

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462663

研究課題名(和文)核内受容体を含む転写コンプレックス制御による網膜下瘢痕形成抑制の新規治療薬開発

研究課題名(英文)The mechanism of inhibitional effect to subretinal fibrosis by nuclear receptor system

研究代表者

木村 和博(KIMURA, Kazuhiro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60335255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素上皮細胞を用いた三次元培養系にて、コラーゲンゲル収縮を抑制する核内受容体リガンドとして、ステロイドホルモン系の糖質コルチコイド、女性ホルモンにゲル収縮抑制作用が見出された。これらは、EMTにおけるマーカーである $\alpha$ -SMA抑制や細胞外基質のリモデリングに關与するMMPsの活性化抑制作用があることを明らかにした。この作用には、MAPKs、NF- $\kappa$ B系のシグナル伝達経路が主たる経路であることを明らかにした。さらに、他のリガンドとしてATRAつまりビタミンA誘導体にステロイド同等の作用を認めた。現在、ビタミンAの作用についてはどの受容体特異的であるか検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：In this study, the purpose is that formation and contraction of the subretinal fibrosis will be clarified focused on role of nuclear receptors in retinal pigment epithelial cells and we will develop novel therapeutic drugs based on transcriptional regulation through nuclear receptors.

We have screened ligands of nuclear receptors through three-dimensional culture system using retinal pigment epithelial cells. As a result, we identified steroid hormones containing glucocorticoid and a female hormone. These compounds were found to inhibit gel contraction. They also suppressed the expression of  $\alpha$ -SMA as a marker in EMT and the expression and activation of MMPs contributed to the remodeling of extracellular matrix. Their action was partially dependent on the signaling pathway of MAPKs or NF- $\kappa$ B. Furthermore, ATRA, vitamin A derivative, showed the same effect as steroids. Currently, we have been studying which receptors are specific for the action of vitamin A.

研究分野：眼科学

キーワード：retina fibrosis nuclear receptor transcription factor RPE cell

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症、加齢黄斑変性、増殖性硝子体網膜症などの難治性網膜硝子体疾患の予後は抗 VEGF 薬の登場や低侵襲な小切開硝子体手術の発展などにより改善されてきたが、一方で、重症例、再発例及び遷延化例などでは視機能予後は未だよくないのが現状である。このような難治性のケースでは眼内、網膜内あるいは網膜下で、局所的な炎症が持続していると考えられている。さらに、網膜下に不可逆的な網膜下線維性癒痕組織を認めることがある。このことは、これら難治性の網膜硝子体疾患において、現行治療にて疾患原因となる眼内新生血管の退縮や網膜虚血、網膜復位などが改善できたとしても、慢性炎症が存在し網膜下に線維性癒痕組織が形成されると、網膜視細胞が不可逆的な障害を受け、視機能改善は困難であることを意味する。二次的な網膜障害を防ぎ視機能を維持するには、慢性炎症をコントロールし網膜下線維性癒痕形成、収縮を如何に制御できるかが重要であり、これらを標的とした特異的な治療法の開発が必要である。

### 2. 研究の目的

増殖性硝子体網膜症や加齢黄斑変性などの難治性網膜硝子体疾患は、硝子体手術や抗 VEGF 剤、ステロイド剤などの内科的治療にてその治療成績は改善してきた。しかし重症や再発例では治癒にいたらず、慢性的に存在する炎症を基盤とし、二次的に形成された網膜下の線維性癒痕組織にて視力不良となることがある。このことは、難治性網膜硝子体疾患の治療において、未だ網膜下に形成される線維性癒痕組織抑制の特異的な治療法が存在しないことを示唆している。本研究の第一の目的は、慢性炎症を制御し、二次的に形成される網膜下線維性癒痕の形成、収縮の病態解明を行うことにある。これまでの研究で、網膜下に形成される線維性癒痕組織には種々の細胞成分およびコラーゲンやフィブロネクチンといった細胞外マトリックスの過剰な蓄積が報告されている。中でも、網膜色素上皮細胞は、主要な細胞成分の1つであり、その上皮細胞としての性質を上皮間葉系移行により筋線維芽細胞に変化させ、細胞増殖能を獲得し、前述のような過剰な細胞外マトリックスを過剰に分泌する。さらに、これまでの研究で、我々は角膜やテノン嚢下などの眼組織の線維化に対して、*in vitro*、*in vivo* においてステロイドホルモンに抑制作用があることを明らかにしている。ステロイドホルモンは、その機能を発揮するには特異的な核内受容体に結合する必要がある。申請者は、その他の核内受容体およびそれにまつわる転写因子群が網膜下での癒痕組織形成抑制に関与しているのではないかと考えた。そこで、網膜色素上皮細胞を基点とした核内受容体およびそれと相互作用する転写因子

