

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11291

研究課題名(和文) 増殖硝子体網膜症の分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Development of molecular targeted therapy for proliferative vitreoretinopathy

研究代表者

木許 賢一 (Kimoto, Kenichi)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：50315339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：非常に難治な網膜疾患の一つである増殖硝子体網膜症は今のところ手術以外に治療方法がない。補助的な治療薬の候補である抗fibronectin ED-A抗体を使用して増殖の抑制効果を調べたところ網膜色素上皮細胞からの細胞外マトリックス産生抑制効果があることがわかった。抗fibronectin ED-A抗体を硝子体手術と併用することでこの難治な疾患の視力予後が改善できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

増殖硝子体網膜症は裂孔原性網膜剥離術後の重篤な合併症であり、線維性細胞増殖が網膜上、網膜下および硝子体腔に生じ収縮で剥離網膜が牽引固定される病態である。病態形成の詳細な分子メカニズムは完全に解明されておらず現状では有効な薬物治療もない。外科的に硝子体手術でこの増殖膜を除去する以外に治療法がなく、際限なく増殖を繰り返す症例もあり、増殖を抑制する何らかの内科的な補助治療の確立が望まれている。病的な組織にしか発現のない抗fibronectin ED-A抗体がある程度の効果をもたらしたことは今後の治療薬開発に期待が持てる。

研究成果の概要(英文)：proliferative vitreoretinopathy is very severe retinal disease. there is high risk of blindness. Vitrectomy is the only method of the treatment for vitreoretinopathy. The molecular targeted therapy is long-awaited as the adjuvant. Anti-fibronectin ED-A antibody inhibited TGF-2-induced extracellular matrix production in the retinal pigment epithelial cells.

研究分野：眼科学

キーワード：増殖硝子体網膜症 TGF-2シグナル伝達 網膜色素上皮細胞 細胞外マトリックス 上皮間葉移行

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

増殖性硝子体網膜症 (proliferative vitreoretinopathy; PVR) は裂孔原性網膜剥離術後の重篤で難治な合併症であり放置すれば失明に至る。PVR は線維性細胞増殖が網膜上、網膜下、硝子体中で生じ、増殖膜の形成とその収縮によって剥離した網膜が牽引固定される病態である。有効な薬物はなく、硝子体手術による増殖膜の切除が唯一の治療法であるが、際限なく再増殖を繰り返す症例も多い。PVR の増殖膜は主に網膜色素上皮細胞で構成され、線維性コラーゲンなどの細胞外マトリックスの蓄積が観察される。PVR 症例の硝子体液中には Transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) が高濃度に存在することから TGF- β 2 が PVR 病態形成の key mediator と考えられているがその分子メカニズムの解明は不十分である。網膜裂孔の形成で眼内のバリアが破綻し、硝子体中に遊走、増殖した網膜色素上皮細胞は TGF- β 2 の刺激により上皮間葉移行をおこし、様々な細胞外マトリックスを産生するようになる。それ故、PVR のさらなる病態解明と有効な治療薬の開発のためには、網膜色素上皮細胞における病的な TGF- β 2 のシグナル伝達経路を明確にする必要がある。

2. 研究の目的

増殖性硝子体網膜症 (PVR) は未だに難治な病態である。本研究は PVR の新規治療法 (分子標的治療) を開発することを目的とする。網膜色素上皮細胞とミュラー細胞において TGF- β 2 で誘導され眼内増殖膜に特異的に発現する分子; fibronectin ED-A の産生機構を解明し、fibronectin ED-A の機能を阻害することで網膜色素上皮細胞の上皮間葉移行の抑制とミュラー細胞の細胞外マトリックス産生を抑制し、PVR の分子標的治療を開発する。その有効性と安全性を検討するため、抗 fibronectin ED-A 療法前後の網膜色素上皮細胞、ミュラー細胞および PVR モデル動物への影響を mRNA、micro RNA アレイおよびマルチプレックスアレイを用いて遺伝子発現と生理活性物質の発現を網羅的に解析する。

3. 研究の方法

【当初の計画】

初代培養ヒト網膜色素上皮細胞 (RPE) とミュラー細胞における fibronectin ED-A の発現調節機構について TGF- β 2 シグナル関連因子 (Smad, p38MAPK, Rho-kinase, PI3K, PKC- δ) の各経路の阻害剤および siRNA を用いて、プロモータ活性、mRNA 発現およびタンパク産生を指標に検討する。次に、fibronectin ED-A 阻害で TGF- β 2 で誘導される α SMA や各種細胞外マトリックスの産生抑制を示し、実験的 PVR 動物モデルでの抗 fibronectin ED-A 療法の有効性と安全性を組織化学的、電気生理学的に解析する。さらに初代培養 RPE とミュラー細胞および実験的 PVR 動物モデルにおいて、fibronectin ED-A 阻害が及ぼす mRNA、micro RNA および生理活性物質の変動をマイクロアレイで網羅的に解析し、眼内増殖病変にかかわる新たな標的分子を同定する。

