様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　４ 月 ２５ 日現在

機関番号：２４３０３
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ０９８３１

研究課題名（和文）エピジェネティック制御機構による血管新生・瘢痕形成AMD病態の抑制

研究課題名（英文）Inhibition of angiogenesis and scarring at AMD pathology by epigenetic regulation

研究代表者
平本　菜央（Hiramoto, Nao）

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：１０６０９０９３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：加齢性黄斑変性症(AMD)病態モデルである網膜色素上皮細胞(RPE)とマクロファージの共培養やRPEの線維化誘導により、多くの血管形成促進因子産生が増強された。これらの因子の多くはOBP801(OBP)により産生が抑制された。これよりOBPはAMDにおいてRPE変性を抑え、間接的に血管新生を抑制することが示唆された。一方で血管内皮細胞培養系を用いた実験では、OBPが血管内皮細胞に直接作用して細胞の増殖、遊走、管腔形成を阻害し、さらに一部の血管形成促進因子誘導管腔形成に対して、OBPは抗VEGF剤よりも強い抑制効果を示した。これらはOBPが既存薬剤を超える新規AMD治療薬となる可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義
加齢黄斑変性(AMD)は近年著しく増加中の重篤な視力障碍を引き起こす疾患である。現在主流の治療法である抗VEGF治療はCNV抑制にはある程度効果を示すが、抵抗性患者の存在や視力予後因子である網膜組織の線維化には効果がない等、いくつかの問題点がある。本課題ではOBPが直接および間接的に血管形成を阻害することを明らかにした。一方、我々の以前の研究では、OBPがRPEの線維性変化に対し抑制効果を持つことが確認されている。これらのOBPの作用効果の検証結果を以って、線維性組織形成阻害効果およびCNV抑制効果を併せ持つ、今までにない強力かつ斬新なAMD治療薬の開発が大きく前進すると言える。

研究成果の概要（英文）：Co-culture of retinal pigment epithelial cells (RPE) and macrophages (Mps), a pathological model of age-related macular degeneration (AMD), and induction of fibrosis in RPE have been shown to enhance the production of many pro-angiogenic factors. Production of many of these factors was suppressed by OBP801 (OBP). This suggests the possibility that OBP suppresses degeneration of RPE and indirectly suppresses angiogenesis in AMD. On the other hand, experiments using a vascular endothelial cell culture system revealed that OBP acts directly on vascular endothelial cells and inhibits cell proliferation, migration, and tube formation. Furthermore, OBP exhibited a stronger inhibitory effect than existing anti-VEGF agents on tube formation induced by some pro-angiogenic factors. Based on these results, we believe that OBP can become a new treatment for AMD that surpasses existing drugs.

研究分野：応用細胞分子生物学

キーワード：加齢性黄斑変性症　網膜色素上皮細胞　エピジェネティック制御　脈絡膜新生血管

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

加齢黄斑変性症 (AMD) は加齢や酸化ストレスなどの環境因子により黄斑部の網膜色素上皮細胞 (RPE) が変性し、脈絡血管新生 (CNV) を起こす疾患である。日本では、高齢化と生活の欧米化により近年著しく増加 (10 年で 7 倍以上) し、高齢者の重篤な視力障害疾患の 1 つとなっている。現在主流の治療法は CNV の抑制を目的とした抗 VEGF 治療である。本抗 VEGF 療法には様々な問題点が存在する。①治療抵抗性の無反応症例や、投薬途中に効果がなくなる耐性症例が多くの割合で出現すること、②本療法では視機能の改善効果は必ずしも十分には期待できないこと、③長期複数回投与が不可欠で、感染症や副作用 (眼圧上昇、視力低下、眼痛、網膜出血) の危険性があること、④医療費が高額で患者の経済的負担が大きいこと、などである。これら多くの問題点から抗 VEGF 療法に代わる新規の AMD 治療法が臨床現場から強く求められている。

２．研究の目的

現在主流の AMD 治療薬である抗 VEGF 薬の問題点の１つである抵抗性の原因は線維性組織であることが指摘されている (Diego ら, 2013)。さらに、この線維性組織は血管除去後にも残存し視力予後不良の原因にもなっている。また、血管誘導因子には VEGF だけでなく、他の多くの血管新生因子 (PIGF, FGF, PDGF 等) や血管新生抑制因子 (PEDF 等) も関与しており、これらに関しては抗 VEGF 薬単独での効果は期待できない。申請者は上述の核心をなす問＝Unmet Needs に応えるべく、エピジェネティック制御機構による RPE 組織の恒常性維持：血管新生・瘢痕形成 AMD 病態の抑制と言う、京府医大グループで 5 年来独自に進め蓄積してきた AMD 分子病態についての斬新な概念に則した研究展開を進める。申請者らの保持する新規 Epigenetics 制御物質「OBP」は、「OBP-801 の眼組織の線維化抑制剤」として特許出願している (特許出願番号：2018-127738)。本提案課題では、OBP の CNV 抑制における作用特性と薬剤特性を詳らかにする。作用点としては、①血管前駆細胞に対する直接的作用、②血管形成を誘導する RPE への作用、③脈絡膜浸潤 Mps や Mps/RPE 相互作用など細胞社会学的動態への作用が想定される。

３．研究の方法

＜細胞培養＞

ヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC P1 #C-12200) とヒト冠状動脈内皮細胞 (HCAEC P1 #C-12221) は PromoCell から購入した。HUVEC の培養は PromoCell の推奨培地 Endothelial Cell Growth Medium Kit2 (ECGM2 #C-22011) を用い、手順書通りに行った。HCAEC の培養は PromoCell の推奨培地 Endothelial Cell Growth Medium MV2 kit (ECGMMV2 #C-22121) を用い、手順書通りに行った。どちらの血管内皮細胞も P4 で凍結保存細胞を作成し、これを起眠し実験に用いた。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。培養は手順書通りに行い、継代数 P23～26 で実験に使用した。iPS 細胞由来 RPE (iPS-RPE) (P2) は株式会社ヘリオスから供与された。培養は手順書通りに行い、継代数 P4～6 で実験に使用した。THP-1 (RBRC-RCB1189 Lot 025) は理研 BRC より購入した。培養は手順書通りに行い、継代数 P10～15 で実験に使用した。マクロファージへの分化は Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA : final 100 nM) 48 時間処理で行った。いずれの細胞も 37°C 5% CO_2 の環境で培養した。

＜試薬＞

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。VEGF-A165, basic-FGF は WAKO から購入した。PDGF-bb, TGF-β2, TNF-αは R&D から、EGF は Invitrogen から購入した。VEGF 阻害剤はアフリベルセプト (IVT 40 mg/ml アイリーア) を使用した。

＜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。定量には BCA kit (Thermo #23235) を用いた。SDS-PAGE 電気泳動 (30 μg/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)) 。

＜プロテインアッセイ＞

Human Angiogenesis Array Kit (R&D#ARY007) を手順書通りに使用し、培養上清中の血管形成関連タンパクの網羅的解析を行った。得られたシグナルは Image J (NIH) で数値化した。

＜細胞増殖、細胞毒性アッセイ＞

細胞増殖と毒性試験は Viability/Cytotoxicity Multiplex assay kit (Dojindo#CK17) を用いて

測定した。細胞増殖は $2x10^3$ cells/well を 96 well plate に播種し 24 時間培養させた後、サプリメント抜きの培地に交換し、被検試薬を加え培養した。48 時間後に CCK-8 溶液を 1/10 量添加し、37°C 5% CO_2 環境下で 4 時間反応させた後、450 nm で吸光度をプレートリーダーで測定した。細胞毒性は LDH assay で計測した。$1.25x10^4$ cells/well を 96 well plate に播種し 37°C 5% CO_2 環境下で 24 時間培養した。その後、サプリメント抜きの培地に交換し、各 well に被検薬剤を添加し 48 時間培養後、手順書に従い測定した。

＜細胞遊走アッセイ＞
Wound-healing assay で評価した。12-well plate に細胞を約 90% confluent になるまで培養する。サプリメント抜きの培地に交換し、被検試薬を加え 37°C 5% CO_2 環境下で 24 時間培養後、well の中央部の細胞を 10 µl ピペットチップの先端で直線状に細胞を削り剥がした。その後、新しい培地 (被検試薬入り、サプリメント抜き) に交換し、37°C 5% CO_2 環境下で 24 時間培養し、掻き傷部に侵入してきた細胞数を計測した。

＜管腔形成アッセイ＞
HUVEC を 12-well plate に細胞を約 90% confluent になるまで培養後、サプリメントおよび FBS 抜きの飢餓培地に交換し、被検試薬を加え 24 時間培養した。その後、Growth Factor-reduced Matrigel (Invitrogen) でコートした 96-well plate に $2x10^4$ cells/well で被検試薬を加えた飢餓培地で播種し、37°C 5% CO_2 で培養した。16 時間後に位相差顕微鏡で観察し撮影した。得られた画像データは、Imge J の Angiogenesis Analyzer (NIH) を使用し数値化した。

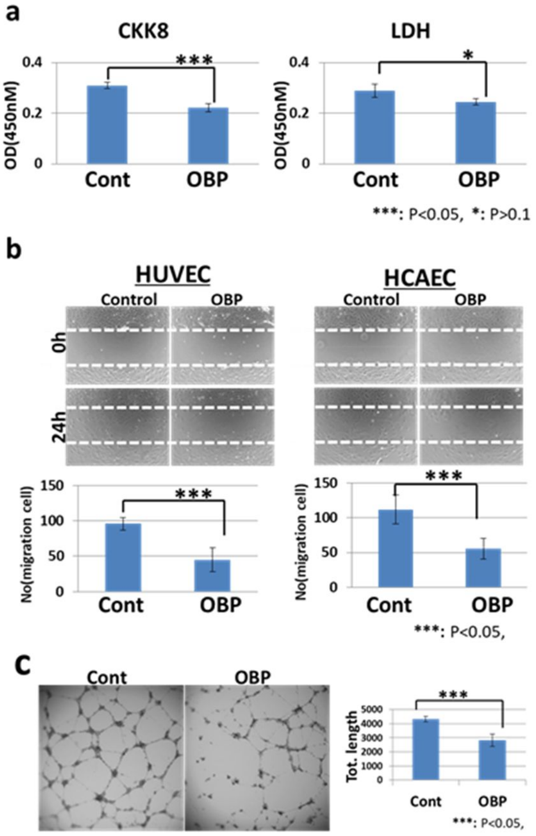
＜統計分析＞
データは、3 回以上測定の平均±SD として表した。 統計分析は、スチューデント t 検定を使用した。 サンプルは、P <0.05 で有意に異なると見なした。

４．研究成果

OBP は 1.0 nM で血管前駆細胞の増殖､遊走､管腔形成を阻害する

OBP の血管前駆細胞に対する直接的作用の検証を行った。低密度 ($2x10^3$ cells/well (96-well plate))で播種した HUVEC に 1 nM OBP を作用させ 72 時間後に WST (CKK8) 試験と LDH 試験を行った。OBP 処置により LDH の値に差は見られなかった。一方 CCK8 の値は OBP により優位に減少が見られた (図 1-a)。このことから、1 nM OBP は毒性ではない作用で細胞増殖を阻害していることが示唆された。また、Wound-healing assay では、スクラッチ 24 時間前からの OBP 処置により傷部へ侵入する細胞数の減少が見られ、OBP の migration 阻害効果が示唆された。この阻害効果は HUVEC だけでなく HCAEC でも見られた (図 1-b)。管腔形成に対する効果の検証は、薬剤効果を明瞭にするため FBS 抜きの培地を用い、マトリゲルも Growth factor 制限の GFR-Matrigel を使用した。その結果、1 nM OBP で管腔の形成が阻害されている像が観察できた。また、形成された管腔長を数値化し比較したところ、OBP による管腔長の減少は有意差であることが示された (図 1-c)。これらの結果から OBP は血管前駆細胞に直接作用し血管形成を阻害することが示唆された。

図1

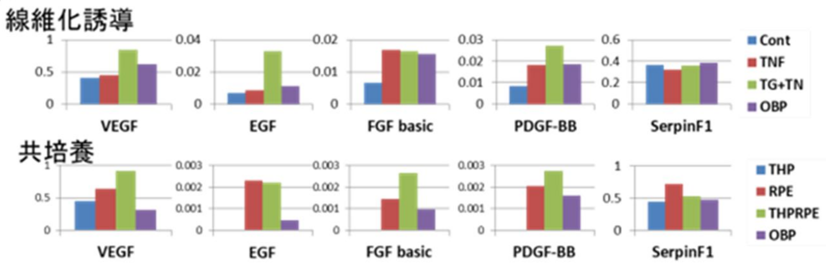


In vitro AMD 病態モデルにおいて血管形成促進因子の発現が増強する

AMD 病態では RPE 層下での線維性組織の形成がみられ､予後不良への関与が指摘されている。申請者らは TGF-β と TNF-α を RPE 細胞に暴露する AMD 病態モデルを用い、線維性組織の形成が epigenetic な調節機構の破綻にあることを見出した (Hatanaka et al., 2021 BBRC)。また、AMD 病態では単一細胞での動態よりも複数のヘテロな細胞が共存する局所環境の細胞社会学的動態を考慮すべきという観点から、RPE とマクロファージの共培養系を確立さた。本モデルにより AMD の病態増悪回路における Exosome の関与を実証した (Mukai et.al., 2021 EER)。これら 2 つの *in vitro* AMD 病態モデルを用い、血管形成に関与するタンパクの発現と

OBP の影響検証を網羅的に行った。その結果、TGF-β+TNF-α の暴露や共培養により、多くの血管形成促進因子の発現が増強されることが判明した。またそれらの多くは、OBP により発現が抑制された。図 2 には、代表的な血管形成促進因子である VEGF, EGF, bFGF, PDGF の結果を抜粋した。一方、血管形成に抑制的に働く SerpinF1 (PEDF) については OBP による影響はみられなかった。こちらも図 2 に示す。これらの結果から、AMD 病態における変性した RPE は血管形成を促進することが示された。また、この RPE による血管形成促進効果に対し、OBP は抑制的に働くことが示唆された。

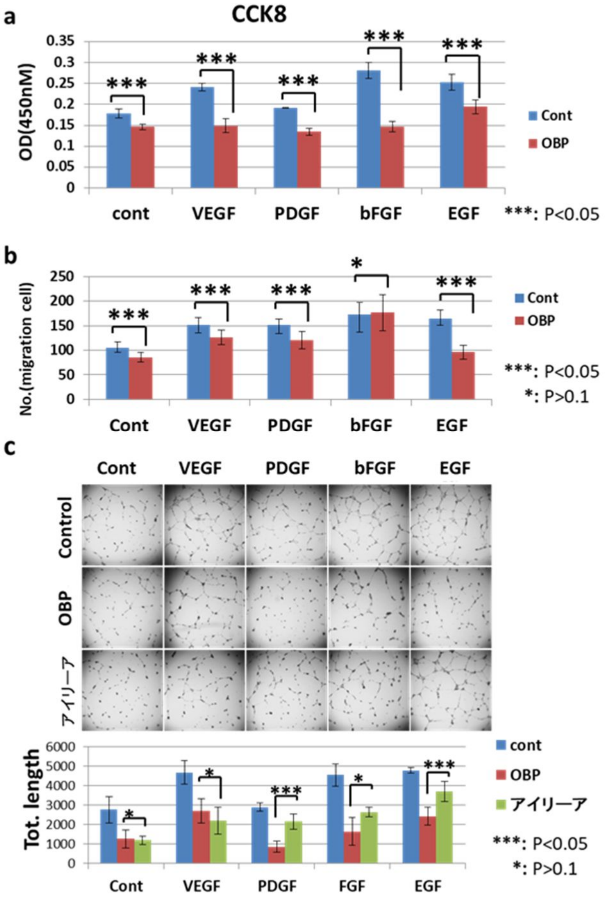
図2



OBP は血管形成促進因子で促進された増殖、遊走、管腔形成も阻害する

AMD 病態では、血管前駆細胞は RPE 由来の様々な血管形成促進因子に暴露されていることが示唆された。そこで、これらの因子で促進された血管形成に対する OBP の阻害効果を検証した。低密度で播種した HUVEC に OBP (1nM) と各促進因子 (10 ng/ml VEGF, 10 ng/ml PDGFbb, 10 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF) を作用させ、72 時間後に WST (CKK8) 試験を行った。その結果、これらの因子による増殖促進効果が確認できた。また、これらすべての増殖促進効果に対して、OBP は有意に抑制効果を示した (図 3-a)。細胞遊走検証では、スクラッチと同時の各因子の添加によって、全ての因子における遊走促進効果が確認された。この促進効果に対しては、スクラッチ前 24 時間からの 1 nM OBP 処理により bFGF 以外で阻害効果が確認できた (図 3-b)。管腔形成効果検証では、OBP の管腔形成阻害効果を既存の抗 VEGF 剤 (アイリーア) と比較した。管腔形成誘導前 24 時間から 1 nM OBP (0.5 ng/ml) またはアイリーア(400 ng/ml)と各促進因子(20 ng/ml VEGF, 50 ng/ml PDGFbb, 50 ng/ml bFGF, 50 ng/ml EGF) を添加した飢餓培地に交換し、さらに同培養条件下でマトリゲル上へ播種し 16 時間後に位相差顕微鏡 20 倍で撮影した。その結果、いずれの促進因子においても管腔形成の促進が確認できた。OBP、アイリーア処置によって全ての管腔形成において阻害効果が見られたが、PDGFbb、EGF においては OBP による阻害効果がアイリーアのそれよりも有意に上回った。この結果は、臨床において抗 VEGF 剤による治療効果の低い耐性患者等に対しても OBP は高い薬効を示す可能性が示唆された。

