

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11451

研究課題名(和文) レチノイン酸受容体リガンドを介した網膜下癒痕形成抑制機構の解明

研究課題名(英文) The inhibition of subretinal fibrosis by specific retinoic receptor ligands

研究代表者

木村 和博 (KIMURA, Kazuhiro)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60335255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：RPEにおける上皮間葉系移行(EMT)にレチノイン酸を介する制御機構が関与している。RAR- $\alpha$  アゴニスト(Am580)とRAR- $\beta$  アゴニスト(parovalotene)を用いることで、EMTを模倣しているRPEによるコラーゲンゲル収縮を濃度、時間依存性に抑制した。さらにEMTマーカーである $\alpha$ -SMA、FN及びMMPs発現を抑制した。これらの化合物は、接着斑構成分子のパキシリンの発現を低下させた。マウス網膜下癒痕形成モデルにこれら化合物を硝子体内投与することで、線維化を抑制した。一方で、マウスレーザー誘導の脈絡膜新生血管モデルにおいて、両化合物は新生血管形成を抑制できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性(AMD)の長期的な視力障害に網膜下線維性癒痕形成が寄与している。本研究にてRAR $\alpha$  アゴニストが網膜下線維性癒痕形成、収縮を抑制することが明らかになった。本研究で同定されたシグナル伝達経路や化合物が未だ中途失明原因の上位である加齢黄斑変性の視力予後改善への新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。本研究は、AMDに加え線維性増殖組織形成を伴う他の難治性網膜硝子体疾患の網膜障害を防ぎ、視機能の維持に大きく貢献する可能性もあり、その臨床的意義は非常に重要である。

研究成果の概要(英文)：The retinoid signal pathway is related to the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of retinal pigment epithelial cells (RPE). Both RAR- $\alpha$  agonist (Am580) and RAR- $\beta$  agonist (parovalotene) inhibited RPE mediated collagen gel contraction in a concentration or time-dependent manner. These compounds also suppressed the expression of EMT related markers proteins including  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), fibronectin (FN) and Metalloproteinases (MMPs) Further, the expression of focal adhesion protein paxillin was attenuated in RPE treated with these compounds. Finally, we examined the effects of these compounds on the development of CNV and subretinal fibrosis in a mouse model that mimics these pathological processes in patients with neovascular age related macular degeneration (nAMD). Am580 and parovalotene had no significant effect on the development of CNV, but suppressed the development of subretinal fibrosis in model mouse induced by laser photocoagulation.

研究分野：眼科学

キーワード：滲出型加齢黄斑変性 レチノイン酸 網膜下線維性癒痕

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は本邦の中途失明原因の上位にあり、抗 VEGF 剤により予後は改善されてきた。重症例や再発例などでは依然視力予後が芳しくない。最近の報告では、網膜下に形成される線維性瘢痕が視力予後に多大な影響を及ぼすことが明らかになった。つまり滲出型加齢黄斑変性は、現行治療にて疾患原因となる網脈絡膜新生血管の退縮を誘導できたとしても、網膜下に形成された線維性瘢痕組織により、網膜組織構造が破綻し視細胞が不可逆的な障害を受けると視機能改善は難しくなることを示唆する。形成された網膜下線維性瘢痕による網膜組織構造破壊による視機能低下を防ぐには、如何にして網膜下線維性瘢痕形成を抑制するかがとても重要であり、線維性瘢痕形成阻害を標的とした特異的な治療法の開発が必要である。

組織における線維化では、炎症、外傷、感染などにより組織が一旦障害を受けると、種々の因子が活性化され分泌、発現が亢進する。中でも、成長因子の TGF- $\beta$  が中心的な役割を果たし、それぞれの臓器・組織に特異的に常在する細胞や浸潤してきた炎症細胞に作用を及ぼす。結果として、これらの細胞は、 $\alpha$ -平滑筋型アクチン( $\alpha$ -SMA)の発現、I 型コラーゲン(CollI)、フィブロネクチン(FN)などの細胞外基質の異常な分泌・発現などを特徴とする線維芽細胞様の筋線維芽細胞へと分化し、最終的には線維化へとたどり着く。我々は眼組織において角膜実質細胞や結膜下線維芽細胞がその反応性を变化させてコラーゲンなどの細胞外基質の分解・合成異常をきたし、角結膜瘢痕形成、収縮に関与することを明らかにしてきた。一方で、上皮細胞が TGF- $\beta$  に反応し、上皮細胞としての特徴を变化させ、筋線維芽細胞への変化する現象を上皮-間葉系移行(EMT)という。網膜下線維性瘢痕組織の組織学的検討では、EMT を起こした網膜色素上皮細胞(RPE)、線維芽細胞、筋線維芽細胞およびマクロファージなどの細胞群とコラーゲンを中心とした細胞外基質を認める。これらのことから網膜下線維性瘢痕組織による網膜障害を抑えるには、常在細胞の RPE の EMT を効率よく抑制するとともに細胞外基質のリモデリングの制御が重要である。

