

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20325

研究課題名(和文)加齢黄斑変性における網膜色素上皮のエピジェネティックな制御と正常化

研究課題名(英文)Effect of epigenetic regulation on fibrotic change in retinal pigment epithelium cells

研究代表者

畑中 宏樹 (HATANAKA, HIROKI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：80368050

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):加齢黄斑変性(AMD)では脈絡膜新生血管を伴う組織線維化が予後不良因子となっている。しかし、この線維化を標的とした治療は未だ存在しない。近年、線維性疾患の進展にepigenetic調節機構の破綻が示唆され、様々な臓器でヒストン脱アセチル(HDAC)阻害による線維化阻害効果が報告されている。我々が所持する新規HDAC阻害剤(OBP801)は、線維化のみならずCNVや瘢痕化まで抑制する可能性が網羅的遺伝子解析により示唆された。そこで、in vivoでの薬理効果を検証したところ、当該薬により線維組織形成及び、CNVの減少が認められた。この結果は、OBP801のAMD治療薬としての有効性を示唆する。

研究成果の概要(英文): Age-related macular degeneration (AMD) is the major cause of vision loss and poor visual prognosis due to the chorioretinal fibrosis. Recent studies indicated that histone deacetylase (HDAC) activity is also associated with the development and progression of some chronic diseases characterized by the accompanied fibrosis. To investigate the effects of a new HDAC inhibitor, OBP801, on RPE fibrosis and neovascularization, the integral gene expression analysis in cultured human RPE cells was performed and the reduced laser-induced choroidal neovascularization (CNV) was confirmed in murine models. OBP801 suppressed efficiently the expression of diverse genes which relating with fibrosis, CNV and tissue scarring. OBP801 did reduce the area of laser-induced fibrosis and choroidal neovascularization lesions. The findings will help developing the new treatment modalities against AMD, specifically targeting the fibrosis.

研究分野：眼科

キーワード：線維化 epigenesis HDAC CNV AMD

## 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(AMD)では、ほぼ全例で脈絡膜新生血管の発育のための土台として早期から線維性組織を生じる。多くは不可逆性変化であり、癍痕組織として残存し永続的な視力低下をきたしている。現在の主な治療法は血管新生抑制療法であり直接的な治療法が望まれている。近年、線維性疾患の進展に epigenetic な調節機構の破綻が示唆されており、様々な臓器において HDAC(histone deacetylase)阻害剤による線維化阻害効果が報告されている。しかし、既存の HDAC 阻害剤(SAHA, TSA)は、炎症組織における TGF +TNF での線維化に対しては効果が弱い。我々は、新規 HDAC 阻害剤「OBP801」がこの病態に対しても著効を示すことを見出し、線維化抑制を標的とした新規 AMD 治療薬開発を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究では、AMD の進行期病態の首座を RPE の「細胞老化-上皮間葉系移行-線維化」という「細胞の機能的相転移」として捉え、相転移制御機構の破綻を epigenetic な破綻と捉える医療概念を検証する。AMD は epigenetic な調節機構の破綻もその成因の一つであり、また AMD における線維化に関わると示唆されている。(参考文献 )。我々はこの新たな医療概念を epigenetic な制御を行う HDAC 阻害薬を用い検証した。さらに慢性炎症、マクロファージ、TGF の関連が指摘されているが(参考文献 )、より病態に即した TGF +TNF による RPE における線維性変化の上乗せ効果も確認する。以上よりこれまでの研究結果の発展的上乗せとして、RPE を取り巻く病的環境(TGF +TNF )による線維化への影響を強力な新規 HDAC 阻害薬である OBP-801 を用い、線維化抑制効果ならびに相転移制御機構のメカニズムの解明を目指す。

## 3. 研究の方法

<細胞培養、OBP-801 添加、観察>

・ヒト網膜色素上皮細胞株は ARPE-19 (ATCC CRL-2302 (登録商標) (P19)を購入した。培養は DMEM/F12 (Invitrogen: 11330-032)に 10% FBS を添加した培地を用い、手順書通りに培養した。実験は継代数 P23~26 で行なった。初代ヒト網膜色素上皮細胞は H-RPE (00194987 LONZA) (P2)を購入し手順書通りに培養し、継代数 P3~5 で使用した。

