

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09994

研究課題名（和文）Wnt/ β -catenin経路を標的とした増殖硝子体網膜症の治療法の開発研究課題名（英文）Inhibition of Wnt/ β -catenin to treat 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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：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。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し失明に至る症例も多い。細胞内シグナル伝達経路であるWnt/ β -catenin経路の阻害剤であるICG-001を細胞に転化することでこの病態の悪循環を断ち切る可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

増殖性硝子体網膜症という裂孔原性網膜剥離術後の重篤で難治な合併症は非常に難治で有効な薬物が未だ存在しない。Wnt/ β -catenin経路の阻害剤であるICG-001という化合物がこの病態に非常に有効である研究結果が得られ、本疾患の病態形成のメカニズムがさらに解明された。失明を回避できるだけでなくより良い網膜剥離術後の視機能を多くの患者さんが得ることができる。

研究成果の概要（英文）：Proliferative vitreoretinopathy (PVR) is a serious and intractable complication following rhegmatogenous retinal detachment that can lead to blindness if left untreated. There is no effective drug, and vitrectomy is the only treatment, but many patients suffer from endless re-growth of the proliferative membrane, leading to blindness. The inversion of ICG-001, an inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway, an intracellular signaling pathway, into the cells breaks the vicious cycle of this condition, ICG-001, an inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway, into the cells, thereby breaking the vicious cycle of this pathology.

研究分野：網膜硝子体外科

キーワード：増殖硝子体網膜症 網膜色素上皮細胞 TGF- β Wnt/ β -catenin経路 細胞外マトリックス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

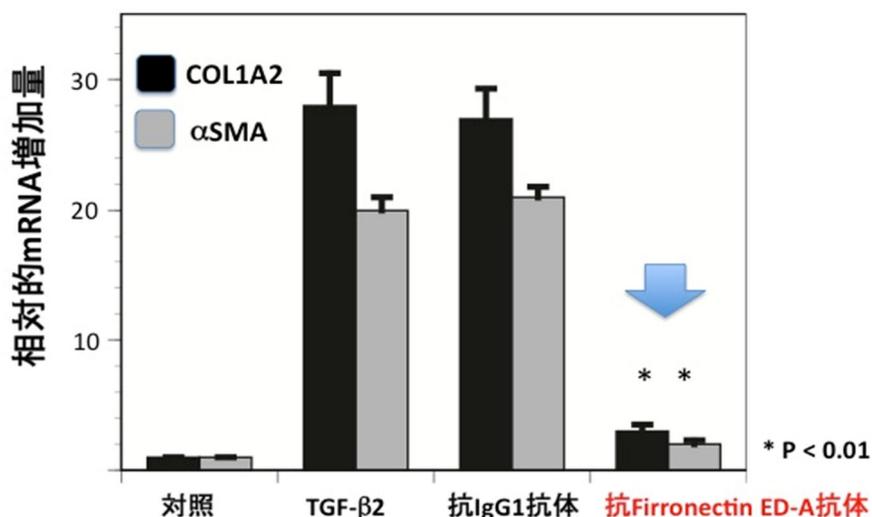
増殖性硝子体網膜症 (proliferative vitreoretinopathy; PVR) は裂孔原性網膜剥離術後の重篤で難治な合併症であり放置すれば失明に至る。PVR は線維性細胞増殖が網膜上、網膜下、硝子体中で生じ、増殖膜の形成とその収縮によって剥離した網膜が牽引固定される病態である。有効な薬物はなく、硝子体手術による増殖膜の切除が唯一の治療法であるが、際限なく再増殖を繰り返し失明に至る症例も多い。

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の解明に加え、すでに線維化をきたした組織を改善させる戦略が必要とされる。我々は、TGF- β 2 が網膜色素上皮細胞における I 型コラーゲンの発現を濃度依存的に増加し、その細胞内シグナル伝達経路には主要な Smad 経路だけでなく、p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK)、Rho-kinase および Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) も関与し、これらの伝達経路を阻害することで I 型コラーゲンの発現が抑制されることを初めて報告してきたが、これらの分子は生理的にも重要な機構であるため薬剤として使用するためには副作用の点から不適格である。

そこで、fibronectin ED-A が病的な増殖組織にのみ発現する分子であることに着目し、抗 fibronectin ED-A 抗体が網膜色素上皮細胞において TGF- β 2 で誘導される上皮間葉移行の指標： α SMA や I 型コラーゲンの発現が抑制できることを見出した (図 1)。

一方で、ICG-001 は、Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路において CBP と β -catenin の結合を阻害し、線維結合組織の改善作用を示すことが肝硬変などの臓器線維化を来す病変で示されている。



