

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09714

研究課題名（和文）炎症性眼疾患の治療・緩和を見据えた活性イオウ分子種による抗炎症作用機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the anti-inflammatory mechanism by active sulfur species aimed at the treatment and alleviation of inflammatory eye diseases

研究代表者

依山 寛司（Tawarayama, Hiroshi）

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20402414

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）：酸化ストレス及び炎症は加齢性眼科疾患の一因であり、これら疾患の発症や病態緩和には抗酸化能・抗炎症能の増強が効果的である。これまで我々は、活性イオウ分子種の一つであるグルタチオン三硫化物(GSSSG)が、眼由来細胞株や網膜組織において抗炎症作用を發揮することを明らかにした。しかし、その作用機序については十分には解明されていない。本研究では、その課題に取り組み、GSSSGによる抗炎症作用を担う細胞内シグナル経路の一部を同定した。本研究成果は、将来的に眼疾患の病態緩和を目的としたGSSSGベースの薬剤を開発する際、その生体安全性や生じうる副反応の予測に寄与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、生体内において自然的に存在するGSSSGの抗炎症作用に着目し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。以前我々は、GSSSGによるIL6及びMCP1の転写抑制に細胞内シグナル分子であるERK1/2が関与していることを見出した。しかし、IL1bの発現抑制機序については未解明であった。IL1bはそれ自身やIL6といった他の炎症性サイトカインの発現を促し、炎症増悪をもたらす。即ち、サイトカインストームの抑制にはIL1bの無力化が有効であり、本研究によってGSSSGの作用機序が明らかになったことで、その臨床応用に際し、生じうる副反応の予測を容易にした。

研究成果の概要（英文）：Oxidative stress and inflammation are contributing factors to age-related ocular diseases, and enhancing antioxidant and anti-inflammatory capacities has been shown to be effective in the onset and management of these diseases. Previously, we demonstrated that one of the active sulfur species, glutathione trisulfide (GSSSG), exhibits anti-inflammatory effects in ocular cell lines and retinal tissues. However, the underlying mechanism of action remains incompletely understood. In this study, we addressed this challenge and identified some of the intracellular signaling pathways responsible for the anti-inflammatory effects of GSSSG. These findings contribute to predicting the safety and potential side effects of GSSSG-based drugs aimed at alleviating ocular diseases in the future.

研究分野：神経科学

キーワード：超硫黄 グルタチオン三硫化物 抗炎症 加齢性眼疾患

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた我が国では、白内障や緑内障を初めとする加齢性眼疾患の罹患者数は増加の一途を辿っており、その対策が急務となっている。加齢性眼疾患は、加齢に伴う生体内抗酸化物質の減少や慢性炎症が発症の一因と考えられることから、これら疾患の制御には、生体内での抗酸化活性や抗炎症活性の賦活化が有効である。これを臨床的に実現する手段として、我々は生体内において自然的に存在する活性イオウ分子種に着目した。

以前申請者らは、糖尿病網膜症患者由来の眼内液を対象に活性イオウ分子種のメタボローム解析を実施し、コントロール患者に比べ、同患者ではグルタチオン三硫化物 (GSSSG) の含量が有意に増加していることを見出した (Kunikata H et al., Sci Rep, 2017)。また、網膜由来細胞株を用いた実験において、GSSSG は酸化ストレス誘導性細胞死を有意に抑制したことから、糖尿病網膜症患者における GSSSG 量の増加は、酸化ストレスに対する生体防御反応であると推測した (Kunikata H et al., Sci Rep, 2017)。GSSSG 類縁物質であるグルタチオン二硫化物 (GSSG) は、同濃度では酸化ストレス誘導性細胞死抑制作用を発揮せず、従って GSSSG は GSSG に比べて強力な抗酸化作用を有することが示唆された。他方、申請者らは GSSSG による新規薬効探索試験を実施し、GSSG とは異なり、GSSSG が抗炎症作用を発揮することを見出した。申請者らはウサギを対象に模擬白内障手術を実施し、その際、GSSG あるいは GSSSG 含有液を用いて眼内灌流を行った。その後、前房内炎症の指標となるフレア値を経時的にモニターしたところ、GSSG 含有液に比べ、GSSSG 含有液では、術後フレアの上昇が有意に抑制されることを明らかにした (Kunikata H and Tawarayama H et al., Sci Rep, 2022)。さらに申請者らは、各種グリアとともに眼内炎症に関与する網膜色素上皮細胞を対象に GSSSG による抗炎症作用及びその作用機序について研究を行った。その結果、GSSSG が炎症性サイトカインの発現を転写レベルで抑制すること、同様の作用は GSSG には認められないこと、GSSSG は ERK1/2 の活性化を介して炎症性サイトカインの発現抑制作用を発揮することを見出した (Tawarayama H et al., Ocul Immunol Inflamm, 2020)。

