

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10901

研究課題名(和文) 眼炎症疾患に対するNF- κ B 分子特異的眼局所療法の開発研究課題名(英文) Anti-inflammatory effects of Novel NF- κ B inhibitor, DHMEQ on in vitro and in vivo model of ocular inflammation

研究代表者

岡田 アナベル・あやめ (Okada, Annabelle Ayame)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：50303962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではnuclear factor-kappa B(NF- κ B)に注目し、眼炎症疾患におけるNF- κ Bを標的とした新たな治療法の開発を目的に新規低分子NF- κ B 阻害剤DHMEQによる網膜色素上皮細胞株への抗炎症効果の検討を行ったところ、接着分子(ICAM-1)、IL-8やMCP-1などの発現がDHMEQを加えることにより有意に抑制された。実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)に対するDHMEQの眼局所投与の有効性を検討したところ、有意な抑制効果は観察されなかった。本結果からぶどう膜炎におけるDHMEQの有用性が示唆されたものの、その投与経路、投与量については今後さらなる検討を要する。

研究成果の概要(英文)：Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) is a novel nuclear factor (NF)- κ B inhibitor. We investigated whether DHMEQ can modulate the proinflammatory cytokine induced expression of intracellular adhesion molecule (ICAM)-1 and chemokines in a human retinal pigment epithelial (RPE) cell line (ARPE-19). In addition, we investigated whether intravitreal injection of DHMEQ was effective for suppression of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). DHMEQ effectively down-regulated the expression of ICAM-1 in TNF-alpha stimulated ARPE-19 cells. Furthermore, DHMEQ suppressed the production of both IL-8 and MCP-1. However, there was no significant difference in EAU clinical score between control eyes and DHMEQ-treated eyes in EAU-induced rats. These results suggest that DHMEQ may play a role in reducing ICAM-1 and chemokine mediated inflammatory disorders in the eye, however further study is warranted for clinical application of DHMEQ for autoimmune uveitis.

研究分野：眼科学

キーワード：眼炎症

1. 研究開始当初の背景

Nuclear factor-kappa B (NF-κB)は種々の炎症刺激により活性化されて核内に移行する転写因子であり、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、接着分子などの炎症関連遺伝子群の発現を誘導する(Nat Rev Immunol 2008)。そのため炎症の関連する様々な疾患の進展にNF-κB が重要な役割を果たしており、この分子の制御が新しい治療法へと繋がるのが期待される。近年、梅澤らによって発見された低分子NF-κB 阻害剤である DHMEQ

(dehydroxymethylepoxyquinomicin)はNF-κB 分子の核内移行を選択的に阻害する低分子化合物として知られ新たな癌治療薬、抗炎症薬として注目を集めている。我々はヒト角膜から樹立した角膜線維芽細胞の primary cultureを用いて、DHMEQ の炎症制御作用について研究を行い、炎症性接着分子として知られるICAM-1(CD54)の発現やMCP-1などのケモカインの発現がDHMEQ の存在下で培養したところ、これらの発現が有意に低下することを報告した(Graefe ' S Archive Clinical Exp Ophthalmol 2015)。

2. 研究の目的

本研究課題では難治性眼炎症疾患に対するNF-κB 分子特異的な眼局所療法の開発を目的としてNF-κB 阻害剤

DHMEQ(dehydroxymethyl-epoxyquinomicin)の硝子体内投与による実験的自己免疫性ぶどう膜炎網膜炎(EAU)の抑制効果の検討、および、DHMEQ による網膜色素上皮細胞株(ARPE-19)に対する細胞毒性、炎症関連接着分子、およびケモカイン産生の抑制効果の検討、副腎皮質ステロイド薬との比較を行った。

3. 研究の方法

(1) DHMEQ の硝子体投与による EAU の抑制効果の検討

ルイスラットにEAUを誘導、ぶどう膜炎の炎症初期となる免疫10日目にDHMEQ、および基剤を硝子体内に投与、その後2日おきに細隙灯顕微鏡を用いて前眼部の炎症所見をスコアリングし、DHMEQの有効性を検討した。

(2) DHMEQ による網膜色素上皮細胞株(ARPE-19)を用いた抗炎症効果の検討

DHMEQ による網膜色素上皮細胞株に対する細胞毒性の検討

ARPE-19 の培養時に DHMEQ を加えて MTS bioassay を行い、DHMEQ の濃度の違いによる ARPE-19 への細胞毒性について評価した。

炎症関連接着分子の発現抑制効果の検討

ARPE-19 を TNF-a を用いて刺激培養行い、DHMEQ を加えた群と加えていない群で代表的な炎症関連接着分子である ICAM-1 の発現の違いをフローサイトメーターを用いて検討した。