### 2. 研究の目的

滲出型加齢黄斑変性における網膜下線維性瘢痕形成、収縮の分子メカニズムの解明を行い、それに対する新規治療薬の開発を目的として研究を遂行する。レチノイン酸の特異的な受容体(RARs:RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、RAR $\gamma$ )に対する特異的なリガンドを用いて網膜色素上皮細胞(RPE)の上皮-間葉系移行(EMT)の抑制に関する因子を同定し、その抑制性シグナル経路を特定する。細胞外基質のリモデリングや EMT の分化を促進する細胞外からの out-in signal に対する作用も検討する。さらにマウス網膜下瘢痕形成モデルを用いて RARs リガンドの網膜下線維性瘢痕形成への作用を検討する。最終的に網膜下瘢痕形成を抑制できるリード化合物を同定し、より特異性の高い化合物の合成を行い、臨床応用を目指す。

### 3. 研究の方法

(1)レチノイン酸の特異的な受容体(RARs)に対するリガンドによる RPE の 3次元培養系における EMT 抑制因子の検索

RPE におけるコラーゲン収縮抑制に寄与するレチノイン酸の特異的な受容体 RARs およびそのリガンドを同定する。さらに、特異性の高い受容体の RPE での局在やリン酸化などについて検討する。TGF- $\beta$  2 によるゲル収縮は RPE における EMT によるので、EMT マーカーである  $\alpha$ -SMA、フィブロネクチン及び I 型コラーゲンなどの発現への影響を検討する。RPE の EMT、RPE によるゲル収縮を抑制する効果が強い RARs リガンド処理によって得られる培養上清、細胞抽出液を用いて、マルチプレックス、抗体アレイを用いてサイトカイン、成長因子などの複数の蛋白質成分のスクリーニングを行う。さらに核内受容体を介した転写レベルでの分子発現への影響が考えられるので、培養細胞から mRNA、miRNA を抽出し、DNA マイクロアレイ、PCR アレイにて関連分子や特定の生物学的プロセスに関連した遺伝子群のプロファイリングを同時に行う。

(2)レチノイン酸の特異的な受容体(RARs)に対する RARs リガンドによる RPE からの MMPs 抑制・活性化因子の検索

EMT にも関与する細胞外基質のフィブロネクチン、I 型コラーゲン等を基質とするマトリックスメタロプロテアーゼ MMPs の RPE からの分泌活性化、あるいは発現抑制に対する RARs リガンドの作用を検討する。さらに、培養 RPE を用いて免疫染色を行い、TGF- $\beta$  2 刺激に対するフィブロネクチン(FN)、I 型コラーゲンなどの細胞外基質の発現、沈着に対する RARs リガンド作用を検討する。

(3)RARs リガンドによる RPE におけるコラーゲン収縮、EMT、MMPs 発現異常への抑制機序の検討

TGF- $\beta$  2 によるコラーゲン収縮、EMT 誘導、MMPs 発現異常最も抑制効果の強い RARs リガンドについて、抑制に関与するシグナル伝達経路を検討する。抑制効果の強い RARs リガンドと添加した RPE の培養上清あるいは細胞抽出液を用いて、MAPKs 経路、TGF- $\beta$  /Smad 経路、PI3-キナーゼ経路、JAK/STAT 経路、NF- $\kappa$ B 経路、ubiquitin-proteasome 経路、Wnt/Beta-catenin 経路を始めとした細胞の高次機能に重要であるシグナル伝達経路を種々のシグナル伝達関連抗体を用いてウエスタンブロット法、バイオプレックスにて検討する。