以上の結果、申請者らは内因性の新規抗酸化システムとして同定され、今後、臨床応用が期待される活性イオウ分子種に着目し、その一種である GSSSG による新たな薬効及びその作用機序の解明を目的とした研究を推進してきた。申請者らは GSSSG による発現抑制作用を確認した炎症性サイトカインのうち、IL-6 および MCP-1 に関しては、GSSSG による ERK1/2 活性化を介することが明らかになったものの、IL-1 $\beta$  に関しては別の作用機序を介する可能性が示されており、GSSSG による炎症性サイトカイン発現抑制機序の全体像は未解明のままである。加えて、GSSSG が、ミクログリアやミュラー細胞といった、網膜炎症のキープレイヤーであるグリアに対しても同様に抗炎症作用を発揮するか、また、*in vivo* レベルにおいても同様の作用を発揮するか明らかになっていない。本研究では、これら未解明の課題を明らかにすることを目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究では、網膜炎症を担うグリア細胞及び動物由来網膜を対象とし、GSSSG による抗炎症作用を検証するとともにその作用機序のさらなる解明を図った。

### 3. 研究の方法

動物実験：本研究で実施した *in vitro* 実験では、野生型雄マウス (C57BL/6 系統) から単離調製した初代培養ミュラー細胞及びマウス脳由来ミクログリア細胞株である BV-2 を用いた。また、GSSSG による抗炎症作用の機序解明を目的とした実験では、ヒト網膜色素上皮細胞株である ARPE-19 を使用した。他方、動物実験では、日本エスエルシーから購入した野生型雄ラット (Wistar 系統、8-10 週齢) を使用した。

細胞培養：細胞培養用培地として、終濃度 10% となるよう牛胎児血清を添加した Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) を用いた。ミュラー細胞、BV-2、ARPE-19 を 96-well plate にシードし、その翌日、GSSSG にて 1 時間前処理した。その後、炎症を惹起させるため、LPS (10 $\mu$ g/mL) を培地に添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 6 時間放置した。

炎症抑制実験：培養細胞及びラット網膜において炎症を惹起するため、バクテリア由来のリポ多糖 (LPS) を用いた。GSSSG 及び GSSG は協和発酵バイオから入手した。他方、動物実験では、キシラジン (8mg/kg)、ケタミン (80mg/kg) 混合液の腹腔投与によりラットに麻酔を施したのち、LPS (250ng/ $\mu$ L, total 500ng/eye) 及び GSSSG あるいは GSSG (7.5 あるいは 30nmol/ $\mu$ L, total 15 あるいは 60nmol/eye) の混合液を眼内に投与した。その 10 時間後あるいは 48 時間後に網膜を採取し、炎症性サイトカインの発現定量解析、網膜ミクログリアの動態解析に用いた。

発現定量解析：炎症性サイトカインの発現解析は定量的 PCR 及び酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) を用いて行った。培養細胞を対象にした発現解析では、GSSSG 及び LPS で細胞を処理したのち、SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR を用いて cDNA を合成した。他方、動物実験では、採取したラット網膜をホモジナイズし、miRNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。その後、SuperScript III First-Strand Synthesis System を用いて cDNA を合成した。cDNA 及び TaqMan プローブを混合し、7500 fast real-time PCR System を用いて定量的 PCR を実施した。