群の網膜下線維性癒痕の形成、収縮における役割を明らかにし、核内受容体を中心とした転写因子群の転写ネットワーク制御を介した新規治療薬を開発することを第二の目的とした。

### 3. 研究の方法

網膜色素上皮細胞に焦点をあて、網膜下線維性癒痕形成、収縮の分子メカニズムの解明を行い、それに対する新規治療薬の開発を目的として研究を遂行する。網膜色素上皮細胞を起点とした癒痕形成、収縮の *in vitro* の培養系を考え、I型コラーゲンゲル内で網膜色素上皮細胞を三次元培養するアッセイ系を確立した。さらに、線維化促進の主要な増殖因子の1つである TGF- $\beta$ 2 を用いて、網膜色素上皮細胞の上皮間葉系移行を促進させ、コラーゲンゲルの収縮を促進させることで癒痕形成、収縮増悪の指標とした。そして特異的なリガンドを用いて核内受容体を介した網膜色素上皮細胞のコラーゲンゲル収縮抑制に関する因子を同定し、その抑制性シグナル経路を特定する。続いて、核内受容体、転写因子による網膜下線維性癒痕形成、収縮に寄与する  $\alpha$ -SMA 抑制の転写制御機序や細胞外基質のリモデリングに關与する MMPs の活性化抑制に關与する因子、シグナル経路を含め検討する。具体的には MMP-1、-2、-3、-8、-9 の発現及び活性化をイムノプロット法ならびにザイモグラフィにて検討する。さらに、上皮間葉系移行の分子マーカーである  $\alpha$ -SMA に加え、フィブロネクチンや I 型コラーゲンなどの細胞外基質の分泌発現についても、イムノプロット法や ELISA 法にて検討する。さらに、これまでの結果に基づく網膜下線維性癒痕形成、収縮抑制作用があると思われる候補化合物を用いて、マウス網膜下癒痕形成モデルで *in vivo* における網膜下線維性癒痕形成、収縮への作用を検討する。具体的には、WT の B6 マウスの腹腔内にチオグリコレートを注入後、数日したのち腹水を回収。それに、同定した化合物をミックスし、マウスの硝子体内の網膜下に注入する。*in vivo* における網膜下線維性癒痕さらなる候補化合物を同定するため、コラーゲン収縮抑制、 $\alpha$ -SMA 発現及び MMPs 活性化抑制を指標にハイスループットスクリーニングを行う。

### 4. 研究成果

網膜色素上皮細胞を用いた三次元培養系にて、コラーゲンゲル収縮を抑制する核内受容体リガンドとして、ステロイドホルモン系の糖質コルチコイド、女性ホルモンにゲル収縮抑制作用が見出された。これらは、投与後 24 時間目より優位に TGF- $\beta$ 2 によるコラーゲンゲル収縮を抑制した。またその効果は、それぞれ濃度依存性であることも明らかにした。

さらに、上皮間葉系移行におけるマーカーである  $\alpha$ -SMA の発現ならびに細胞外マトリックスのフィブロネクチンの分泌発現も抑制した。さらに、細胞外基質のリモデリングに関与する MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9) の活性化抑制作用があることを明らかにした。この作用には、MAPKs、NF- $\kappa$ B 系のシグナル伝達経路が主たる経路であることを明らかにした。さらに、他のリガンドとして ATRA つまりビタミン A 誘導体にステロイド同等の作用を認めた。つまり、網膜色素上皮細胞による TGF- $\beta$ 2 によるコラーゲンゲル収縮を濃度、時間依存性に抑制した。現在、ビタミン A の作用については、どの受容体特異的であるか検討を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

