

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18383

研究課題名(和文) RPE細胞のEMTにおける新規ベンゾイルフェニルウレア化合物の作用機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of benzoylphenylurea compounds in EMT of RPE cells

研究代表者

小林 正明 (Kobayashi, Masaaki)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70845015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：滲出型加齢黄斑変性(nAMD)における網膜下線維症および脈絡膜血管新生(CNV)に対して、ベンゾイルフェニルウレア(BPU17)が有する効果を検討した。C57BL/6Jマウスに網膜光凝固を施行して網膜下線維化を誘導した動物モデルにおいて、BPU17の硝子体注射は網膜下線維症を抑制した。同様に、C57BL/6Jマウスに網膜光凝固を施行してCNVを誘導した動物モデルにおいても、BPU17はCNV増生を抑制した。いずれのモデルにおいてもBPU17は濃度依存的に抑制傾向を示したことから、BPU17がnAMD病変を抑制する可能性が示唆された。今後はBPU17の有効濃度を同定し再現性を検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

滲出型加齢黄斑変性(nAMD)に対する治療方法の第一選択は抗血管内皮増殖因子(VEGF)薬であるが、nAMD晩期の網膜下線維症には治療効果を持たない。抗VEGF薬が有効な症例であっても、治療効果を維持するために反復して長期に投与することで、網膜萎縮等の障害を生じる。BPU17はnAMDに対して抗VEGF薬とは異なる薬理機序で作用すると考えられる。本研究の結果から、BPU17がnAMDによる脈絡膜新生血管および網膜下線維症に抑制的に作用する可能性が示され、新規のnAMD治療標的として期待された。今後はBPU17の分子機序を解明することで、nAMDの病態解明に寄与する可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：The effects of benzoylphenylurea (BPU17) on neovascular age-related macular degeneration (nAMD) were investigated in models of subretinal fibrosis induced by retinal photocoagulation in C57BL/6J mice. To administrate vitreous injections of BPU17 inhibited subretinal fibrosis in them. Similarly, in models of choroidal neovascularization (CNV) induced by retinal photocoagulation in C57BL/6J mice, BPU17 inhibited the growth of CNV in them. BPU17 showed a trend of concentration-dependent inhibitory effects. Our results suggested that the effects of BPU17 inhibit the disorders of visual function induced by nAMD. We investigate the reproducibility of these models to determine the effective concentration of BPU17.

研究分野：眼科学領域

キーワード：nAMD BPU 網膜下線維症 CNV RPE細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

視力障害の主要な原因のひとつとして、線維化による視機能の喪失が挙げられており、とくに滲出型加齢黄斑変性(nAMD)癒痕期の線維化は、主に網膜下に増殖して不可逆な視力障害を引き起こす一方で、未だ治療方法が確立されていない。

nAMDをはじめとした網膜疾患に続発する網膜下線維症は、組織傷害に伴う創傷治癒の組織リモデリングにおいて、組織傷害を契機とする炎症によって惹起された網膜色素上皮(RPE)細胞の上皮間葉系移行(EMT)、細胞遊走、筋線維芽細胞の過剰な活性化によるコラーゲンをはじめとした細胞外マトリクス(ECM)の異常蓄積が、発症プロセスに関与する。現状のnAMDに対する治療方法の第一選択は、抗血管内皮増殖因子(VEGF)薬の硝子体腔内投与である。nAMDにおいてブルッフ膜の破綻を契機とした脈絡膜血管新生(CNV)の網膜下増殖は、CNV破綻による網膜下出血を来す増悪期を経て、癒痕期の網膜下における線維化を生じる。抗VEGF薬はnAMDにおけるCNVを抑制するが、線維化そのものに対しては阻害効果を持たないため、発症から時間が経過したnAMD癒痕期では視力障害の改善に寄与しない。また、抗VEGF薬による治療で視力を維持するためには定期的に繰り返しの投与が必要となる一方で、長期的かつ反復的な投与は網膜萎縮を引き起こすことが知られている。したがって、副作用が少なく、病期が進行した症例において網膜下線維症の制御を行う薬理機序を持った薬剤の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、nAMD癒痕期における網膜下線維症を抑制する化合物の同定とその作用機序を解明することで、臨床応用の可能性を検討することにある。本研究では、新たな線維性増殖の制御因子、及びその経路を明らかにすることで、網膜下線維症による視機能障害を抑制し得る新規の治療標的を見出す。また、nAMD以外の線維性増殖を伴う難治性網膜硝子体疾患においても視機能の維持に大きく貢献し、薬物開発において新たな標的分子及び指針を与える。