ケモカイン産生の抑制効果の検討

ARPE-19 を TNF-a を用いて刺激培養行い、DHMEQ を加えた群と加えていない群で培養上製中の IL-8 や MCP-1 の発現の違いを ELISA 法にて検討した。

副腎皮質ステロイド薬との比較検討

DHMEQ と副腎皮質ステロイド薬との炎症抑制効果を比較するためDHMEQと同一濃度のステロイド(デキサメサゾン)を加え、DHMEQ との違いについて検討した。

4. 研究成果

(1) DHMEQ の硝子体による EAU の抑制効果の検討

免疫後10日目から両群においてEAUが発症、免疫後14日目までEAUの進行が観察され、16日目以降EAUは軽快した。免疫10日目にDHMEQ、および基剤を硝子体内に投与し、免疫後12、14、16日目でEAUスコアを比較したところ両群間に有意差は認められなかった。

(2) DHMEQ による網膜色素上皮細胞株(ARPE-19)を用いた抗炎症効果の検討

ARPE-19 に DHMEQ を加えて培養を行ったところ 100 ug/ml の濃度において著名な細胞増殖抑制効果がみられ、さらに著名なアポトーシス誘導効果も認められた。

また ARPE-19 を TNF-a 単独で刺激した群と比較し、DHMEQ を付加した群において、ICAM-1 の発現、IL-8、MCP-1 の産生が有意に抑制された。デキサメサゾンと同濃度で比較した場合でも、DHMEQ のほうが DEX より強力に ICAM-1 やケモカイン産生を抑制した。

以上より DHMEQ の硝子体内投与でのぶどう膜炎に対する抑制効果はみられなかったも

の、invitroにおける網膜色素上皮細胞培養株において強力な抗炎症効果が確認された。これらの結果よりDHMEQの眼炎症疾患に対する有用性が示唆されたものの、その投与経路、投与量については今後さらなる検討を要する。

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16件)

1. Jabs DA, Dick A, Doucette JT, Gupta A, Lightman S, McCluskey P, Okada AA, Palestine AG, Rosenbaum JT, Saleem SM, Thorne J, Trusko B; Standardization of Uveitis Nomenclature Working Group. Interobserver Agreement Among Uveitis Experts on Uveitic Diagnoses: The Standardization of Uveitis Nomenclature Experience. *Am J Ophthalmol*. 186:19-24, 2018. doi: 10.1016/j.ajo.2017.10.028. (査読あり)
2. Acharya NR, Browne EN, Rao N, Mochizuki M for the International Sarcoidosis Working Group (including AA Okada): Distinguishing features of ocular sarcoidosis in an international cohort of uveitis patients. *Ophthalmology* 125:119-126, 2018. doi: 10.1016/j.ophtha.2017.07.006. (査読あり)
3. 蕪城俊克、岡田アナベルあやめ: 眼炎症性疾患(ぶどう膜炎, 強膜炎など). *あたらしい眼科*. 35:63-68, 2018. doi:なし (査読なし)
4. Cunningham ET Jr, Tugal-Tutkun I, Khairallah M, Okada AA, Bodaghi B, Zierhut M. Behçet Uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 25:2-6, 2017. doi: 10.1080/09273948.2017.1279840. (査読あり)
5. 岡田アナベルあやめ, 蕪城俊克: 生物学的製剤の時代における非感染性ぶどう膜炎の治療戦略. *あたらしい眼科*. 34:461-462, 2017. doi:なし (査読なし)
6. 岡田アナベルあやめ. 非感染性ぶどう膜炎に新たな生物学製剤が承認. *日本眼科学会雑誌* 121:3-5, 2017. doi:なし (査読なし)
7. Keino H, Okada AA, Watanabe T, Nakayama M, Nakamura T. Efficacy of Infliximab for Early Remission Induction in Refractory Uveoretinitis Associated with Behçet Disease: A 2-year Follow-up Study. *Ocul Immunol Inflamm*. 25:46-51, 2017. doi: 10.1080/09273948.2016.1239746. (査読あり)
8. Keino H, Watanabe T, Taki W, Nakayama M, Nakamura T, Yan K, Okada AA. Clinical features of uveitis in children and adolescents at a tertiary referral centre in Tokyo. *Br J Ophthalmol*. 101:406-410, 2017. doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-308194. (査読あり)
9. Higashi K, Meguro A, Takeuchi M, Yamane T, Kitaichi N, Horie Y, Namba K, Ohno S, Nakao K, Sakamoto T, Sakai T, Tsuneoka H, Keino H, Okada AA, Takeda A, Fukuhara T, Mashimo H, Ohguro N, Oono S, Enaida H, Okinami S, Mizuki N. Investigation of the association between IL10 gene polymorphisms and Vogt-Koyanagi-Harada disease in a Japanese population. *Ophthalmic Genet*. 38:187-89, 2017. doi: 10.3109/13816810.2016.1145698. (査読あり)
10. Keino H, Okada AA, Watanabe T, Echizen N, Inoue M, Takayama N, Nagane M. Spectral-domain Optical Coherence Tomography Patterns in Intraocular Lymphoma. *Ocul Immunol Inflamm*. 24:268-73, 2016. doi: 10.3109/09273948.2014.1002568. (査読あり)
11. Watanabe T, Keino H, Kudo A, Sato Y, Okada AA. MicroRNAs in retina during development of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Br J Ophthalmol*. 100:425-431, 2016. doi:10.1136/bjophthalmol-2015-30692. (査読あり)
12. 渡邊交世、慶野博、宮東昭彦、佐藤泰彦、岡田アナベルあやめ. 外国誌要覧 実験的自己免疫性ぶどう膜炎における眼局所のmicroRNAの発現. *日本眼科学会雑誌*. 120:465, 2016. doi:なし. (査読なし)