2. 研究の目的

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 で誘導され眼内病的増殖膜に特異的に発現する分子；fibronectin ED-A 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からの細胞外マトリックス産生を抑制し、さらに既に蓄積された病的増殖膜に対しては CBP/ β -catenin 阻害剤で病的結合組織の改善を図る全く新しい 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 療法及び CBP/ β -catenin 阻害剤投与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、トランスクリプトーム解析、リン酸化プロテオーム解析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

初代培養ヒト網膜色素上皮細胞 (RPE)とミュラー細胞 (MIO-M1) を TGF- β 2 で刺激し、TGF- β 2 シグナル伝達因子(Smad, p38MAPK, Rho-kinase, PI3K, PKC- δ)のどの経路が関与するかを各分子の阻害剤および siRNA を用いて、fibronectin ED-A のプロモータ活性、mRNA 発現およびタンパク産生を指標に検討する。また、fibronectin ED-A の転写活性因子を同定する。次に、抗 fibronectin ED-A 抗体、fibronectin ED-A siRNA および CBP/ β -catenin 阻害剤の添加で TGF- β 2 で誘導される α SMA や各種細胞外マトリックスの発現が抑制できることを示す。

- (1) TGF- β 2 刺激による fibronectin ED-A 発現の確認と転写活性因子の同定
- (2) fibronectin ED-A 発現調節における TGF- β 2 シグナル関連因子の役割の解明
- (3) TGF- β 2 / Smad 経路に対する fibronectin ED-A 阻害の影響の解析
- (4) fibronectin ED-A 阻害および CBP/ β -catenin 阻害剤による線維化抑制

4. 研究成果

眼内線維増殖性疾患の薬物治療法の開発は喫緊の課題である。TGF- β 2 による網膜色素上皮細胞の病的線維性コラーゲンの発現調節やその他の細胞外マトリックスのシグナル伝達や転写調節を解明し治療法を確立する研究は少なく、CBP/ β -catenin 阻害剤を使用して既に線維化を来した眼内線維増殖性疾患を改善させることができるかを目的とした。

当初予定していた初代培養ヒト網膜色素上皮細胞の培養状態が不安定なため、ARPE-19 細胞株を使用した。通常培養群と TGF- β 2 刺激群および Wnt/ β -catenin 阻害剤である ICG-001 を前処理した TGF- β 2 刺激群の各 3 群の RNA シークエンスを行い各群の遺伝子発現の差異を網羅的に解析した。細胞外マトリックスの主成分である各種コラーゲン遺伝子に着目すると TGF- β 2 刺激群では I、IV、V、VII、XVI、XVIII、XX、XXV 型コラーゲンの発現が有意に上昇し、ICG-001 はこの内 V、XVIII、XX 型コラーゲンの発現上昇を抑制した（表 1）。次に fibronectin のバリエーションを発見すると正常では発現のない variant 1、3、8、10、11 が TGF- β 2 刺激で発現するが、ICG-001 はこの全てを有意に抑制した（表 2）。一方、細胞外マトリックスの分解に関与する MMP 分子を見ると TGF- β 2 刺激群で上昇した MMP2、MMP3、MMP11 の発現上昇を ICG-001 は有意に抑制した。興味深いことに組織の線維化に深く関与するペリオスチンの発現上昇が ICG-001 で著明に抑制されており、Wnt/ β -catenin 阻害剤 ICG-001 は PVR の補助治療に非常に有効な可能性がある。

次に、高深度 DIA リン酸化プロテオーム解析を行なったところ、TGF- β 2 刺激で上昇する stathmin, Myosin regulatory light chain などの細胞骨格の調節に關与するタンパク質のリン酸化が Wnt/ β -catenin 阻害剤で著明に抑制された。TGF- β 2 刺激による網膜色素上皮細胞の細胞外マトリックスの発現調節はコラーゲンが Smad, p38MAPK 経路、fibronectin、MMP やペリオスチンはほぼ Wnt/ β -catenin 経路を介して調節されている。Wnt/ β -catenin 阻害剤は PVR の補助治療に非常に有効な可能性がある。

TGF- β 2刺激で発現増加する コラーゲン遺伝子	TGF- β 2+ICG-001
I型	
IV型	
V型	↓
VIII型	↓
XVI型	
XVII型	
XX型	↓
XXV型	

表1 ICG-001はV型、VIII型、XX型コラーゲン遺伝子の発現を抑制する

TGF- β 2刺激で発現増加する fibronectin variant	ICG-001による抑制
variant1	↓
variant3	↓
variant8	↓
variant10	↓
variant11	↓

表2 ICG-001はfibronectin variant遺伝子の発現を抑制する

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・特任教授 (17501)	
研究分担者	赤嶺 孝祐 (Akamine Kosuke) (60799435)	大分大学・医学部・助教 (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関