Tokuda K, Kuramitsu Y, Baron B, Kitagawa T, Tokuda N, Kobayashi M, Kimura K, Sonoda KH, Nakamura K: Changes in metabolic proteins in ex vivo rat retina during glutamate-induced neural progenitor cell induction. *Mol Cell Biochem* 419(1-2): 177-184, 2016. 査読有  
DOI: 10.1007/s11010-016-2769-z  
Kimura K, Zhou H, Orita T, Kobayashi S, Wada T, Nakamura Y, Nishida T, Sonoda KH: Inhibition by all-trans retinoic acid of collagen degradation mediated by corneal fibroblasts. *Clin Experiment Ophthalmol* 44(6): 502-508, 2016. 査読有  
DOI: 10.1111/ceo.12709  
Hatano M, Kimura K, Nomi N, Teranishi S, Orita T, Fujitsu Y, Sonoda KH: Combination management by C-arm fluoroscopy and extraocular muscle severance for penetrating ocular trauma with a retrobulbar foreign body. *Orbit* 35(3): 167-169, 2016. 査読有  
DOI: 10.3109/01676830.2016.1139596  
Kobayashi Y, Kimura K, Fujitsu Y, Shinkawa K, Muta H, Sonoda KH: Methotrexate-associated orbital lymphoproliferative disorder in a patient with rheumatoid arthritis: a case report. *Jpn J Ophthalmol* 60(3): 212-218, 2016. 査読有  
DOI: 10.1007/s10384-016-0439-z  
Liu Y, Kimura K, Orita T, Suzuki K, Teranishi S, Mori T, Sonoda KH: Inhibition by a retinoic acid receptor agonist of extracellular matrix remodeling mediated by human Tenon

fibroblasts. *Mol Vis* 21: 1368-1377, 2015. 査読有  
DOI: PMC4704771  
Liu Y, Kimura K, Orita T, Sonoda KH: Necrosis-Induced Sterile Inflammation Mediated by Interleukin-1 in Retinal Pigment Epithelial Cells. *PLoS One* 10(12): e0144460, 2015. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0144460  
Takeda A, Yoshikawa H, Fukuhara T, Hikita S, Hijioka K, Otomo T, Arita R, Hisatomi T, Kimura K, Yoshida S, Kawano Y, Sonoda KH, Ishibashi T: Distinct Profiles of Soluble Cytokine Receptors Between B-Cell Vitreoretinal Lymphoma and Uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56(12): 7516-7523, 2015. 査読有  
DOI: 10.1167/ivos.15-17456a  
Shoda H, Yanai R, Yoshimura T, Nagai T, Kimura K, Sobrin L, Connor KM, Sakoda Y, Tamada K, Ikeda T, Sonoda KH: Dietary Omega-3 Fatty Acids Suppress Experimental Autoimmune Uveitis in Association with Inhibition of Th1 and Th17 Cell Function. *PLoS One* 10(9): e138241, 2015. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0138241  
Kimura K, Orita T, Liu Y, Yang Y, Tokuda K, Kurakazu T, Noda T, Yanai R, Morishige N, Takeda A, Ishibashi T, Sonoda KH: Attenuation of EMT in RPE cells and subretinal fibrosis by an RAR-agonist. *J Mol Med (Berl)* 93(7): 749-758, 2015. 査読有  
DOI: 10.1007/s00109-015-1289-8  
Kimura K, Orita T, Liu Y, Yang Y, Tokuda K, Kurakazu T, Noda T, Yanai R, Morishige N, Takeda A, Ishibashi T, Sonoda KH: Attenuation of EMT in RPE cells and subretinal fibrosis by an RAR-agonist. *J Mol Med (Berl)* 93(7): 749-758, 2015. 査読有  
DOI: 10.1136/biophthalmol-2014-306175  
Liu Y, Kimura K, Orita T, Teranishi S, Suzuki K, Sonoda KH: Inhibition by All-Trans-Retinoic Acid of Transforming Growth Factor- $\beta$ -Induced Collagen Gel Contraction Mediated by Human Tenon Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55(7): 4199-4205, 2014. 査読有  
DOI: 10.1167/ivos.13-13572  
Kimura K, Orita T, Fujitsu Y, Liu Y, Wakuta M, Morishige N, Suzuki K, Sonoda KH: Inhibition by female sex hormones of collagen gel contraction mediated by retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55(4): 2621-2630, 2014. 査読有  
DOI: 10.1167/ivos.13-13501

〔学会発表〕(計 15 件)

木村 和博：網膜線維増殖性疾患に対する治療への取り組み - 臨床と研究をつなぐ - . 霜仁会宇部支部特別講演会, 山口県 (国際ホテル宇部), 2017/01/30

木村 和博：網膜線維性増殖疾患に対する治療の試み - 臨床と研究をつなぐ - . きららオフクラブ, 山口県 (小郡第一総合病院), 2017/01/21

小林 由佳, 木村 和博, 折田 朋子, 藤津 揚一朗, 松山 茂生, 富士本 一志, 山内 一彦, 園田 康平：糖尿病黄斑浮腫における硝子体液中 acute phase factor と視力の検討 . 第 55 回日本網膜硝子体学会総会, 東京都 (ベルサール渋谷ガーデン), 2016/12/03