13. Inokawa S, Watanabe T, Keino H, Sato Y, Hirakata A, Okada AA, Fukuda K, Fukushima A, Umezawa K. Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel nuclear factor- B inhibitor, reduces chemokines and adhesion molecule expression induced by IL-1 in human corneal fibroblasts. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 253:557-563, 2015. doi: 10.1007/s00417-014-2879-9. (査読あり)
14. Keino H, Watanabe T, Sato Y, Shudo K, Kitaoka Y, Harada T, Okada AA. Retinoic acid receptor stimulation ameliorates experimental autoimmune optic neuritis. *Clin Experiment Ophthalmol*. 43:558-567, 2015. doi: 10.1111/ceo.12308. (査読あり)
15. 肥留川京子、慶野博、渡邊交世、瀧和歌子、平形明人、岡田アナベルあやめ 網膜動静脈閉塞症に対してステロイドパルス療法が奏効したSLE網膜症の1例(原著論文/症例報告) あたらしい眼科 32:904-908, 2015. doi:なし(査読あり)
16. Takase H, Okada AA, Goto H, Mizuki N, Namba K, Ohguro N, Sonoda KH, Tomita M, Keino H, Kezuka T, Kubono R, Mizuuchi K, Shibuya E, Takahashi H, Yanai R, Mochizuki M. Development and validation of new diagnostic criteria for acute retinal necrosis. *Jpn J Ophthalmol*. 59:14-20, 2015. doi: 10.1007/s10384-014-0362-0. (査読あり)
- [学会発表](計23件)
1. 中山真紀子、慶野博、高橋あずさ、津田麻祐子、渡邊交世、岡田アナベルあやめ: サイトメガロウイルス網膜炎における視神経乳頭部血流の評価. 第71回日本臨床眼科学会, 東京, 2017年10月12日-10月15日.
2. 安藤良将、慶野博、中山真紀子、安藤良将、渡邊交世、岡田アナベルあやめ: 杏林アイセンターにおける後部強膜炎の臨床像の検討. 第51回日本眼炎症学会, 大阪, 2017年7月14日-7月16日.
3. 中山真紀子、慶野博、安藤良将、渡邊交世、岡田アナベルあやめ: 超広角眼底撮影による原田病急性期の眼底造影所見の検討. 第51回日本眼炎症学会, 大阪, 2017年7月14日-7月16日.
4. 山田健司、慶野博、柳沼重晴、渡辺敏樹、岡田アナベルあやめ: 眼部帯状ヘルペス発症後に脈絡膜の斑状脱色素と菲薄化を生じた一例. 第9回東京多摩眼科連携セミナー, 東京, 2017年4月15日.
5. 安藤良将、慶野博、宮東昭彦、梅澤一夫、岡田アナベルあやめ: エンドトキシン誘導ぶどう膜炎に対する NF- κ B阻害剤 DHMEQ の抗炎症効果の検討. 第121回日本眼科学会総会, 東京, 2017年4月6日-4月9日.
6. 中山真紀子、慶野博、渡邊交世、岡田アナベルあやめ: AZOORにおける眼底自発蛍光の検討. 第70回日本臨床眼科学会, 京都, 2016年11月3日-11月6日.
7. Nakayama M, Keino H, Watanabe T, Okada AA: Clinical features and visual outcomes of patients with acute new-onset Vogt-Koyanagi-Harada disease at a tertiary center in Tokyo. International Uveitis Society Group (IUSG), Dublin, Ireland, April 18th-21th, 2016.
8. Keino H, Okada AA, Watanabe T, Nakayama M: Maintained remission of uveoretinitis associated with Behcet's disease after discontinuation of successful infliximab therapy. International Uveitis Society Group (IUSG), Dublin, Ireland, April 18th-21th, 2016.
9. 慶野博、中山真紀子、厚東隆、渡邊交世、岡田アナベルあやめ: レーザースペックル法にて視神経乳頭部血流を観察できた急性網膜壊死の1例. 第33回日本眼循環学会, 福岡, 2016年7月22日-7月24日.
10. 中山真紀子、慶野博、渡邊交世、岡田アナベルあやめ 原田病初発例 123例の臨床経過の検討. 第50回日本眼炎症学会, 東京, 2016年7月2日-7月3日.
11. Keino H, Nakayama N, Watanabe T, Koto T, Okada AA: Compromised optic nerve head blood flow in acute retinal necrosis. ARVO Imaging Conference, Seattle, USA. April 30th, 2016.
12. 中山真紀子、慶野博、渡邊交世、福岡利仁、駒形嘉紀、有村義宏、岡田アナベルあやめ: ベーチェットぶどう膜網膜炎にお