各種炎症性サイトカインのうち、TNF-a、IL-1 $\beta$ 、IL-6、Ccl2 を解析対象とした。ELISA によるサイトカイン発現定量実験には培養細胞の上清を用いた。TNF-a、IL-6、Ccl2 を標的とし、Quantikine ELISA Kit を用いて定量を行った。

免疫組織学的解析：網膜ミクログリアを検出するため、Iba1 抗体による免疫染色を実施した。ラット眼内に LPS 及び GSSSG を投与したのち、網膜を採取し、4%PFA (paraformaldehyde) 溶液中で一晩固定した。その後、先行研究 (Tawarayama H et al., IOVS, 2019) に従って免疫染色を行った。以下にその手順を簡潔に示した。固定網膜を RIPA バッファーで処理し、4%PFA 溶液で再固定したのち、10%ロバ正常血清を含む PBST 中でブロッキングを行った。その後、500 倍希釈した Iba1 抗体液に 3 日間浸漬し、PBST で洗浄したのち、Cy3 標識抗ウサギ IgG 抗体液にて処理した。

写真撮影、画像解析及び統計解析：Iba1 免疫染色像は 10x 対物レンズを装着した蛍光顕微鏡 BZ-9000 を用いて撮影した。フラットマウント網膜において、視神経乳頭のエッジから 1mm 離れた組織部位の画像を取得した。その後、ImageJ を用いて Iba1 陽性細胞数をカウントし、結果は 1 平方ミリメートルあたりの細胞数で示した。統計学的解析には JMP Pro 14 を用いた。

#### 4. 研究成果

(1) LPS 誘導性炎症性サイトカインに対する GSSSG の発現抑制効果 (ミューラー細胞)：ミューラー細胞を GSSSG にて前処理したのち、LPS で炎症性サイトカインの発現を誘導し、その後、定量的 PCR 及び ELISA を用いて、細胞及び培養上清中の IL-6、Ccl2 の発現量をそれぞれ調べた。LPS 処理群では、無処置に比べ、ミューラー細胞及びその培養上清における IL-6 及び Ccl2 の発現レベルは著しく増加した (図 1)。しかし、GSSSG 処理した細胞では、LPS による IL-6 及び Ccl2 の発現増加が有意に抑制された (図 1)。

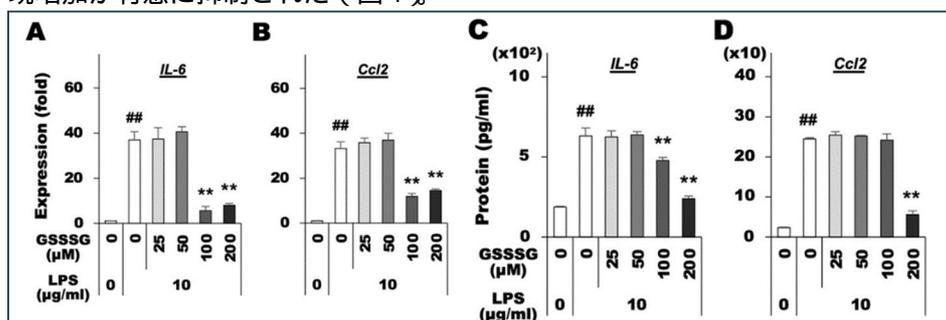


図 1. LPS 及び GSSSG 処理したミューラー細胞における炎症性サイトカインの発現変化。細胞 (A, B) 及び培養上清中 (C, D) の IL-6 (A, C) 及び Ccl2 (B, D) の発現変化。エラーバーは標準偏差を示す。##P < 0.01 versus LPS(-)GSSSG(-) controls (Welch's t test; n = 4); \*\*P < 0.01 versus LPS(+)-GSSSG(-) (Dunnett's test; n = 4)。

