

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名： 多層オミックス解析による個別化緑内障創薬

研究開発実施期間： 令和元年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名： 中澤 徹

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東北大学 大学院医学系研究科 教授

II 研究開発の概要

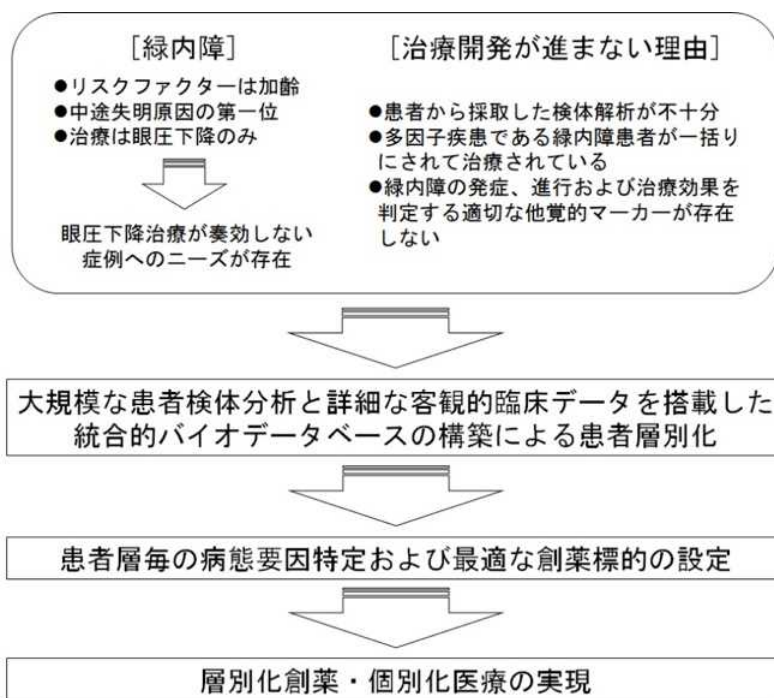
背景：

本邦の明るい超高齢社会を支えるには生活の質に直結する視覚を維持することが必須で、罹患率の高い緑内障を制圧することは大変重要である。特に、視野欠損の進行が早く、視力が低下する重症緑内障を予測し、最適な先制医療・個別化医療を提供することは、医療経済の面からも急務である。

緑内障は高眼圧だけでなく、眼血流など多因子より生じる視神経萎縮と、それに伴う不可逆な視野障害を呈する眼疾患である。緑内障は40歳以上の5%が罹患し、本邦の中途失明原因の第一位であり、現在も緑内障による失明患者は増加している。最近の技術の進歩により糖尿病による失明患者は減少し始めたのに対し、緑内障による失明患者数は増加の一途を辿っている。緑内障の唯一エビデンスのある治療法は眼圧下降であるが、治療後も視野欠損が進行する症例が40%認め、アンメットメディカルニーズが存在する。そのため、既存の眼圧下降治療以外の新規治療薬開発に対する社会的ニーズと市場規模は大きい。

また、緑内障は多因子疾患とされ、個人ごとに病態が異なる可能性がある。これまで適切なバイオマーカーが存在しなかったことから、眼圧非依存的因子を標的とした薬剤開発は未だ成功していない。本邦の緑内障患者における約7割が正常眼圧緑内障であり、眼圧非依存的因子が示唆される症例が多く存在する。

更に、治療薬の投与経路の観点においても課題を抱えており、ドラッグデリバリーシステム（DDS）技術は局所投与による全身副作用の軽減、認知症を含めた点眼治療が困難例に対するアドヒアランス向上、点眼では困難であった網膜への十分な薬剤濃度の到達が達成され、新しい領域の創薬に繋がる。



本研究では、企業が有する薬物動態ならびに DDS などの製剤に関する知見、及びアカデミアで保有している患者の臨床データや生体サンプルの解析による患者層別化、培養細胞を用いた化合物スクリーニング系や疾患特異的な動物モデルによる薬効評価系を生かすことで効率的にかつ革新的な医薬品の開発に繋げることを目的とする。

成果及び意義：

東北大学眼科でこれまでに蓄積された眼科検査データベース（データ項目は一般的な緑内障診療の検査項目である視力、眼圧、角膜厚、ハンフリー視野、光学的眼軸長、スペクトルドメイン OCT (SD-OCT) による網膜神経線維層厚・視神経乳頭形状の測定値）に、日常診療における血圧や BMI などの検査データ、ならびに眼血流や酸化ストレス測定などの特殊検査を加えた基礎データを取得した。登録された症例を精査し、本プロジェクトにエントリー可能な症例をピックアップし解析用データセットを作成した。最終的に約 1,000 例の緑内障患者の神経栄養因子やサイトカインなどの血液由来の各種データを用いて 4 つの病態因子 (A, B, C, D) に分類した。