3. 研究の方法

BPU17がRPE細胞のEMTに及ぼす影響の検討

RPE細胞の傷害では、組織リモデリングの過程において細胞移動と同時にEMTが生じることから、BPU17がこれらに及ぼす影響を検討する。BPU17を加えて24時間培養したRPE細胞から抽出したタンパク質を用いてイムノブロット法を行い、EMT関連タンパク質の発現を解析し、同様にRPE細胞から抽出したmRNAからPCR法を行ってEMTに関連する遺伝子の解析を行う。これらにより、RPE細胞のEMTへの作用機序と制御機構、それに関わる分子、転写因子、シグナル伝達経路などを検討する。また、ECMの過剰産生によるリモデリング異常についても、RPE細胞から抽出したタンパク質を用いてザイモグラフィー法を行い、タンパク質分解酵素の活性を解析してECM発現との相関を検討する。

網膜下線維症モデルでのBPU17の作用の検討

C57BL/6Jマウスに網膜光凝固を施行し、網膜下線維症を誘導したモデルを用いて、BPU17を硝子体腔内投与することで、BPU17が網膜下の線維化形成に与える影響を検討する。光凝固直後および7日後に試薬の投与を行い、処置後21日目にフラットマウント標本化を行う。線維化面積の同定には、網膜下線維症で発現上昇する抗Type I collagen抗体を用いて蛍光免疫染色を行い解析する。

BPU17がCNV増生に与える影響の検討

の結果を得て、BPU17が網膜下線維症の形成に影響を及ぼすと仮定し、CNVに対するBPU17の作用を検討することで、生体内においてBPU17が作用する段階を明らかにする。網膜光凝固によってRPEを破綻させCNVを誘導したマウス眼球にBPU17の硝子体腔内投与を行い、処置後7日目に標本化を行う。CNVの同定には、血管内皮細胞に特異的に結合するIsolectin B4を用いて蛍光免疫染色を行い解析する。

BPU17の標的分子や結合分子の検討

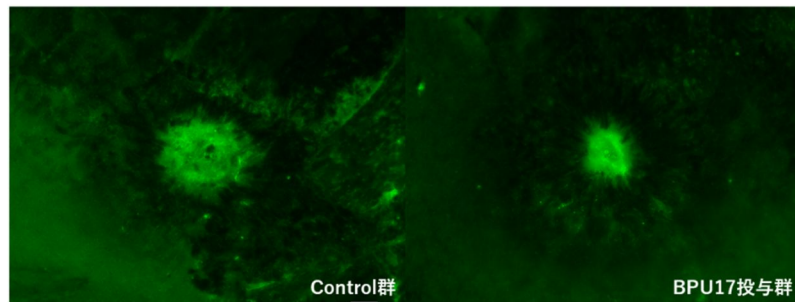
培養RPE細胞を用いてBPU17が関与する分子の同定を行うため、RNA抽出を行い、次世代シーケンス解析を行う。RPE細胞のEMT誘導のためTGF- β 2で刺激を行い、BPU17を加えて24時間培養を行ってからRNA抽出を行う。これを次世代シーケンス解析することでBPU17の標的分子や結合分子を含むシグナル伝達経路を明らかにする。

4. 研究成果

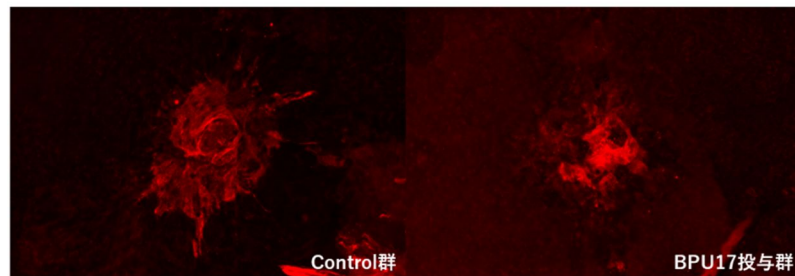
に関して、C57BL/6Jマウスを用いた網膜下線維症モデルにおいて、BPU17の濃度依存的に、網膜下線維症の面積に縮小傾向が見られた。また、に関して、C57BL/6Jマウスを

用いた CNV モデルにおいては、BPU17 の濃度依存的に、CNV の面積に縮小傾向が見られた。複数回の検討を行い、統計学的に有意差を認めた条件について、今後、再現性を確認して薬剤の有効濃度を決定する。BPU17 は、ヒト動脈由来の血管内皮細胞に対して細胞増殖および細胞遊走に抑制的に作用することが示されており、また、マトリゲル上で培養した血管内皮細胞に対しては、チューブ形成が阻害されることが明らかになっている。しかしながら、これらの作用に關与する BPU17 の分子機序は明らかになっていない。本研究で、CNV 増生や網膜下線維症の形成に対して BPU17 が抑

CNVモデルでの検討



網膜下線維症モデルでの検討



制的に作用することが示唆されたことから、BPU17 の分子機序を明らかにするため、RPE 細胞に対する作用についても検討を要する。今後、 の検討を行うことで、BPU17 の標的分子やシグナル伝達経路を明らかとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Yamashiro C, Tokuda K, Kobayashi Y, Higashijima F, Yoshimoto T, Ohta M, Ogata T, Ashimori A, Kobayashi M, Hatano M, Uchi SH, Wakuta M, Kimura K	4. 巻 11
2. 論文標題 Benzalkonium chloride-induced myofibroblastic transdifferentiation of Tenon's capsule fibroblasts is inhibited by coculture with corneal epithelial cells or by interleukin-10	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 16096-16096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-94852-8	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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮崎 智景, 山城 知恵美, 小林 正明, 永井 智彦, 播磨 希, 白石 理江, 徳久 佳代子, 寺西 慎一郎, 木村 和博
2. 発表標題 急性骨髄性白血病治療中に発症した白血病性視神経症の一例
3. 学会等名 第74回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 徳田 和央, 山城 知恵美, 小林 由佳, 波多野 誠, 小林 正明, 藏満 保宏, 寺西 慎一郎, 山田 直之, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 網膜前駆細胞活性化におけるピルビン酸キナーゼM2アイソフォームの機能
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山城 知恵美, 徳田 和央, 小林 由佳, 小林 正明, 波多野 誠, 永井 智彦, 寺西 慎一郎, 徳田 信子, 木村 和博
2. 発表標題 点眼防腐剤によるテノン嚢線維芽細胞の形態変化に対する角膜上皮細胞の抑制作用と機序
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 由佳, 山城 知恵美, 小林 正明, 波多野 誠, 徳田 和央, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 RAR- agonistによるsubretinal fibrosisの抑制作用
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 波多野 誠, 徳田 和央, 小林 由佳, 山城 知恵美, 内 翔平, 小林 正明, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 光誘因性の網膜変性モデルにおけるHSF1の神経保護性についての検討
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yanai R, Shoda H, Uchi SH, Kobayashi M, Nagai T, Teranishi S, Wakuta M, Kimura K
2. 発表標題 Rho kinase inhibitor, ripasudil reduced intraocular pressure and Medication-score for uveitic glaucoma: two-year outcome
3. 学会等名 16th Congress of the International Ocular Inflammation Society (IOIS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳井 亮二, 内 翔平, 緒方 惟彦, 波多野 誠, 小林 正明, 永井 智彦, 寺西 慎一郎, 木村 和博
2. 発表標題 ぶどう膜炎続発緑内障に対するROCK阻害薬による早期の眼圧下降効果
3. 学会等名 第54回日本眼炎症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 正明, 竹中 優嘉, 濱田 和花, 太田 真実, 内 翔平, 永井 智彦, 寺西 慎一郎, 木村 和博
2. 発表標題 当院における隅角鏡を用いた流出路再建術の成績
3. 学会等名 第71回山口眼科手術懇話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山城 知恵美, 徳田 和央, 小林 由佳, 小林 正明, 波多野 誠, 永井 智彦, 寺西 慎一郎, 徳田 信子, 木村 和博
2. 発表標題 BACによるテノン囊線維芽細胞の形態変化に対する抗炎症性サイトカインの抑制効果
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 由佳, 山城 知恵美, 東島 史明, 吉本 拓矢, 緒方 惟彦, 芦森 温茂, 小林 正明, 波多野 誠, 湧田 真紀子, 柳井 亮二, 徳田 和央, 木村 和博
2. 発表標題 RAR- agonistによるRPE細胞におけるEMT抑制作用
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------