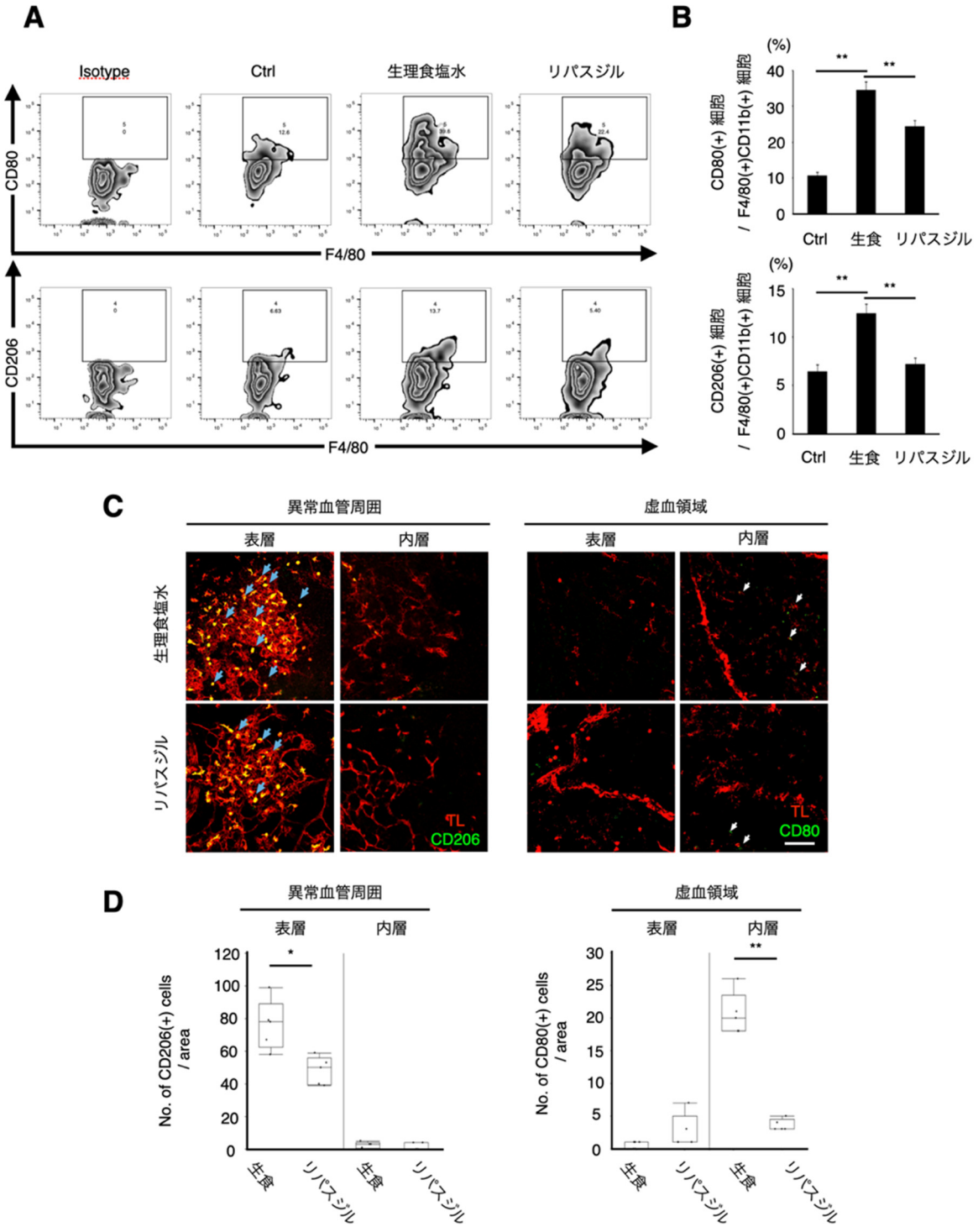


図 5. リパスジル点眼後の MΦ の population・局在変化と OIR 表現型の変化

A、B) リパスジル点眼後の CD80 陽性 MΦ（M1-like MΦ）数、CD206 陽性 MΦ（M2-like MΦ）数の変化（A）とその定量（B）。n=5、**P<0.01、Student's t-test。

C) CD80 陽性 MΦ（M1-like MΦ）、CD206 陽性 MΦ（M2-like MΦ）の局在。スケールバー：100 μm。

D) 異常血管周囲と虚血領域における CD80 陽性 MΦ（M1-like MΦ）、CD206 陽性 MΦ（M2-like MΦ）数の比較。N=12、*P<0.05、**P<0.01、Wilcoxon rank sum test。

