

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05101

研究課題名（和文）形質転換を標的とした眼内線維増殖の予防的治療戦略の構築

研究課題名（英文）Development of therapeutic strategy targeting EMT against intraocular fibrosis

研究代表者

石川 桂二郎（ISHIKAWA, KEIJIRO）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：00795304

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 16,400,000円

研究成果の概要（和文）：網膜色素上皮細胞の上皮間葉転換（EMT）を抑制する低分子化合物をスクリーニングした結果、ROCK阻害薬が強力なEMT抑制効果を有することを確認した。同薬剤を、網膜下線維増殖モデル、網膜上線維増殖動物モデルに投与したところ有効な線維化抑制効果を有することを確認できた。眼内線維血管増殖を認める患者眼内液中で、ペリオスチン、テネイシンCの濃度が有意に高値であり、線維化の範囲と相関していた。以上より、線維化を反映する鋭敏なマーカーとして有用であることを論文で発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ROCK阻害剤の眼内線維増殖に対する薬効、薬理学的解析がなされ、将来的に臨床応用されれば、患者の視機能維持が期待され、その社会貢献ははかり知れない。また、新規治療により硝子体手術や抗VEGF薬硝子体注射件数を減少させることができる可能性があり、患者負担の軽減だけでなく、医療財政の観点からも有益となる。

研究成果の概要（英文）：To develop novel therapy against intra-ocular fibrosis, we first tested the effect of several chemical compounds and found ROCK inhibitors as promising drug that enables significant suppression of RPE (retinal pigment epithelium)-EMT (epithelial-to-mesenchymal transition). We evaluated the drug's stability in the eye after vitreous injection. In vivo experiment using animal model of intra-ocular fibrosis revealed the drug's efficacy inhibiting fibrosis development. We further investigate the ROCK inhibitor's potential for successful RPE cell transplantation therapy.

To investigate periostin (PN) and tenascin-C (TNC) expression in the aqueous humor and trabeculectomy specimens of patients with neovascular glaucoma (NVG) secondary to proliferative diabetic retinopathy (PDR). The NVG group had significantly higher levels of PN and TNC compared with the PDR group. Increased PN and TNC expression suggests their possible involvement in the pathogenesis of NVG secondary to PDR.

研究分野：眼科

キーワード：線維化 上皮間葉転換 形質転換 マトリセルラー蛋白

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症 (DR)、加齢黄斑変性 (AMD) や増殖硝子体網膜症 (PVR) などの増殖性網膜硝子体疾患において、網膜の上下に生じる線維増殖組織形成は不可逆的な視機能障害の原因となる。近年、DR や AMD の治療に抗 VEGF 療法が導入され、眼科臨床で一定の成果をあげている。しかし、DR における網膜上線維血管増殖や AMD における網膜下線維化に対しては奏功せず、かえって線維化を促進し視機能を悪化させる場合がある。眼内線維増殖の分子機序は殆ど不明であるため、治療法が無いのが現状である。

この問題を解決するために、我々は、ゲノム医科学的手法を用いた多角的なアプローチにより、増殖組織のトランスクリプトーム解析を足掛かりとした線維増殖の発症進展機構の解明と治療法開発を目指した研究を行ってきた。線維増殖に関与する遺伝子群を抽出した結果、ペリオスチン、テネイシン C 等のマトリセルラー蛋白や、上皮間葉転換 (EMT; Epithelial-Mesenchymal Transition) に関与する分子群が病態形成に重要であることを見いだした (Ishikawa K, et al. FASEB J. 2014, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015)。眼内線維増殖の主要細胞である網膜色素上皮 (RPE) は、正常では細胞間接着が密な状態であるが、外部からの刺激などにより、細胞間接着が失われると、形質転換の過程である EMT を経て線維芽細胞様に形質転換し、細胞の増殖、遊走、細胞外マトリクス産生能を獲得する。EMT は線維増殖に必須の最初のプロセスであるといえる。