木村 和博：糖尿病眼合併症とその治療 . 第 9 回『眼と糖尿病』研究会, 山口県 (ANA クラウンプラザホテル宇部), 2016/11/18  
波多野 誠, 木村 和博, 緒方 惟彦, 西本 綾奈, 芳川 里奈：当院における糖尿病黄斑浮腫に対するトリアムシノロンアセトニド硝子体注射の使用成績 . 山口 Expert Meeting, 山口県 (ホテルニュータナカ), 2016/11/17

寺西 慎一郎, 木村 和博, 岩本 菜奈子, 村田 敏彦, 白石 理江, 徳久 佳代子, 折田 朋子, 鈴木 克佳：バルベルト緑内障インプラント前房用チューブを用いた硝子体腔内チューブ挿入法の経験 . 第 54 回六大学合同眼科研究会, 福岡県 (九州大学), 2016/09/03

武田 篤信, 吉川 洋, 有田 量一, 木村 和博, 脇岡 邦明, 疋田 伸一, 清武 良子, 大友 孝昭, 吉田 茂生, 川野 庸一, 石橋 達朗, 園田 康平：網膜硝子体悪性リンパ腫及び内因性ぶどう膜炎患者由来硝子体液中の可溶性サイトカイン受容体のプロファイリング . 第 54 回六大学合同眼科研究会, 福岡県 (九州大学), 2016/09/03

Shoda H, Yanai R, Yoshimura T, Nagai T, Kimura K, Sobrin L, Kip M Connor, Sakoda Y, Tamada K, Ikeda T, Sonoda KH: Omega-3 fatty acids suppress Experimental Autoimmune Uveitis by inhibiting Th1/Th17 cells. 13th Congress of the International Ocular Inflammation Society (IOIS), USA (San Francisco), 2015/09/26

庄田 裕美, 柳井 亮二, 木村 和博, 吉村 武, Connor Kip, 玉田 耕治, 佐古田 幸美, 池田 恒彦, 園田 康平：-3 脂肪酸による実験的自己免疫性ぶどう膜炎に対する炎症抑制効果 . 第 49 回日本眼炎症学会, 大阪府 (コングレコンベンションセンター), 2015/07/10

折田 朋子, 木村 和博, 園田 康平：角膜実質細胞における ATRA のコラーゲン分解制御による角膜潰瘍抑制作用 . 第

49 回日本眼炎症学会, 大阪府 (コングレコンベンションセンター), 2015/07/10

折田 朋子, 木村 和博, 播磨 希, 山城 知恵美, 湧田 真紀子, 柳井 亮二, 園田 康平：マウス網膜色素上皮細胞のコラーゲンゲル収縮に対する PGE2 の作用 . 第 119 回日本眼科学会, 北海道 (さっぽろ芸文館), 2015/04/17

山城 知恵美, 木村 和博, 劉 洋, 折田 朋子, 寺西 慎一郎, 鈴木 克佳, 園田 康平：テノン囊線維芽細胞における All-trans retinoic acid のコラーゲンゲル収縮抑制効果 . 第 119 回日本眼科学会, 北海道 (ロイトン札幌), 2015/04/16

木村 和博, 守田 裕希子, 折田 朋子, 藤津 揚一朗, 園田 康平：結膜原発と考えられたメルケル細胞癌の 1 例 . 第 68 回日本臨床眼科学会, 兵庫県 (ポートピアホテル・神戸国際展示場), 2014/11/16

木村 和博, 折田 朋子, 藤津 揚一朗, 西田 輝夫, 園田 康平：角膜実質細胞における All-trans retinoic acid のコラーゲン分解制御による角膜潰瘍抑制作用 . 第 46 回日本結合組織学会学術大会 第 61 回マトリックス研究会大会合同学術集会, 愛知県 (ウインクあいち), 2014/06/07

Kimura K, Fujitsu Y, Ueno S, Kondo M, Sonoda KH: A case of Japanese patient diagnosed as melanoma-associated retinopathy with anti-TRPM-1 antibody. WOC2014, 東京都 (東京国際フォーラム), 2014/04/02

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 和博 (KIMURA, Kazuhiro)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：60335255

(2) 研究分担者

園田 康平 (SONODA, Koh-Hei)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：10294943

林 謙一郎 (HAYASHI, Ken-Ichiro)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：90238105

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし