

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19729

研究課題名(和文)線維柱帯細胞の可塑性に基づいた新治療開発に関する研究

研究課題名(英文) Study on development of new therapeutic methods based on plasticity of trabecular meshwork cells

研究代表者

谷原 秀信 (TANIHARA, Hidenobu)

熊本大学・病院・病院長

研究者番号：60217148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：線維柱帯細胞の上皮間葉転換(EMT)様変化が緑内障病態の一因であるという新たな仮説の元、細胞の可塑性に基づく新規治療法開発に向けた取り組みとして本研究を行った。TGF- $\beta$ 2刺激により線維柱帯細胞は細胞外マトリクス産生亢進、F-actin増加、 $\alpha$ -SMA発現亢進等のEMT様変化を示した。HDAC阻害剤ボリノスタットはこれらのEMT様変化を有意に抑制し、Ex vivoの組織培養灌流実験においても、TGF- $\beta$ 2刺激による房水流出抵抗の増加を有意に抑制した。このように、HDAC阻害剤であるボリノスタットはEMT誘導因子であるTGF- $\beta$ 2刺激による房水流出抵抗の上昇を抑制することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線維柱帯細胞のEMT様変化が房水流出抵抗亢進を引き起こすことが基礎実験レベルではあるが示すことができ、EMTをターゲットとした創薬につながる成果と考えられる。今回評価に使用したHDAC阻害剤はEMT様変化を抑制することで房水流出改善効果が認められており、安全性等の詳細な評価は必要であるが新規眼圧下降剤のターゲットとなりえると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have established a new hypothesis that epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like changes in trabecular meshwork cells contribute to glaucoma pathology. The purpose of this study was development of new therapeutic methods based on the plasticity of cells. Trabecular meshwork cells showed EMT-like changes such as extracellular matrix production enhancement, F-actin increase and  $\alpha$ -SMA expression enhancement upon TGF- $\beta$ 2 stimulation. The HDAC inhibitor vorinostat significantly suppressed these EMT-like changes. Furthermore, vorinostat significantly suppressed the increase of aqueous humor outflow resistance induced by TGF- $\beta$ 2 stimulation in perfusion experiments. Thus, the HDAC inhibitor vorinostat was shown to suppress the increase in aqueous humor outflow resistance induced by TGF- $\beta$ 2.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 線維柱帯細胞 EMT

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

緑内障は本邦における中途失明原因1位の疾患で、40歳以上の有病率は5%であり、そのうち原発開放隅角緑内障(広義)が大部分を占める。原発開放隅角緑内障の発症および症状の進行は、単一因子ではなく、遺伝、環境因子など多因子が関与するが、眼圧は症状の進行における最も重要な因子であり、現在、眼圧下降が唯一、確たるエビデンスのある治療である。開放隅角緑内障患者の線維柱帯では、線維柱帯の癒合と線維柱帯間隙の狭小化、線維柱帯における細胞外マトリクスの蓄積と組成変化、線維柱帯細胞密度の減少と機能異常といった病的変化が生じており、これらが房水流出抵抗の上昇に関連するとされているが、その病態は未だ不明な点が多い。我々は、かねてより房水流出の制御機構について解析を進めており、また、上皮間葉転換(EMT)についても解析を行ってきた。この過程から、近年、新たに、線維柱帯細胞が、線維化の過程で上皮細胞にみられるEMTに類似した、EMT様現象をきたすことを見出した。EMT様現象は細胞外マトリクスの沈着や組織の収縮、弛緩に関連しており、この現象は緑内障における線維柱帯の機能低下を説明する新たな視点であると考え、EMT様現象の制御およびEMTを逆転させる間葉-上皮転換(MET)現象の誘導が新たな緑内障治療戦略となりうると思えるに至った。