### 2. 研究の目的

これまでの研究成果から、EMT を標的とした治療により線維増殖を制御できる可能性があることが示唆された。また、SMAD シグナリングが眼内線維増殖における EMT において重要であることが明らかになったため、同シグナル阻害剤を最初の治療薬候補とする研究を計画した。いったん形成された線維組織を退縮させる (除去する) 方策は手術治療以外に無いことより、線維増殖を予測し、予防的に治療を行うことが重要である。以上より、眼内線維増殖に対する形質転換を標的とした眼内線維増殖の予防的治療戦略の構築を目的とした研究を行う着想に至った。これまでの申請者らの研究で明らかにした線維増殖特異的分泌タンパクである、ペリオスチン、テネイシン C が線維増殖予測バイオマーカーとなりうると思われる。

### 3. 研究の方法

1. EMT 阻害剤の眼内薬物動態、薬効、安全性
2. 患者眼内液中の線維増殖予測バイオマーカー

1: 培養ヒト RPE 細胞を用いて、各薬剤を異なる濃度で投与し、Realtime-RT PCR 法で EMT 関連マーカーである、alpha-SMA, E-cadherin, Zo-1, SNAIL の発現を評価し薬剤のスクリーニングを行う。また、細胞増殖、遊走、細胞外マトリクス産生能 (コラーゲン、フィブロネクチン) への影響を評価し、至適濃度を決定する。

申請者は、マウスレーザー誘導性脈絡膜新生血管モデルの晩期で網膜下線維性瘢痕が形成され、疾患動物モデルとして有用であることを提示した。同モデルとウサギ PVR (網膜前線維増殖) モデルを用いて in vivo 実験を行う。異なる投与濃度と投与時期でグループ分けし、線維増殖組織形成の評価を OCT、眼底写真で行い、レーザー照射後 35 日目、PVR 誘導後 14 日目に眼球摘出を行い、フラットマウントを作成して免疫染色を行い線維組織中の EMT マーカーの比較検討を行う。

線維増殖抑制効果を認めた濃度で各薬剤を投与し、1 週間、3 週間後に眼球を摘出し、マウス網膜・脈絡膜、ウサギの眼内液 (前房水、硝子体)、網膜を採取し、液体クロマトグラフィー質量分析法を用いて薬物濃度の推移を検討し、初年度の In vitro アッセイにおける至適濃度と参照する。また、薬剤の安全性の評価のために、眼球摘出を行う前に網膜電気生理学的検査 (ERG) を行う。摘出眼球を用いて免疫組織学的に網膜毒性の評価も行う。

2: 我々は、患者線維増殖組織と、増殖性網膜硝子体患者の硝子体内でペリオスチンとテネイシン C が特異的に発現していること、EMT により発現が著明に上昇することを明らかにしている。以上より、ペリオスチンとテネイシン C が線維増殖予測のバイオマーカーとなる可能性を検討する。PDR, AMD 患者に対して、抗 VEGF 薬投与硝子体注射時に眼圧効果目的で前房水 50ul を採取する。ペリオスチンとテネイシン C の濃度を ELISA 法で定量する。各患者の臨床経過を眼底写真、OCT 像で評価して、各分子の濃度との相関を検討する。網膜疾患の合併が無い白内障患者に対する白内障手術の際に前房水を採取し、対照コントロールとする。

#### 4. 研究成果

1: EMT 阻害剤の眼内薬物動態、薬効、安全性  
 様々なシグナル阻害剤を比較検討したところ、ROCK 阻害剤が最も効率的に RPE EMT を抑制可能であることが明らかとなった。

同薬剤は、眼内での半減期が非常に短いことより、長期停留、効果を持続させる必要がある。薬学研究院の松永直哉准教授の研究室と共同で徐放化 DDS を施した薬剤を作成した。

ウサギとマウスの動物モデルに投与したところ、線維組織の形成が少ない注射回数で抑制可能であることを見いだした。また、眼内薬物濃度に関しても徐放化が認められた(特許出願準備中)。