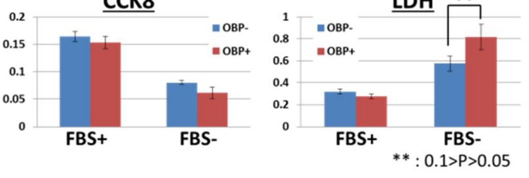
図3



OBP (1nM) は FBS 無しの条件下では毒性を示す

図 1 で示した LDH 試験は細胞増殖条件での検証であり、2% FBS 含有条件で行い、1 nM OBP の無毒性を確認した。Wound-healing assay でも 2% FBS 含有条件であるが、管腔形成能の検証は、FBS 含有条件では促進因子の影響が不明瞭になる為、0% FBS の飢餓条件で行った。この飢餓条件下での OBP の毒性を検証した。その結果 0% FBS 条件下での OBP 処理により LDH の値が有意傾向で増加が見られた (図 4)。この結果から、OBP による管

図4

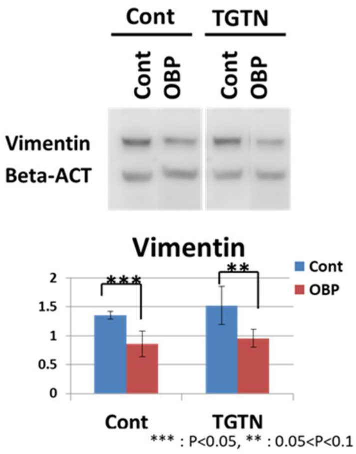


腔形成阻害効果の作用機序に血管前駆細胞に対する細胞毒性が関与している可能性が示唆された。

血管内皮の EndMT は OBP により阻害される

AMD 病態の中でも失明に直結する Subretinal Fibrosis に血管内皮細胞の内皮間葉系移行 (EndMT: endothelial-to-mesenchymal transition) の関与が指摘されている。そこで、HUVEC に TGF-βと TNF-αを処置して EndMT の誘導を試み、OBP による EndMT 阻害効果を検証した。その結果、EndMT マーカーである Vimentin の発現が 1 nM OBP により阻害されることが判明した (図 5)。このことから、OBP は血管内皮細胞の EndMT 化を抑え、Subretinal Fibrosis をも抑制する可能性が示唆された。

図5



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名	４．巻
Mukai Atsushi、Otsuki Yohei、Ito Eiko、Fujita Tomoko、Ueno Morio、Maeda Tadao、Kinoshita Shigeru、Sotozono Chie、Hamuro Junji	208
２．論文標題 Mitochondrial miRNA494-3p in extracellular vesicles participates in cellular interplay of iPS-Derived human retinal pigment epithelium with macrophages	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Experimental Eye Research	６．最初と最後の頁 108621～108621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2021.108621	査読の有無 有
オープンアクセス 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 －

１．著者名	４．巻
Hatanaka Hiroki、Mukai Atsushi、Ito Eiko、Ueno Morio、Sotozono Chie、Kinoshita Shigeru、Hamuro Junji	544
２．論文標題 Epigenetic regulation of the epithelial mesenchymal transition induced by synergistic action of TNF-α and TGF-β in retinal pigment epithelial cells	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	６．最初と最後の頁 31～37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.01.060	査読の有無 無
オープンアクセス 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 －

〔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	向　敦史 (Mukai Atsushi) (00419152)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・研究員 (24303)	削除：2022年10月27日

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