### 2. 研究の目的

我々は線維柱帯細胞におけるEMT様現象の存在が、房水流出路の過剰な線維化や線維柱帯細胞の機能異常の基盤となって、眼圧下降薬物治療に対する反応性が低下することを誘導するという全く新しい視点による仮説を提唱した。組織発生や急性炎症ではEMTは可逆的であり、間葉系細胞が上皮系細胞へと誘導される逆転現象、間葉上皮転換(MET)が生じることが知られている。そこで、我々は、線維柱帯細胞におけるEMT現象もMETを誘導することにより病的な線維柱帯の機能回復と房水流出路の再建を誘導することで、眼圧調節のホメオスタシスを再獲得させるという従来の緑内障治療にはない、新たな治療概念を提唱することを考えた。そこで、本研究では、EMT様現象を誘導した線維柱帯細胞のMET誘導の可否と、そのメカニズムを明らかにする。さらに、MET誘導を治療概念に応用して、流出路異常におけるEMTに関連するシグナル経路を標的とした、新たな治療薬の開発を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 線維柱帯細胞培養に対するEMT様現象の誘導とHDAC阻害剤の効果の検討

サル眼球より線維柱帯組織をピンセットにて採取し、コラーゲンゲル上に接着させ培養を行った。組織片より細胞が増殖したところで継代を行い、継代後は細胞培養ディッシュで培養を行った。また、一部の実験はヒト線維柱帯細胞(ScienCell社)を使用し実施した。サル線維柱帯細胞に対するEMT様変化の誘導はTGF- $\beta$ 2刺激により行った。TGF- $\beta$ 2刺激後の線維柱帯細胞の細胞外マトリクスや平滑筋アクチン( $\alpha$ -SMA)等の発現変化をウエスタンブロッティングおよび免疫染色により評価した。In vitroで房水流出への影響を予測するため、トランズウェルチャンバーを用いた電気抵抗測定により細胞層の流出抵抗を評価した。HDAC阻害剤であるボリノスタットを用いて、TGF- $\beta$ 2刺激による線維柱帯細胞へのEMT様変化に対する抑制効果について検討を行った。

#### (2) ブタ眼球組織培養灌流系を用いた房水流出量に対する効果の検討

Ex vivoの実験系としてブタ眼球を用いた組織培養灌流系を用いてTGF- $\beta$ 2刺激による流出抵抗変化およびボリノスタットの効果について検討を行った。ブタ眼球を前眼部のみに切り分け、水晶体、虹彩、毛様体を取り除き専用のチャンバーへセットする。チャンバーをCO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で組織培養を行い、チャンバー内へ一定速度(3  $\mu$ L/分)で培養液を灌流し、眼球内の圧力をモニターした。24時間以上安定させた後、TGF- $\beta$ 2およびボリノスタットを含んだ培養液を灌流し72時間圧力をモニターした。眼球内の圧力変化から房水流出率を算出し比較した。

### 4. 研究成果

(1) TGF- $\beta$ 2刺激後のサル線維柱帯細胞を用いたウエスタンブロットにより細胞外マトリクスタンパクであるファイブロネクチン、コラーゲンタイプIの発現が有意に増加していることが示された。また、免疫染色によりF-actinの増加、 $\alpha$ -SMA陽性細胞の増加が認められた。これらの結果は、コラーゲン等の細胞外マトリクス刺激により認められたEMT様変化と同様であった。トランズウェルチャンバーを用いた検討において、電気抵抗値はTGF- $\beta$ 2刺激により有意に増加した。TGF- $\beta$ 2刺激により線維柱帯細胞の増殖も認められ、電気抵抗値の増加はTGF- $\beta$ 2刺激による細胞増殖及び細胞外マトリクスタンパクの産生亢進による影響と考えられた。HDAC阻害剤であるボリノスタットは線維柱帯細胞へのTGF- $\beta$ 2刺激時に同時添加することで、TGF- $\beta$ 2によるコラーゲンタイプIの発現亢進を有意に抑制した。ファイibroネクチンに対して発現抑制傾向は認められたが統計学的な有意差は認められなかった。ヒト線維柱帯細胞を用いた検討においてはTGF- $\beta$ 2に対する $\alpha$ -SMA発現増加がより顕著に検出され、ボリノスタットは有意に $\alpha$ -SMAの発現亢進を抑制した。