また、薬剤投与後の網膜を免疫組織学的に検討、明らかな形態異常は認めていない。

2: 患者眼内液中の線維増殖予測バイオマーカー  
 増殖糖尿病網膜症(PDR)に伴う晩期の合併症である血管新生緑内障(NVG)における PN と TN の関与について検討した対照群と POAG 群の PN と TN 濃度は全て測定感度以下であった。PN 濃度は NVG 群では PDR 群と比較して有意に高値であった(95.3ng/ml vs 2.2ng/ml; p=0.03)。TN 濃度は NVG 群では PDR 群と比較して高値であったが、有意差は認めなかった。NVG 群の PN と TN の濃度は有意に相関していた(r=0.86, p=0.01)。免疫染色で、PN は線維柱帯の細胞成分に明らかな発現を認めた。以上より PN と TNC-C の発現が PDR に伴う NVG の発症病態に関与している可能性が示唆された。本内容は、下記文献で発表した。

#### 発表文献

Increased expression of periostin and tenascin-C in eyes with neovascular glaucoma secondary to PDR.

Ishikawa K, Kohno RI, Mori K, Murakami Y, Nakao S, Akiyama M, Yoshida S, Sonoda KH. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2020 Mar;258(3):621-628. doi: 10.1007/s00417-019-04574-x. Epub 2019 Dec 20.

図. ROCK 阻害による RPE-EMT 抑制

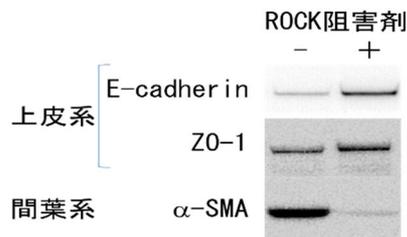
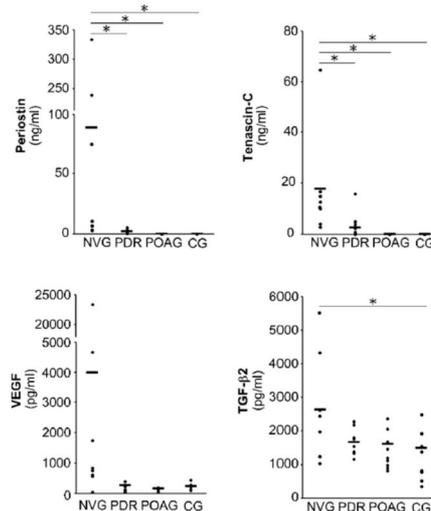


図. PDR-NVG の眼内  
 ペリオスチン、テネシシン C



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zhou Yedi, Yoshida Shigeo, Kubo Yuki, Yoshimura Takeru, Kobayashi Yoshiyuki, Nakama Takahito, Yamaguchi Muneo, Ishikawa Keiji, Oshima Yuji, Ishibashi Tatsuro	4. 巻 15
2. 論文標題 Different distributions of M1 and M2 macrophages in a mouse model of laser-induced choroidal neovascularization	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 3949 ~ 3956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2017.6491	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 Berdasco Maria, Yoshida Shigeo, Nakama Takahito, Ishikawa Keiji, Ishibashi Tatsuro, Boubekeur Amina M et al.	4. 巻 7
2. 論文標題 DNA Methylation Reveals Biological Networks Involved in Human Eye Development, Functions and Associated Disorders	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-12084-1	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 該当する

1. 著者名 Yoshida Shigeo, Nakama Takahito, Ishikawa Keiji, Nakao Shintaro, Sonoda Koh-hei, Ishibashi Tatsuro	4. 巻 74
2. 論文標題 Periostin in vitreoretinal diseases	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 4329 ~ 4337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-017-2651-5	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ishikawa K. et al.
2. 発表標題 An association between RPE disruption and fibrotic scar formation after aflibercept therapy for neovascular age-related macular degeneration
3. 学会等名 2019 ARVO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wada I. et al.
2. 発表標題 ROCK inhibitor Ripasudil reverses phenotype from EMT to MET in subretinal fibrosis
3. 学会等名 2019 ARVO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wada I, Nakao S, Yamaguchi M, Ishikawa K, Yoshida S, Kaizu Y, Isobe T, Kaneko Y, Ishibashi T, Sonoda KH
2. 発表標題 ROCK inhibitor Ripasudil (K-115) suppresses subretinal fibrosis in laser-induced CNV model
3. 学会等名 ARVO, Baltimore, USA, 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018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