・薬剤処理

OBP-801 は株式会社オンコリスバイオファーマ社から供与された。

OBP-801 を DMSO(Dimethyl sulfoxide)で 10  $\mu$ M の濃度に溶解しストック溶液として使用し、培地を用いて希釈し、投与群に投与するための医薬組成物を調製した。

80~90% confluent 時に FBS 抜きの培地に交換し OBP-801(0~1 nM)を添加した。

24 時間後に TGF (20 ng/ml)TNF (10 ng/ml) を添加し 48 時間曝露した。生細胞は位相差顕微鏡にて観察した。

<免疫染色>

細胞を Cold Methanol (-30 ) 中で 15 min 固定し、風乾した。ブロッキングは 1% ウシアルブミン溶液中で室温、約 30~60 分程反応を行なった。一次抗体は、4 で一晩反応させた。二次抗体は室温 で 60 分間反応行なった。5  $\mu$ g/ml DAPI を用いて室温 15 分で核染色を行った。観察は蛍光顕微鏡にて行った。

<ウエスタンブロッティング>

タンパク抽出試薬 (SDS-HBS ; 1%SDS, 150 mM NaCl in 10 mM Hepes (pH. 7.4)で細胞を溶解した。3 min 間沸騰し、5 min (15 sec-10 sec pause)の Sonication により溶解を促進した。タンパク定量には BCA kit (Thermo #23235) を用いた。SDS-page 電気泳動 (30 $\mu$ g/lane [iBlot 4-12% Bis-Tris Plus Gell])を行い、PVDF メンブレンに転写[iBlot

PVDF トランスファースタックレギュラー]した。ブロッキング及び抗体反応 [iBind Western System]を行なった後、ECL 化学発光 [NOVEX ECL CHEMI SUBSTRATE]させ、検出を行った[LAS3000 (Fuji film)]。

<HDAC 活性測定、HAT 活性測定>

核抽出はEpiQuik Nuclear Extraction Kit I (Epigenetic #0P-0002)を用いて行なった。

HDAC 活 性 測 定 は EpiQuik HDAC Activity/Inhibition Direct Assay Kit (Epigenetic #P-4034)を用いて、プレートにコートしてあるアセチル化ヒストン基質と、サンプルとを反応させた後、脱アセチル化されなかった基質を抗アセチル化ヒストン抗体で検出した。HAT 活性測定は EpiQuik HAT Activity/Inhibition Direct Assay Kit (Epigenetic #P-4003)を用いて、プレートにコートしてある脱アセチル化基質と、サンプルとを反応させた後、アセチル化された基質を抗アセチル化抗体で検出した。

<PCR アレイ>

RNA 抽出は RNeasy mini kit (QIAGEN #74104)を用いた。逆転写反応は RT2 First Strand Kit (QIAGEN #330401)を用いて行ない、PCR 反応は RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX qPCR Mastermix (QIAGEN #330522)を用い、RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Fibrosis(QIAGEN #PAHS-120ZC)を用いて行なった。

<レーザー照射 CNV 誘導マウスウサギモデル、OBP-801 投与、観察>

マウスの麻酔はケタラル 9 mg/ml + セラクタール 1mg/ml を 0.15ml i.p.により行なった。散瞳はミドリン P 点眼液を一滴点眼した。添加の約 5 分後に処置可能となった状態のマウス眼球へ乾燥しないよう PBS を適時点眼しレーザー照射を行なった。レーザー照射はスコピゾールを点眼し、カバーガラスを装着した状態で、以下の条件で行なった。照射：Red, 200mW, 100ms, 50 μm 片眼のみに、乳頭から離れた部位に、3, 6, 9, 12 時方向へ

照射を行なった。

・OBP-801 投薬は以下の手順で行った。注射溶液、Control (1ml PBS+1 μl DMSO)及び実験群(1ml PBS+1 μl 10 μM OBP-801)を用意した。硝子体注射は、まず 22.5°スリットナイフを用い、毛様体付近の強膜を切開(切開幅は 30G 針の直径程度)した。切開創に 32G をベベルアップで挿入し、刺入した針が少し視認できた位置で網膜に達しない位置で注入した。

< Isolectin B4 染色 >

安楽死させたマウスから、眼球を摘出し、4%PFA/PBS 中、室温で 1 時間ほど静置、固定し、前眼部を除去した後、4 箇所切れ込みを入れ放射状に開き、強膜を切除し、網膜 flatmount を作製した。 -20 メタノールを用いて 10 min 間固定した後、4%PFA/PBS (室温 10min)で PBS 洗浄後、ブロッキング(1% fetal calf serum, 0.1% Triton X-100 in PBS RT, 1h 振盪)を行なった。Alx594-conjugated isolectin B4(1:100) (Invitrogen #I21413) で 4 一晩振盪して染色した。その後、4%PFA/PBS を用いて室温で 10 min 間固定した。DAPI 入り封入剤(VECTASHELD)により処理した後、蛍光顕微鏡にて観察、撮影を行なった。

< 脈絡膜 Flat-mount >

安楽死させたマウスから、眼球を摘出し、1%PFA/PBS 中、室温で 2 時間ほど静置、固定し、前眼部、水晶体を除去した後、4 箇所切れ込みを入れ放射状に開き、網膜を除去し、脈絡膜 flatmount を作製した。脈絡膜 flatmount を以下の手順で免疫染色した。サンプル組織を PBS 緩衝液中で室温 30 min 間振盪し洗浄した。その後、5% BSA/PBS 溶液中、室温で 1 時間振盪しブロッキングを行った。その後、一次抗体を 4 一晩振盪しながら反応させた。0.1% TX100/PBS による洗浄を 3 回行なった後、二次抗体を室温で 1 時間反応させ、一次抗体時と同様に洗浄を行った。

その後、封入 (VECTASHELD with DAPI) し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察、撮影した。

#### 4. 研究成果

##### (1) OBP-801 による線維化関連遺伝子抑制効果

OBP801 の薬理特性を解明するため、RPE 細胞を用い線維化誘導への影響を検証した。

培養 RPE 細胞 (ARPE19, H-RPE) を TGF 単独、TNF 単独、又は TGF +TNF 処理により筋線維化を誘導し、OBP801 および SAHA による線維化関連遺伝子の発現変化を調べた。その結果、TGF +TNF で相乗効果の見られた MMP9,

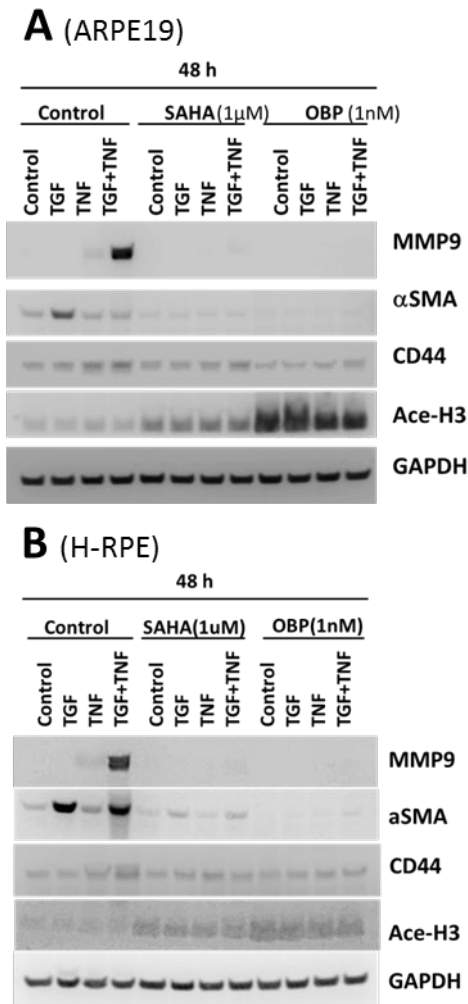


図1 OBP801による線維化関連遺伝子の発現抑制効果

CD44, 及び筋線維化タンパクである SMA の発現が OBP801 又は SAHA による処理で抑制されることが確認された。また、OBP801 の処理

濃度は SAHA より 1/1000 の低濃度 (OBP801: 1nM, SAHA 1 $\mu$ M) で、SAHA よりも高い抑制効果を示すことが判明した (図1)。

##### (2) HDAC 阻害活性との関係性

次に、RPE 細胞の線維化におけるヒストンアセチル化の影響の検証を行った。

ARPE19 を用い TGF 単独、TNF 単独、又は TGF +TNF 処理による線維化誘導、さらに OBP-801 処理・未処理群において HDAC 活性および HAT 活性を測定した。

その結果、線維化誘導により、HDAC 活性に変化は見られなかった。また、OBP801 は線維化誘導の有無にかかわらず、同程度に HDAC 活性を阻害した。したがって、OBP-801 による線維化抑制効果は、必ずしも HDAC 阻害活性のみに依存するものではないことが示唆された (図2) 一方、HAT 活性は、線維化誘導に因り減少が見られた。しかし、線維化誘

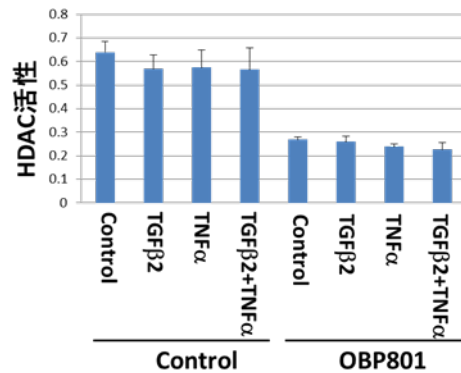


図2 HDAC活性

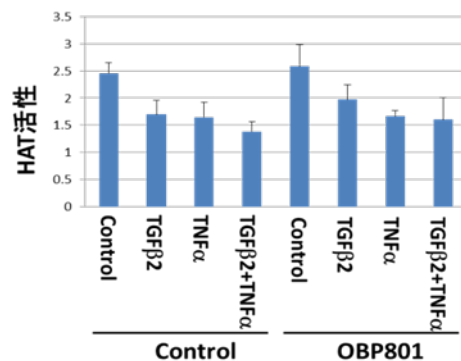


図3 HAT活性

導の有無に関わらず、OBP-801 は HAT 活性に影響を及ぼさなかった。したがって、OBP-801 による線維化効果は、必ずしも HDAC 阻害活性のみに依存するものではないことが示唆

された(図3)。

### (3) OBP-801 投与による CNV 抑制効果

in vivo における OBP-801 の薬理効果を確認するために、我々はレーザー誘致 CNV モデルマウスを用い実験を行った。

マウス眼球にレーザーを照射して 35 日後、脈絡膜側の網膜に新生血管(CNV)を認めた(図4、Cont1, 2)。一方、レーザー照射直後に 1  $\mu$ l/1eye 10nM OBP-801 を投与したマウス眼球では、脈絡膜側網膜の CNV 形成が認められず、OBP-801 による CNV の抑制効果が確認された(図4、OBP1, 2)。

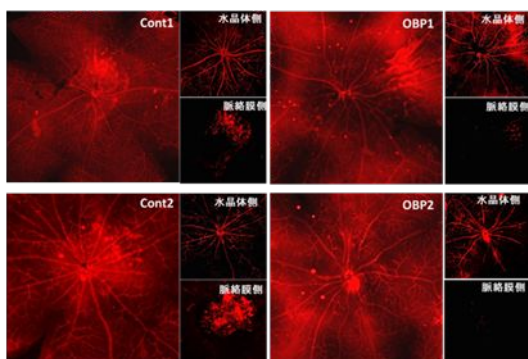


図4 レーザー誘致CNVモデルマウスにおけるOBP801の影響

### (4) OBP-801 投与による線維化組織形成阻害効果

さらに、レーザー照射後の線維化組織形成における OBP-801 の影響を検証した。まず、レーザー照射後、7、14、21日後、に脈絡膜における線維化組織形成を aSMA 免疫染色により検出した。その結果、レーザー照射後 14 日目に最も線維化組織が形成されていることが判明した(data not shown)。そこで、レーザー照射後に OBP801 を CNV 抑制実験と同様に投与し、14 日目に線維化組織の検出を行った。Control マウス脈絡膜では全てのレーザー照射部周辺に collagen I、aSMA、CD31 の強いシグナルが見られ、線維化組織が形成されていることが確認できた。また、CD31 が陽性であることから、CNV が起きていることも確認できた(図5、Cont1,2,3)。一方、