続いて、緑内障患者の血中の代謝物と病態因子との相関を検討するために、メタボローム解析を実施した。なお、メタボローム解析は東北大学東北メディカル・メガバンク機構で実施し、約 1,000 例の症例に対して核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance; NMR) を用いてデータを蓄積した。過去にメガバンク機構にて取得された基礎データを参照しつつ、今回得られた代謝物データに対して K-means を用いた解析では、特定の代謝物群のクラスター (代謝物クラスター 1 から 8) において、代謝物と臨床検査で得られた結果と相関する傾向が認められた (代謝物クラスター 1 と臨床検査①が相関する傾向など)。これらの結果は、臨床検査の実施が困難な場合に代謝物を測定することで病態予測ができる可能性があると考えられる。

また、ロジスティック回帰手法を用いた多変量解析では、各病態因子で病態と相関する複数の代謝物が見出され (病態因子 A: なし、病態因子 B: 3 代謝物、病態因子 C: 6 代謝物、病態因子 D: 6 代謝物)、患者を特定の病態因子別に層別化できる可能性が示唆された。今後より詳細な検討が必要であるが、今回得られた結果は緑内障患者全体の中で特異的なフェノタイプを有する層に合わせた個別化医療に繋がると考えられる。

化合物スクリーニングでは、ドラッグリポジショニングを念頭に置き、まずは複数の市販化合物ライブラリーから化合物の物性値などを指標として DDS 製剤に適すると想定される約 1,000 化合物を選抜した。続いて、各病態因子において *in vitro* 評価系で一定のクライテリアを満たしたヒットした化合物について対応する *in vivo* 動物モデルを用いて薬効を評価した。*In vitro/ in vivo* いずれの評価系についても、各病態因子を反映したモデルを構築して検討を行った。

各病態因子で化合物を評価した結果、*in vitro* マウス培養細胞評価系にて複数のヒット化合物が得られた (病態因子 A: 6 化合物、病態因子 B: 4 化合物、病態因子 C: 12 化合物、病態因子 D: 2 化合物)。また、*in vitro* ヒト由来の神経様細胞を用いた評価系においても複数のヒット化合物が得られた (病態因子 A: 2 化合物、病態因子 B: 1 化合物、病態因子 C: 3 化合物、病態因子 D: なし)。続いてマウス及びヒト由来の神経様細胞の両評価系にてヒットした化合物について、対応する各病態を反映した *in vivo* 動物モデルを用いて評価した結果、今回の条件下において *in vitro* でヒットした化合物の明確な有効性が確認されなかった。しかしながら、候補となる化合物の緑内障視神経保護作用を検討するための一連の *in vitro/ in vivo* 評価プラットフォームを構築できたことから、本検討は一定の意義があると考えられた。今後、層別化マーカー候補により分類された病態をより反映するようなモデルを用いた化合物評価が必要と考えられる。

以上、本研究により緑内障の病態分類に有用と考えられる代謝物群が見出され、層別化について一定の成果は得られたが、今後更なる検討が必要と考えられた。緑内障治療の新規の候補化合物は見出されなかったものの、薬効評価のための一連の *in vitro/ in vivo* プラットフォームが確立された。

Background:

In order to support super-aging society in Japan, it is essential to maintain vision, which is directly related to quality of life, and it is very important to control glaucoma, which has a high morbidity rate. In particular, it is very important to control glaucoma, which has a high morbidity rate. There is an urgent need to predict the progression of severe glaucoma, which causes rapid progression of visual field loss and loss of visual acuity, and to provide optimal preemptive and personalized medical care from the perspective of medical economics.

Glaucoma is an ocular disease characterized by optic nerve atrophy caused by multiple factors, including ocular blood flow, as well as high intraocular pressure, and the resulting irreversible visual field defects. Glaucoma affects 5% of people over the age of 40 and is the leading cause of blindness in Japan, and the number of patients with blindness due to glaucoma continues to increase. While recent technological advances have begun to reduce the number of patients blinded by diabetes, the number of patients blinded by glaucoma continues to increase. The only evidence-based treatment for glaucoma is IOP reduction, but there is an unmet medical need as 40% of patients continue to experience progressive visual field loss after treatment. Therefore, there is a significant social need and market for the development of new therapeutic agents other than existing IOP-lowering treatments. In addition, glaucoma is considered a multifactorial disease, and the pathophysiology may differ from individual to individual. Because of the lack of appropriate biomarkers, drug development targeting IOP-independent factors has not yet been successful. Approximately 70% of glaucoma patients in Japan have normal tension glaucoma, and there are many cases in which IOP-independent factors have been suggested.

Furthermore, the drug delivery system (DDS) technology can reduce systemic side effects by local administration, improve adherence in patients with dementia and other conditions that are difficult to treat with eye drops, and achieve sufficient drug concentration in the retina, which has been difficult to achieve with eye drops, leading to new areas of drug discovery. This will lead to drug discovery in new areas. In this research, we will utilize the company's knowledge of pharmacokinetics and formulations such as DDS, patient stratification based on analysis of clinical data and biological samples of patients held in academia, compound screening systems using cultured cells, and drug efficacy evaluation systems using disease-specific animal models to efficiently and innovatively develop new drugs. The objective of the project is to develop innovative drugs efficiently and effectively by utilizing the patient stratification system based on the analysis of clinical data and biological samples of patients, compound screening system using cultured cells, and drug efficacy evaluation system using disease-specific animal models.

Results and Significance:

The ophthalmological examination database (data items include visual acuity, intraocular pressure, corneal thickness, Humphrey's field of view, optical axial length, retinal nerve fiber layer thickness and optic nerve papilla shape measured by spectral domain OCT (SD-OCT), which are common examination items in glaucoma treatment) accumulated at the Tohoku University Ophthalmology Department to date, plus basic data from daily examinations, such as blood pressure and BMI, as well as special tests such as ocular blood flow and oxidative stress measurements. The basic data were obtained by adding laboratory data such as blood pressure and BMI, as well as special tests such as ocular blood flow and oxidative stress measurements. The registered cases were carefully examined, and those cases that could be entered into the project were selected to create a data set for analysis. Finally, various blood-derived data such as neurotrophic factors and cytokines from approximately 1,000 glaucoma patients were used to classify them into four pathological factors (A, B, C, and D).

Subsequently, metabolome analysis was conducted to examine the correlation between the pathological

factors and metabolites in the blood of glaucoma patients. The metabolome analysis was conducted at Tohoku University Tohoku Medical Megabank Organization, and data were accumulated using nuclear magnetic resonance (NMR) for approximately 1,000 cases. The K-means analysis of the metabolite data obtained this time, referring to the basic data obtained at the Megabank Organization in the past, showed a trend of correlation between metabolites and clinical test results in specific metabolite clusters (metabolite clusters 1 to 8) (Metabolite clusters 1 and clinical tests (1) correlated with each other, for example). These results suggest that measuring metabolites may be able to predict pathophysiology when clinical tests are difficult to perform.

In addition, multivariate analysis using logistic regression methods found multiple metabolites correlated with pathology in each pathological factor (pathological factor A: none, pathological factor B: 3 metabolites, pathological factor C: 6 metabolites, pathological factor D: 6 metabolites), suggesting the possibility of stratifying patients by specific pathological factors. Although more detailed studies are needed in the future, the results obtained in this study may lead to personalized medicine tailored to the segment of glaucoma patients with specific phenotypes among all glaucoma patients.

In the compound screening process, we first selected approximately 1,000 compounds from a library of commercially available compounds that were considered suitable for DDS formulations based on the physical properties of the compounds and other indicators, with drug repositioning in mind. The compounds that met certain criteria in the *in vitro* evaluation system for each pathological factor were then evaluated for efficacy using the corresponding *in vivo* animal models.

As a result of evaluating compounds with each pathological factor, several hit compounds were obtained in the *in vitro* mouse cultured cell evaluation system (pathological factor A: 6 compounds, pathological factor B: 4 compounds, pathological factor C: 12 compounds, pathological factor D: 2 compounds). Several hit compounds were also obtained in the evaluation system using *in vitro* human-derived neural-like cells (pathological factor A: 2 compounds, pathological factor B: 1 compound, pathological factor C: 3 compounds, pathological factor D: none). Subsequent evaluation of the hit compounds in both mouse- and human-derived neural-like cells using *in vivo* animal models reflecting each corresponding pathological condition showed no clear efficacy of the *in vitro* hit compounds under the current conditions. However, this study was considered to be of some significance because a series of *in vitro*/ *in vivo* evaluation platforms were established to examine the glaucomatous optic neuroprotective effects of the candidate compounds. In the future, it will be necessary to evaluate compounds using models that better reflect the pathological conditions classified by the candidate stratification markers.

In summary, this study identified a group of metabolites that may be useful in classifying the pathophysiology of glaucoma and achieved some results regarding stratification, but further studies are needed. Although no new candidate compounds for glaucoma treatment were identified, a series of *in vitro*/*in vivo* platforms for drug efficacy evaluation were established.