(2) ブタ摘出眼球を使用した組織培養灌流系による房水流出の影響について検討を行った。TGF- $\beta$ 2を灌流すると灌流開始直後より房水流出は減少し、灌流開始から72時間後ではコントロールに比べ有意な房水流出率の低下が認められた。一方、ボリノスタットをTGF- $\beta$ 2と同時に

灌流した眼球においては TGF- $\beta$  2 単独で認められた房水流出の低下は認められず、その効果は TGF- $\beta$  2 単独と比べて有意であった。この結果は、線維柱帯細胞で認められた流出抵抗への影響をよく反映した結果であった。

(3) 線維柱帯細胞の TGF- $\beta$  2 刺激による影響の一部を、HDAC 阻害剤であるポリノスタットが抑制し、房水流出抵抗増加を改善することが判った。我々はさらに、その作用メカニズムを明らかにするため TGF- $\beta$  2 刺激により活性化される細胞内シグナルについて検討を行った。Smad 経路の活性化については、ウエスタンブロッティングによる Smad2/3 のリン酸化、免疫染色による Smad2/3 の核内移行ともにポリノスタット添加では抑制されなかった。それに対して non-Smad 経路のうち Akt および Erk のリン酸化はポリノスタットにより有意に抑制されていることをウエスタンブロッティングにより確認した。

本研究により、TGF- $\beta$  2 により誘導される EMT 様変化に対して HDAC 阻害剤は抑制効果を示した。本研究では EMT 誘導後の HDAC 阻害剤添加まで実施できなかったため、MET の誘導の可能性は検討できなかった。HDAC 阻害剤の TGF- $\beta$  2 誘発流出抵抗亢進に対する抑制効果が認められたため、眼圧下降剤のターゲットとしての可能性を示す結果が得られたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Inoue-Mochita Miyuki, Inoue Toshihiro, Kojima Sachi, Futakuchi Akiko, Fujimoto Tomokazu, Sato-Ohira Saori, Tsutsumi Utako, Tanihara Hidenobu | 4. 巻<br>293                 |
| 2. 論文標題<br>Interleukin-6 mediated trans-signaling inhibits transforming growth factor- signaling in trabecular meshwork cells                          | 5. 発行年<br>2018年             |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biological Chemistry  | 6. 最初と最後の頁<br>10975 ~ 10984 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1074/jbc.RA118.003298  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                   |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Fujimoto Tomokazu, Inoue Toshihiro, Ohira Saori, Awai-Kasaoka Nanako, Kameda Takanori, Inoue-Mochita Miyuki, Tanihara Hidenobu   | 4. 巻<br>2017         |
| 2. 論文標題<br>Inhibition of Rho Kinase Induces Antioxidative Molecules and Suppresses Reactive Oxidative Species in Trabecular Meshwork Cells | 5. 発行年<br>2017年      |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Ophthalmology   | 6. 最初と最後の頁<br>1 ~ 23 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1155/2017/7598140  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsumura Riyo, Inoue Toshihiro, Matsumura Akira, Tanihara Hidenobu   | 4. 巻<br>37              |
| 2. 論文標題<br>Efficacy of Ripasudil as a Second-line Medication in Addition to a Prostaglandin Analog in Patients with Exfoliation Glaucoma: A Pilot Study | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>Clinical Drug Investigation   | 6. 最初と最後の頁<br>535 ~ 539 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s40261-017-0509-0  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>藤本智和、井上俊洋、谷原秀信                            |
| 2. 発表標題<br>TGF- 2誘発房水流出抵抗増加に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の作用の検討 |
| 3. 学会等名<br>第30回日本緑内障学会                               |
| 4. 発表年<br>2019年                                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>藤本智和、井上俊洋、谷原秀信  |
| 2. 発表標題<br>線維柱帯細胞におけるTGF- $\beta$ 2刺激に対するヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤の作用の検討 |
| 3. 学会等名<br>第29回日本緑内障学会   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

| 6. 研究組織                   |                       |    |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|                           |                       |    |