OBP-801 投与マウス脈絡膜のレーザー照射部周辺では collagen I、aSMA、CD31 シグナルが未投与群に比べ、いずれも低下しており(図5、OBP1,2,3) 線維化及び、CNV が抑制されていることが確認できた。

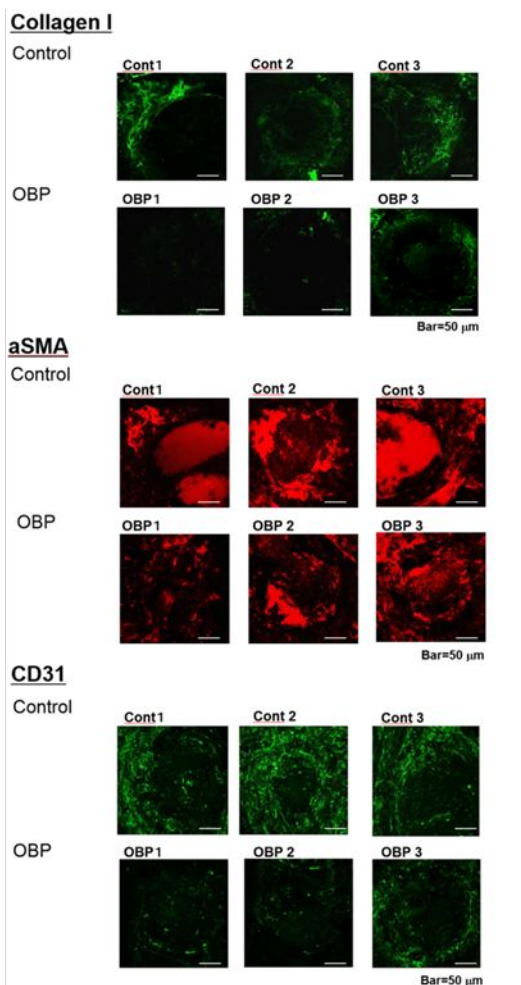


図5 CNVモデルマウスにおけるOBP801の線維組織形成への影響

この in vivo における線維化および CNV 抑制効果の実証により OBP801 の AMD 治療薬としての開発が大きく前進したと言える。

#### <参考文献>

- Eye (Lond). 2014 Dec; 28(12): 1407-1417.
- The role of epigenetics in age-related macular degeneration
- M Gemenetzi1 and A J Lotery
- Adv Exp Med Biol. 2014;801:199-205.

The role of monocytes and macrophages in age-related macular degeneration.

Grunin M1, Hagbi-Levi S, Chowers I

Eye (Lond). 1990;4 ( Pt 4):613-21.

Macrophages related to Bruch's membrane in age-related macular degeneration.

Killingsworth MC, Sarks JP, Sarks SH.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2件)

畑中宏樹

網膜色素上皮の線維性変化に対するエピジェネティックな調整機構の影響. 第120回日本眼科学会総会、2016.04.07. 仙台国際センター(宮城県、仙台市)

Hiroki Hatanaka

Effect of Epigenetic Regulation on Fibrotic Change in Retinal Pigment Epithelium Cells. ARV02016. 2016.05.05. シアトル(アメリカ)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

畑中 宏樹 (HATANAKA, Hiroki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号: 80368050

(2)分担研究者

向 敦史 (MUKAI, Atsushi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号: 00419152

上野 盛夫 (UENO, Morio)

京都府立医科大学, 医学(系)研究科(研究院), 助教

研究者番号: 40426531

羽室 淳爾 (HAMURO, Junji)

京都府立医科大学, 医学(系)研究科(研究院), 教授

研究者番号: 80536095

(3)研究協力者

米田 一仁 (YONEDA, Kazuhito)

京都府立医科大学, 医学(系)研究科(研究院), 助教

研究者番号: 00347460

山岸 哲哉 (Yamagishi, Tetsuya)

京都府立医科大学, 医学部附属病院, 助教

研究者番号: 40733572