また、OIR 網膜に発現する白血球走化因子の発現量を PCR で検証したところ、リパスジルにより MCP-1 の発現上昇が有意に抑制された（図 6A）。そこで FACS にて CCR2、F4/80、CD11b 共陽性細胞数の定量を行ったところ、リパスジルにより有意に減少していた（図 6B）。免疫染色で同細胞の局在を確認したところ、虚血領域に存在する M1-like MΦの局在と一致した（図 6C）。つまり、低酸素刺激により網膜での MCP-1 発現が上昇し、末梢血から単球が網膜内へ浸潤した後に、M1-like MΦへ分化することが示唆された。抗 MCP-1 抗体硝子体注射により、リパスジルと同様に病的血管新生および網膜虚血が有意に減少した（図 6D）。

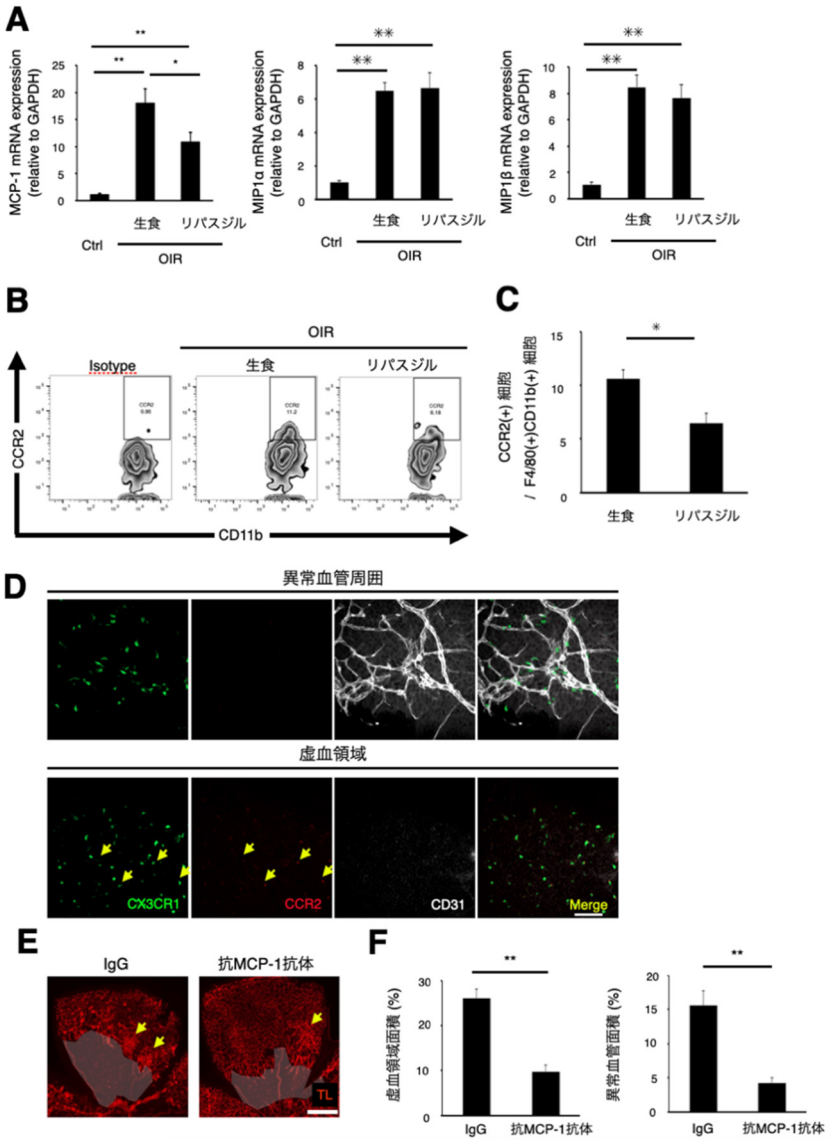


図 6. リパスジルの薬効機序（MCP-1 発現抑制による網膜への単球／MΦ浸潤抑制）

A) リパスジル点眼後の MCP-1、MIP1 α、MIP1 β mRNA の比較。n＝6、*P＜0.05、**P＜0.01、Student's t-test。

B、C) リパスジル点眼後の CCR2、CD11b、F4/80 共陽性細胞数の比較（B）と定量（C）。n＝5、*P＜0.05、Student's t-teD）

D) リパスジル点眼後の CCR2、CD11b、F4/80 共陽性細胞の局在。スケールバー：50 μ m。

E) OIR 網膜の免疫染色。TL（tomato lectin）は血管染色のために使用。虚血領域を灰色で、異常血管を黄色矢印で示す。スケールバー：500 μ m。

F) 虚血領域・異常血管面積の比較。N＝12、*P＜0.05、**P＜0.01、Student's t-test。

4. OIR 網膜ＭΦの遺伝子発現解析および M1-like、M2-like ＭΦへの分化経路推定

クラスタリング結果を図 7 に示す。クラスター0、1、2、3、8 はマイクログリア、クラスター4、5、6、7、9 がＭΦと考えられた。現在、trajectory 解析を行っており、M1-like、M2-like ＭΦへの分化経路を推定するとともに、ROCK がＭΦの分化へどのように関与するのか検証する予定である。

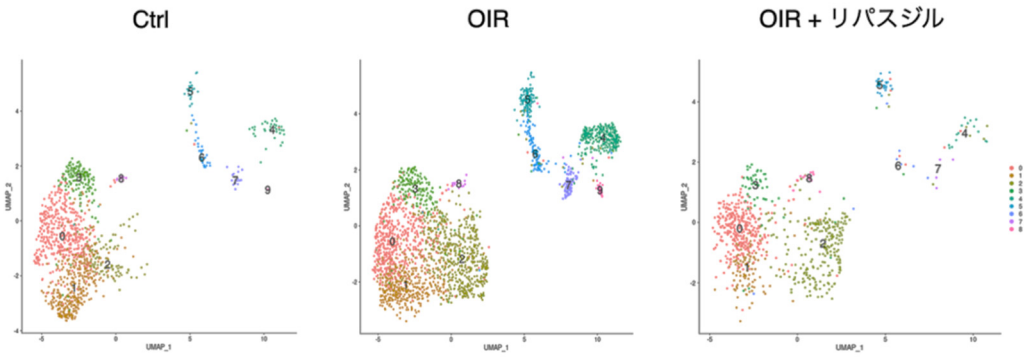


図 7. OIR 網膜 CD11b 陽性細胞のシングルセル RNA シークエンス結果

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研究室の藤井裕也、森雄二郎である。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) Mori Y, Arima M, Ueda E, Fujiwara K, Seki E, Nakama T, Tsukamoto S, Akiyama M, Sonoda KH. Risk factors for myopia at 1-year corrected age following laser photocoagulation for retinopathy of prematurity. Eye (Lond). Online ahead of print. 2020 Nov 30. PMID: 33257802 DOI: 10.1038/s41433-020-01321-z

2) Stahl A, Lepore D, Fielder A, Fleck B, Reynolds JD, Chiang MF, Li J, Liew M, Maier R, Zhu Q, Marlow N. Ranibizumab versus laser therapy for the treatment of very low birthweight infants with retinopathy of prematurity (RAINBOW): an open-label randomised controlled trial. Lancet. 2019 Oct 26;394(10208):1551-1559. Epub 2019 Sep 12. PMID: 31522845 DOI: 10.1016/S0140-6736(19)31344-3

3) Lepore D, Quinn GE, Molle F, Orazi L, Baldascino A, Ji MH, Sammartino M, Sbaraglia F, Ricci D, Mercuri E. Follow-up to Age 4 Years of Treatment of Type 1 Retinopathy of Prematurity Intravitreal Bevacizumab Injection versus Laser: Fluorescein Angiographic Findings. Ophthalmology. 2018 Feb;125(2):218-226. PMID: 28867130 DOI: 10.1016/j.ophtha.2017.08.005

4) Arima M, Akiyama M, Fujiwara K, Mori Y, Inoue H, Seki E, Nakama T, Tsukamoto S, Ochiai M, Ohga S, Sonoda KH. Neurodevelopmental outcomes following intravitreal bevacizumab injection in Japanese preterm infants with type 1 retinopathy of prematurity. PLoS One. 2020 Mar 20;15(3):e0230678. eCollection 2020. PMID: 32196539 DOI: 10.1371/journal.pone.0230678

5) Yamaguchi M, Nakao S, Arita R, Kaizu Y, Arima M, Zhou Y, Kita T, Yoshida S, Kimura K, Isobe T, Kaneko Y, Sonoda KH, Ishibashi T. Vascular Normalization by ROCK Inhibitor: Therapeutic Potential of Ripasudil (K-115) Eye Drop in Retinal Angiogenesis and Hypoxia. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 Apr 1;57(4):2264-76. PMID: 27124322 DOI: 10.1167/iovs.15-17411

6) Zhou Y, Yoshida S, Nakao S, Yoshimura T, Kobayashi Y, Nakama T, Kubo Y, Miyawaki K, Yamaguchi M, Ishikawa K, Oshima Y, Akashi K, Ishibashi T. M2 Macrophages Enhance Pathological Neovascularization in the Mouse Model of Oxygen-Induced Retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015 Jul;56(8):4767-77. PMID: 26218904 DOI: 10.1167/iovs.14-16012

7) Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, van Wijngaarden P, Wagers AJ, Williams A, Franklin RJM, Ffrench-Constant C: M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. Nat Neurosci. 2013 Sep;16(9):1211-1218. Epub 2013 Jul 21. PMID: 23872599 DOI: 10.1038/nn.3469