しかしながら、初代培養ヒト網膜色素上皮細胞 (RPE) の生育が非常に悪かったため、ヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 を使用し、RNA シークエンスで TGF- β 2 刺激時と抗 fibronectin ED-A 抗体添加時の遺伝子発現状態を網羅的に解析した。

4. 研究成果

本研究では網膜色素上皮細胞において TGF- β 2 で誘導され、かつ眼内増殖組織に特異的に発現する分子：fibronectin ED-A に着目し新たな分子標的治療の確立に向けた実験を進めた。予備実験では抗 fibronectin ED-A 抗体は TGF- β 2 刺激で網膜色素上皮細胞から産生される I 型コラーゲンの産生を著明に抑制した。上皮間葉移行の指標となるその他の細胞外マトリックスの産生に着目し、次世代シーケンサーを使用したトランスクリプトーム解析を行ったところ、TGF- β 2 の刺激で網膜色素上皮細胞は I、III、IV、V、VII、XVI、XVIII、XX、XXV 型コラーゲンの発現上昇が見られた。ところが単一遺伝子を標的に解析した結果と異なり、抗 fibronectin ED-A 抗体による I 型コラーゲンの産生抑制は予想されたほどではなく XXV 型コラーゲンの産生を著明に抑制した（表 1）。他の細胞外マトリックス関連遺伝子では actin、fibrinogen、FGF22、IGF2 などの遺伝子発現を抑制し線維化抑制の効果があると考えられた。今回使用した網膜色素上皮細胞は fibronectin ED-A よりも ED-B の発現の方が顕著であったため（表 2）、今後は fibronectin ED-A だけでなく ED-B の抑制に関して siRNA、CRISPR-Cas9 を使用した各種の遺伝子発現抑制方法を試しより効率的な方法を模索中である。

| | TGF- β 2 | TGF- β 2+IST9 |
|-------------|----------------|---------------------|
| COL10A1 | -0.035798923 | 0.188013083 |
| COL11A1 | 0.899321848 | -0.051644378 |
| COL11A2 | 0.313438955 | -0.35189474 |
| COL12A1 | -0.231103554 | 0.059007991 |
| COL15A1 | 0.154419052 | -0.375650551 |
| COL16A1 | 3.143046717 | -0.106808087 |
| COL17A1 | 0.261790674 | 0.528977842 |
| COL18A1 | 1.315541326 | -0.065061428 |
| COL18A1-AS1 | 1.407219475 | -0.134671392 |
| COL18A1-AS2 | 1.264519627 | 0.416589826 |
| COL1A1 | 7.049844715 | -0.023231608 |
| COL20A1 | 6.038030323 | 0.670545586 |
| COL25A1 | 1.24466364 | -1.407498666 |
| COL27A1 | 0.033834308 | -0.067785247 |
| COL28A1 | -1.043705002 | 0.064608226 |
| COL3A1 | -0.373734914 | 0.564842371 |
| COL4A1 | 1.798467239 | -0.070358197 |
| COL4A2 | 1.372876101 | -0.083895674 |
| COL4A2-AS1 | 1.776625845 | -0.390256004 |
| COL4A3 | 1.566486157 | 0.021469944 |
| COL4A3BP | -0.561102344 | -0.012398369 |
| COL4A4 | 1.674064414 | 0.030383057 |
| COL4A5 | -0.256307334 | 0.016096797 |
| COL4A6 | 0.048516691 | 0.471786782 |
| COL5A1 | 2.944577176 | -0.030958612 |
| COL5A2 | -0.268244733 | -0.091960456 |
| COL6A1 | -0.304093786 | -0.084827056 |

| | | |
|--------|-------------|--------------|
| COL6A6 | -0.52140265 | -0.300213532 |
| COL7A1 | 2.278040992 | -0.029547156 |
| COL8A1 | 0.043125387 | -0.01149033 |
| COL8A2 | 0.013320448 | -0.039525608 |
| COL9A2 | 0.743406908 | -0.315614975 |

表1:TGF- β 2 刺激および IST-9 によるコラーゲン遺伝子の変動
(logFC:底は2)

| | logFC:底は 2 |
|----------------------|-------------|
| variant 8,ED-B | 7.142270249 |
| variant 10,ED-B | 10.86445225 |
| variant 11,ED-B | 8.724976837 |
| variant 3,ED-B | 0.961892415 |
| variant 7,ED-B | 2.205660539 |
| variant 6,ED-B | 0.89874918 |
| variant 5,ED-B | 0.752861065 |
| variant 4,ED-B | 0.642580434 |
| variant 1,ED-B, ED-A | 2.535780726 |

表 2 : TGF- β 2 刺激による fibronectin の各種 variant の発現変動

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 久保田 敏昭 (Kubota Toshiaki) (30205140) | 大分大学・医学部・教授 (17501) | |