#### (4)不死化した RPE を用いた $\alpha$ -SMA・MMPs レポーターアッセイ系の確立と調節因子の同定

$\alpha$ -SMA・コラゲナーゼである MMP-1、8、13、18 の転写領域を含む各レポーター遺伝子を作成し、不死化した RPE 細胞にて恒常的に発現する stable cell line を作成する。TGF- $\beta$ 2 刺激にて発色を確認できる cell line を用いて、(1)、(2)で同定した最も作用の強い RAR $\alpha$  リガンドの発色抑制作用を検討する。結果として、FACS にて発色抑制細胞を取り分けて、次世代シーケンサーで RNA シークエンスを解析し、細胞内で発現しているトランスクリプトームの定量的解析を行う。遺伝子発現解析のみならず、選択的なスプライシングや新規トランスクリプトの発見などの解析をさらに行う。

#### (5)網膜下癬痕モデルマウスを用いた同定因子の in vivo 作用の検討

網膜下線維癬痕モデルマウスを用いて、TGF- $\beta$ 2 によるコラーゲン収縮、EMT 誘導、MMPs 発現異常に対して最も抑制効果の強い RAR $\alpha$  リガンドによる癬痕形成への作用を検討する。具体的には、線維化マーカーとして I 型コラーゲン、グリオシスマーカーとして GFAP を指標としてフラットマウント法により免疫組織学的に検討する。さらに、同定された抑制効果の強い RAR $\alpha$  リガンドにより、影響をうけるシグナル伝達経路を標的とした阻害剤(化合物、siRNA、阻害抗体など)や活性化剤などについても、この網膜下線維癬痕モデルを用いてその効果を検討する。

#### (6)EMT 抑制作用の強い RAR $\alpha$ リガンド-受容体複合体の解析

TGF- $\beta$ 2 による RPE の EMT 抑制効果の強い RAR $\alpha$  リガンドについて、BioID システムを用いて RAR 受容体に a promiscuous prokaryotic biotin protein ligase (BirA)を融合させた発現ベクターを作成する。この BirA が強いものから弱い結合まで網羅的にビオチン化できる作用を活用し、リガンド刺激後にストレプトアビジンビーズを用いてたんぱく質複合体を生成し、マススペクトロメトリーで解析する。さらに、同定された分子に関して EMT における機能を検討するため、その活性化体や刺激薬、あるいは siRNA、中和抗体などを用いてその分子の発現亢進、抑制を行い RPE における同定された分子の働きを検討する。

### 4. 研究成果

RPE における上皮間葉系移行 (EMT) にレチノイン酸を介する制御機構が関与している。RAR-アゴニスト (Am580) と RAR- $\alpha$  アゴニスト (parovalotene) を用いることで、EMT を模倣している RPE によるコラーゲンゲル収縮を濃度、時間依存性に抑制した。さらに EMT マーカーである  $\alpha$ -SMA、FN 及び MMPs 発現を抑制した。これらの化合物は、接着斑構成分子のパキシリンの発現を低下させた。マウス網膜下癬痕形成モデルにこれら化合物を硝子体内投与することで、線維化を抑制した。一方で、マウスレーザー誘導の脈絡膜新生血管モデルにおいて、両化合物は新生血管形成を抑制できなかった。

(英語)

The retinoid signal pathway is related to the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of retinal pigment epithelial cells (RPE). Both RAR-agonist (Am580) and RAR- $\alpha$  agonist (parovalotene) inhibited RPE mediated collagen gel contraction in a concentration or time-dependent manner. These compounds also suppressed the expression of EMT related markers proteins including  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), fibronectin (FN) and Metalloproteinases (MMPs) Further, the expression of focal adhesion protein paxillin was attenuated in RPE treated with these compounds. Finally, we examined the effects of these compounds on the development of CNV and subretinal fibrosis in a mouse model that mimics these pathological processes in patients with neovascular age related macular degeneration (nAMD). Am580 and parovalotene had no significant effect on the development of CNV, but suppressed the development of subretinal fibrosis in model mouse induced by laser photocoagulation.