- けるインフリキシマブ中止後の眼炎症活動性の評価. 第 120 回日本眼科学会総会, 仙台, 2016 年 4 月 7 日-4 月 10 日.
13. 慶野博, 中山真紀子, 渡邊交世, 中村友子, 岡田アナベルあやめ: 原田病初発例における中心窩下脈絡膜厚の長期経過. 第 69 回日本臨床眼科学会, 名古屋市, 2015 年 10 月 23 日-10 月 25 日.
 14. 中山真紀子, 山本亜希子, 慶野博, 渡邊交世, 中村友子, 眞鍋歩, 岡田アナベルあやめ: 点状脈絡膜内層症の臨床的特徴および予後. 第 69 回日本臨床眼科学会, 名古屋市, 2015 年 10 月 23 日-10 月 25 日.
 15. 津田麻祐子, 中山真紀子, 慶野博, 渡邊交世, 岡田アナベルあやめ, 平形明人: サイトメガロウイルス網膜炎の発症を機に HIV 陽性と診断された 2 症例. 第 58 回東京多摩地区眼科集談会, 三鷹市, 2015 年 10 月 17 日.
 16. Keino H, Watanabe T, Nakayama M, Nakamura T, Okada AA: Efficacy of infliximab for early remission induction in refractory uveoretinitis associated with Behcet's disease. Third International Assembly of Ocular Inflammation Societies, San Francisco, USA, September 25th-27th, 2015.
 17. Watanabe T, Keino H, Taki W, Nakayama M, Nakamura T, Okada AA: Clinical features of uveitis in children and adolescents at a tertiary center in Tokyo. Congress of the International Ocular Inflammation Society, Third International Assembly of Ocular Inflammation Societies, San Francisco, USA, September 25th-27th, 2015.
 18. 中山真紀子, 慶野博, 渡邊交世, 井上真, 岡田アナベルあやめ: 硝子体手術後に発症した ANCA 陽性強膜炎の 1 例. 第 49 回日本眼炎症学会, 大阪, 2015 年 7 月 10 日-7 月 12 日.
 19. 中村友子, 慶野博, 眞鍋歩, 中山真紀子, 渡邊交世, 林篤志, 岡田アナベルあやめ: 妊娠 16 週に発症しトリアムシノロンアセトニドテノン嚢下注射で治療した原田病の 1 例. 第 49 回日本眼炎症学会, 大阪, 2015 年 7 月 10 日-7 月 12 日.
 20. Keino H, Sato Y, Okada AA: Capability of vitreous fluid to enhance TGF- β -induced Foxp3⁺ regulatory T cell conversion. Denver, USA, May 3rd-7th, 2015.
 21. 慶野博, 渡邊交世, 中山真紀子, 岡田アナベルあやめ: 罹病期間別でみたインフリキシマブ導入後のベーチェット病ぶどう膜炎の活動性評価. 第 119 回日本眼科学会総会, 札幌市, 2015 年 4 月 16 日-19 日.
 22. 渡邊交世, 肥留川京子, 慶野博, 瀧和歌子, 越前成旭, 岡田アナベルあやめ: 糖尿病虹彩炎を発症した患者の臨床的特徴についての検討. 第 48 回日本眼炎症学会, 東京, 2014 年 7 月 4 日.
 23. Watanabe T, Keino H, Taki W, Echizen N, Okada AA: Efficacy of infliximab in two young patients with Behcet's disease. World Ophthalmology Congress® of the international council of ophthalmology, Tokyo, April 2nd-6th, 2014.
- 〔図書〕(計 1 件)
平形明人, 岡田アナベルあやめ, 山田昌和, 井上真 (編集): 全身病の眼病変: 早わかり便利帖. メジカルビュー社, 東京, 2018.
- 〔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

(1)研究代表者

岡田 アナベルあやめ (Okada, Annabelle
Ayame)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：50303962

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

中山 真紀子 (Nakayama, Makiko)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：30736278

慶野 博 (Keino, Hiroshi)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：90328211

(4)研究協力者

()