(2) LPS 誘導性炎症性サイトカインに対する GSSSG の発現抑制効果 (ミクログリア)：ミクログリア細胞株 BV-2 を GSSSG にて前処理したのち、LPS で炎症性サイトカインの発現を誘導し、その後、定量的 PCR 及び ELISA を用いて、細胞及び培養上清中の TNF-a、Ccl2、IL-6、IL-1 $\beta$  の発現変化をそれぞれ調べた。LPS 処理群では、無処置に比べ、BV-2 細胞及びその培養上清における TNF-a、Ccl2、IL-6 及び IL-1 $\beta$  の発現レベルは著しく増加した (図 2)。しかし、GSSSG 処理した細胞では、これら炎症性サイトカインの発現増加が有意に抑制された (図 2)。上清中の IL-1 $\beta$  タンパク濃度は検出限界以下であった。

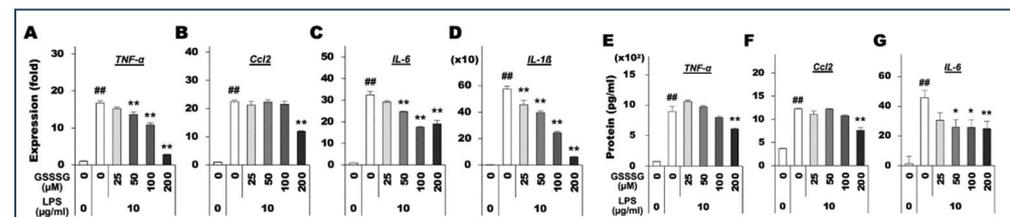


図 2. LPS 及び GSSSG 処理した BV-2 における炎症性サイトカインの発現変化。細胞 (A - D) 及び培養上清中 (E - G) の TNF-a (A, E)、Ccl2 (B, F)、IL-6 (C, G) 及び IL-1 $\beta$  (D, G) の発現変化。エラーバーは標準偏差を示す。##P < 0.01 versus LPS(-)GSSSG(-) controls (Welch's t test; n = 4); \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 versus LPS(+)-GSSSG(-) (Dunnett's test; n = 4)。

(3) LPS 誘導性炎症性サイトカインに対する GSSSG の発現抑制効果 (ラット網膜)：ラット眼内に LPS 及び GSSSG あるいは GSSG を投与し、その後、定量的 PCR を用いて、網膜における IL-6、IL-1 $\beta$ 、Ccl2 の発現変化を調べた。LPS 投与眼の網膜では、無処置のコントロールに比べ、上記サイトカインの発現レベルは著しく増加した (図 3)。これに対し、GSSSG 15nmol の共投与眼では IL-6 の有意な発現低下が認められ (図 3A)、また、GSSSG 60nmol の共投与眼では、IL-6 の

ほか、IL-1 $\beta$ 、Ccl2 の発現低下も認められた ( 図 3B )。GSSG 共投与眼においてもこれらのサイトカインの発現が低下する傾向が認められたが、その効果に有意な差は認められなかった。

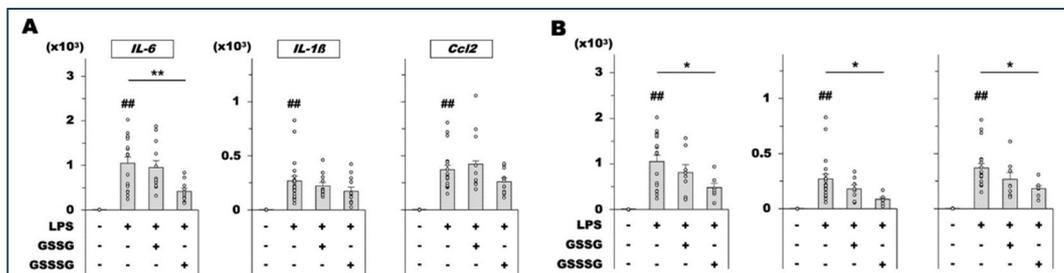


図 3. LPS 及び GSSSG あるいは GSSG を眼内投与したラット網膜における炎症性サイトカインの発現変化。ラット眼内に LPS 及び GSSSG あるいは GSSG (A: 15nmol, B: 60nmol) を投与し、定量的 PCR を用いて網膜における IL-6、IL-1 $\beta$ 、Ccl2 の発現変化を調べた。エラーバーは標準偏差を示す。##P < 0.01 versus LPS(-)GSSSG(-) controls; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (Tukey-Kramer test; n = 12 - 20 in A, 7 - 20 in B)。各遺伝子において LPS (-)グルタチオン(-)及び LPS (+)グルタチオン(-)のデータは A と B で共通。