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性 (AMD) の長期的な視力障害に網膜下線維性癬痕形成が寄与している。本研究にて RAR $\alpha$  アゴニストが網膜下線維性癬痕形成、収縮を抑制することが明らかになった。本研究で同定されたシグナル伝達経路や化合物が未だ中途失明原因の上位である加齢黄斑変性の視力予後改善への新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。本研究は、AMD に加え線維性増殖組織形成を伴う他の難治性網膜硝子体疾患の網膜障害を防ぎ、視機能の維持に大きく貢献する可能性もあり、その臨床的意義は非常に重要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yoshimoto T, Yamada N, Higashijima F, Teranishi S, Kimura K	4. 巻 19
2. 論文標題 Simultaneous Vitreoretinal Surgery and Penetrating Keratoplasty Without a Keratoprosthesis or Endoscopy for Vitreoretinal Disease Associated with Corneal Opacity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Rep Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 127-136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000506589	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hori A, Nishide K, Yasukuni Y, Haga K, Kakuta W, Ishikawa Y, Hayes MJ, Ohnuma SI, Kiyonari H, Kimura K, Kondo T, Sasai N	4. 巻 9
2. 論文標題 Prominin-1 Modulates Rho/ROCK-Mediated Membrane Morphology and Calcium-Dependent Intracellular Chloride Flux	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 15911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52040-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tokuda K, Baron B, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Tokuda N, Morishige N, Kobayashi M, Kimura K, Nakamura K, Sonoda KH	4. 巻 62
2. 論文標題 Optimization of fixative solution for retinal morphology: a comparison with Davidson's fixative and other fixation solutions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 481-490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-018-0592-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takeda A, Yamada H, Hasegawa E, Arima M, Notomi S, Myojin S, Yoshimura T, Hisatomi T, Enaida H, Yanai R, Kimura K, Ishibashi T, Sonoda KH	4. 巻 62
2. 論文標題 Crucial role of P2X7 receptor for effector T cell activation in experimental autoimmune uveitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 398-406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-018-0587-4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato K, Takeda A, Hasegawa E, Jo YJ, Arima M, Oshima Y, Yanai R, Nakazawa T, Yuzawa M, Nakashizuka H, Shimada H, Kimura K, Ishibashi T, Sonoa KH	4. 巻 41
2. 論文標題 Interleukin-6 plays a crucial role in the development of subretinal fibrosis in a mouse model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 IMMEd	6. 最初と最後の頁 23-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09114300.2018.1451609	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura K, Orita T, Kobayashi Y, Matsuyama S, Fujimoto K, Yamauchi K	4. 巻 61
2. 論文標題 Concentration of acute phase factors in vitreous fluid in diabetic macular edema	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 479-483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-017-0525-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura K, Zhou H, Orita T, Kobayashi M, Nishida T, Sonoda KH	4. 巻 58
2. 論文標題 Suppression by an RAR- Agonist of Collagen Degradation Mediated by Corneal Fibroblasts	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci	6. 最初と最後の頁 2250-2257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.15-18701	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 波多野 誠, 緒方 惟彦, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 Nintedanibによる網膜色素上皮細胞からの血管内皮増殖因子産生の抑制
3. 学会等名 第58回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村 和博
2. 発表標題 同時手術はシンプルに!?
3. 学会等名 第73回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志村雅彦, 内海卓也, 北野滋彦, 福嶋はるみ, 村松大弐, 高村佳弘, 松本牧子, 築城英子, 森實祐基, 厚東隆志, 園祥三, 石川裕人, 五味文, 香留崇, 三田村佳典, 木村和博, 木下貴正, 杉本昌彦, 近藤 峰生, 引地泰一, 鷺尾紀章, 佐藤智人, 竹内大, 辻中大生, 緒方奈保子, 楠原仙太郎, 坂本泰二
2. 発表標題 実臨床における糖尿病黄斑浮腫治療の実態：介入治療開始年度比較
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 和博
2. 発表標題 Signature PROの効率性
3. 学会等名 第71回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2017年

〔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	山田 直之  (YAMADA Naoyuki)  (70437630)	山口大学・大学院医学系研究科・講師    (15501)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	寺西 慎一郎  (TERANISHI Shinichiro)  (90649360)	山口大学・医学部附属病院・助教     (15501)	