( 4 ) LPS 及び GSSSG 処理網膜におけるミクログリアの動態変化：ラット眼内に LPS 及び GSSSG を投与し、その後、網膜を採取して、ミクログリアマーカーである Iba1 抗体による免疫染色を行った。そして、LPS 刺激によるミクログリアの動態変化及び GSSSG による影響を調べた。LPS 投与眼の網膜では、無処置眼との比較において、ミクログリアの形態変化が認められ ( 図 4A ) また、単位面積あたりのミクログリア細胞数が増加した ( 図 4B )。それに対し、GSSSG 共投与眼の網膜では、ミクログリアが無処置眼のそれと近い形態を呈し ( 図 4A ) また、LPS 刺激によるミクログリア数の増加が抑制された ( 図 4B )。他方、GSSSG 単独では、ミクログリアの形態や細胞数に影響を与えなかった ( 図 4A, B )。

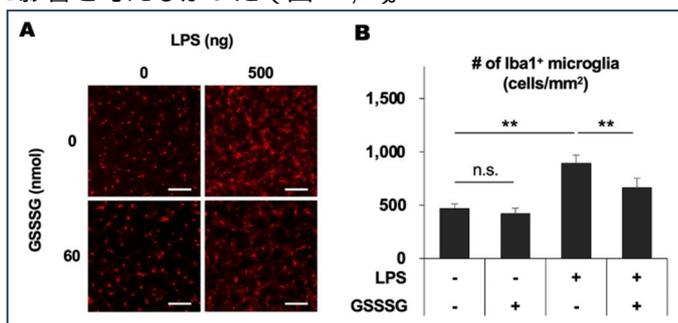


図 4. LPS 及び GSSSG 投与眼におけるミクログリアの動態変化。ラット眼内に LPS ( 500ng ) 及び GSSSG ( 60nmol ) を投与したのち、採取した網膜に対して Iba1 免疫染色を施し、陽性細胞の形態 (A) 及び細胞数 (B) を解析した。エラーバーは標準偏差を示す。\*\*P < 0.01 (Tukey-Kramer test; n = 4)。n. s. : not significant.

( 5 ) GSSSG による炎症性サイトカイン発現抑制作用機序の解明：GSSSG は、炎症性サイトカインの発現抑制を介し、抗炎症作用を発揮することが報告されている (Tawarayama H et al., Ocul Immunol Inflamm, 2020)。そこで、既知の細胞内シグナル経路の阻害剤、促進剤からなるケミカルライブラリーのスクリーニングを行い、GSSSG による炎症性サイトカイン発現抑制作用に関与するシグナル経路の同定を試みた。スクリーニングにはヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 を使用した。96-well plate に細胞をシードし、その翌日、終濃度 10 $\mu$ M となるよう各種ケミカルを培地に添加し、1 時間培養した。その後、細胞を GSSSG (終濃度 200 $\mu$ M) で 1 時間前処理し、LPS (終濃度 10 $\mu$ g/mL) で 6 時間処理したのち、IL-1 $\beta$  及び Ccl2 の発現変化を指標に候補ケミカルを選別した。即ち、候補ケミカルは GSSSG による IL-1 $\beta$  及び Ccl2 の発現抑制作用をキャンセルする。まず初めに、358 種類の各ケミカルに関して、N=1 でハイスループットなスクリーニングを行った。GSSSG による IL-1 $\beta$  あるいは Ccl2 の発現抑制作用を 50% 以上キャンセルするといったクライテリアで評価した結果、41 種類のケミカルを同定した。次に 1st スクリーニングの結果をバリエーションするため、2nd スクリーニングとして N 数を 4 に増やして同様の実験を実施した。その結果、候補ケミカルは 41 から 21 に絞られた。ケミカル単独の処置で IL-1 $\beta$  あるいは Ccl2 の発現を誘発する場合、見かけ上、GSSSG の発現抑制作用がキャンセルされたことになり、偽陽性となりうる。そのため、次にケミカル単独では、これら遺伝子の発現を誘発しないといった評価基準で 3rd スクリーニングを実施した。その結果、候補ケミカルは 21 から 7 に絞られた。これらケミカルは、セリン・スレオニンキナーゼ、チロシンキナーゼ、プロテインキナーゼ、チロシンフォスファターゼ、ホスホリパーゼ、オキシゲナーゼなどを標的としており、今後、これらの細胞内シグナル分子に着目し、GSSSG による抗炎症作用機序の解明を推進していく。

(6)まとめ：本研究の結果、網膜炎を担うミクログリアやミュラー細胞といったグリア細胞に対し、GSSSGが炎症性サイトカインの発現抑制を介して抗炎症作用を発揮することが明らかになった。また、GSSSGが *in vivo* レベルにおいても網膜炎の制御に有用である可能性が示された。GSSSGは新規生体内抗酸化システムを担う活性イオウ分子種に属し、内因的に高濃度で存在するため、顕著な生物毒性は発揮しないものと考えられている。それ故、GSSSGによる抗炎症作用の機序が解明され、副反応のリスク評価が十分なされれば、酸化ストレスや炎症に起因する眼疾患の新たな治療薬として、GSSSGベースの薬剤開発の道が拓ける。本研究では、標的既知のケミカルライブラリーのスクリーニングを行い、GSSSGの抗炎症作用に關与するシグナル経路を探索した。その結果、いくつかのケミカルを同定した。今後、当該作用機序の解明につながるものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tawarayama Hiroshi, Hirata Yoshiyuki, Uchida Keiko, Himori Noriko, Uesato Shinichi, Nakazawa Toru	4. 巻 793
2. 論文標題 Isozyme-specific histone deacetylase 1/2 inhibitor K560 attenuates oxidative stress-induced retinal cell death	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136978 ~ 136978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2022.136978	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 Kunikata Hiroshi, Tawarayama Hiroshi, Tsuda Satoru, Akaike Takaaki, Nakazawa Toru	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of an anti-oxidative intraocular irrigating solution based on reactive persulfides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-21677-4	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 Inoue-Yanagimachi Maki, Himori Noriko, Uchida Keiko, Tawarayama Hiroshi, Sato Kota, Yamamoto Masayuki, Namekata Kazuhiko, Harada Takayuki, Nakazawa Toru	4. 巻 226
2. 論文標題 Changes in glial cells and neurotrophic factors due to rotenone-induced oxidative stress in Nrf2 knockout mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 109314 ~ 109314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2022.109314	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 Tawarayama Hiroshi, Inoue-Yanagimachi Maki, Himori Noriko, Nakazawa Toru	4. 巻 11
2. 論文標題 Glial cells modulate retinal cell survival in rotenone-induced neural degeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-90604-w	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 Tawarayama Hiroshi, Umeki Kota, Inoue-Yanagimachi Maki, Takahashi Naoki, Hasegawa Hirokazu, Himori Noriko, Tsuda Satoru, Kunikata Hiroshi, Akaike Takaaki, Nakazawa Toru	4. 巻 13
2. 論文標題 Glutathione trisulfide prevents lipopolysaccharide-induced retinal inflammation via inhibition of proinflammatory cytokine production in glial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-38696-4	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 依山寛司, 鈴木哲章, 津田聡, 國方彦志, 中澤徹
2. 発表標題 活性イオウ分子種の抗酸化・抗炎症作用に基づく新規眼内灌流液の開発
3. 学会等名 第3回Translational Research Conference for Neuroprotection
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 眼内抗炎症剤	発明者 中澤徹、赤池孝章、 國方彦志、依山寛 司、津田聡	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-187729	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	中澤 徹 (Nakazawa Toru)  (30361075)	東北大学・医学系研究科・教授  (11301)	
研究分担者	國方 彦志 (Kunikata Hiroshi)  (40361092)	東北大学・医学系研究科・准教授  (11301)	

## 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
---------	---------