

令和元年6月17日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11307

研究課題名(和文) Fuchs角膜内皮ジストロフィの病態生理における小胞体ストレス応答の意義

研究課題名(英文) Involvement of endoplasmic reticulum stress in the pathophysiology of Fuchs endothelial corneal dystrophy

研究代表者

小泉 範子 (Koizumi, Noriko)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：20373087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：フックス角膜内皮ジストロフィ(FECD)は進行性に角膜内皮細胞が障害され重症の視力障害を生じる難治性疾患である。唯一の治療法は角膜移植であり薬物治療の開発が望まれる。本研究ではFECDの病態における小胞体ストレスの関与を解明し、新規治療法の開発のための基礎的知見を得た。FECD患者の角膜組織には変性たんぱく質が過剰に蓄積されており、これらの変性たんぱく質が小胞体ストレス応答を介して角膜内皮細胞の細胞死を誘導することを明らかにした。さらにTGF- β シグナル阻害などによる小胞体ストレスの制御がFECDの新規治療法となる可能性を示すとともに、cell-basedの薬物スクリーニング系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FECDの病態の詳細は不明であり薬物療法は存在せず、現在の治療法は角膜移植のみである。本研究によってFECDの病態が解明され、保存的治療法によって角膜内皮障害の進行を遅らせることができれば、多くの患者が生涯にわたって角膜移植を行わず良好な視力を維持することができる。また、角膜移植に代わる点眼治療薬の開発は、患者の身体的・経済的負担を軽減するのみならず、医療費削減、ドナー角膜の有効利用につながり、社会福祉に貢献する極めて重要性の高い研究である。

研究成果の概要(英文)：Fuchs endothelial corneal dystrophy (FECD) is a bilateral, progressive corneal endothelial disease. Corneal transplantation is the only current treatment option, though a pharmaceutical therapy has been anticipated. In this study, we showed that unfolded protein accumulates in the endoplasmic reticulum (ER) of corneal endothelial cells in FECD patients, and that unfolded protein progressively induces corneal endothelial cell (CEC) death via ER stress. We also showed the possibility of a pharmaceutical treatment of FECD by preventing the ER stress and apoptosis of CECs by using transforming growth factor beta (TGF- β) signaling inhibitors.

研究分野：眼科学・医工学

キーワード：Fuchs角膜内皮ジストロフィ 小胞体ストレス 角膜内皮障害 薬物治療 TGF- β シグナル

1. 研究開始当初の背景

Fuchs 角膜内皮ジストロフィ（以下、FECD）は両眼性、進行性の角膜内皮疾患であり、欧米人では 40 歳以上の 4-5%が罹患する角膜疾患で最も高頻度な遺伝性疾患である。一方で、病態の詳細は不明であり薬物療法は存在せず、水疱症角膜症に至ると角膜移植が行われる。実際に米国の角膜内皮移植の約 63%が FECD に対して行われている。

研究代表者らはこれまでに FECD の病態解明を目的に、FECD 患者由来の疾患モデル細胞を樹立した。さらに、FECD では角膜内皮障害とともに、I 型コラーゲンやフィブロネクチンなどの異常な細胞外マトリクス（ECM）が角膜内皮下に沈着することが知られているが、本疾患モデル細胞を用いた研究により、生体同様に FECD 角膜内皮細胞は ECM を過剰に産生することを報告した（Okumura N, et al. Lab Invest 2015）。また、上皮間葉系移行を制御する遺伝子である Snail1、ZEB1 が高く発現することにより、TGF- β に高い反応性を示して ECM を産生し、小胞体ストレス応答を生じることを見出した。これらの知見をもとに、FECD 患者の角膜内皮において遺伝的背景が TGF- β への高い反応性を生じ、ECM の過剰産生が **unfolded protein** の蓄積をきたし、小胞体ストレスを介した細胞障害に繋がるという独創的な仮説を着想するに至った。

2. 研究の目的

角膜移植以外に治療法がない難治性角膜疾患である水疱性角膜症の病態を解明し、発症予防と新規治療法の開発のための基礎的知見を得ることを目的とする。本研究では、FECD の病態について、「FECD 患者の角膜内皮において ECM が過剰産生されることにより、**unfolded protein** の蓄積をきたし、小胞体ストレスを介した細胞障害に繋がる」という研究代表者らの仮説の妥当性を検証するために、下記の検討を行った。

- (1) FECD 患者角膜内皮において **unfolded protein** が過剰に発現し凝集しているかについて、患者組織を用いて明らかにする。
- (2) FECD において **unfolded protein** が小胞体ストレス応答を介した細胞障害を誘導しているかについて、疾患モデル細胞を用いて明らかにする。
- (3) TGF- β シグナルの活性化が FECD の治療ターゲットになりうるかについて、疾患モデル細胞、モデルマウスを用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) FECD 患者角膜内皮における **unfolded protein** の発現解析

FECD 患者組織において I 型コラーゲンやフィブロネクチンなどの ECM が過剰に産生され角膜内皮下に沈着することは、臨床的、病理学的に広く知られている。本研究では、FECD 角膜内皮において過剰に産生される ECM が **unfolded protein** の過剰産生を生じているのかについて検討した。角膜内皮移植時に採取された FECD 患者の角膜内皮および基底膜の免疫染色を行い、不要なタンパク質の細胞内凝集体である **aggresome** を染色し **unfolded protein** の細胞内での過剰な蓄積の有無を検討した。さらに、I 型コラーゲン、フィブロネクチンなどの ECM および、小胞体のマーカーである PDI との多重染色を行い、**unfolded protein** の構成成分、局在の検討を行った。さらに電子顕微鏡を用いて、小胞体、ミトコンドリアの形態変化について検討した。

(2) FECD における小胞体ストレス応答およびミトコンドリア機能障害の検討

研究代表者らが樹立した FECD 疾患モデル細胞を用いて **unfolded protein** の蓄積による角膜内皮細胞の小胞体ストレス応答を検討した。我々はこれまでに、FECD 疾患モデル細胞が、TGF- β に対して感受性が高く、Snail1、ZEB1 遺伝子の発現亢進を介して、正常者由来の細胞と比較して大量の ECM を産生することを報告している。本研究では、大量に産生される ECM が **unfolded protein** の蓄積を生じているか、小胞体ストレスを来すのかについて検討した。具体的には、**aggresome** と ECM の多重免疫染色、フローサイトメトリー、電子顕微鏡による解析を行い **unfolded protein** の蓄積を評価した。また、小胞体ストレス応答について、ストレスセンサーおよびシャペロンの発現をウエスタンブロッティングにより検討した。疾患モデル細胞を用いて、**unfolded protein** の蓄積がミトコンドリア障害を生じるかを、フローサイトメトリーによるミトコンドリア膜電位の測定、シトクローム c の放出、Bcl2 ファミリーのウエスタンブロッティングによる発現解析などを指標に検討した。

(3) TGF- β シグナル阻害による角膜内皮細胞障害の抑制効果の検討

疾患モデル細胞およびマウスモデルを用いて、TGF- β シグナル阻害が、**unfolded protein** および小胞体ストレスを抑制することで、角膜内皮細胞障害の治療が可能となるかについて検討した。

4. 研究成果

(1) FECD 患者角膜内皮における **unfolded protein** の発現解析

患者組織を用いた免疫組織学的検討により、FECD 患者の角膜内皮組織には **unfolded protein** が過剰に蓄積されていること、角膜内皮に蓄積した **aggresome** は I 型コラーゲン

やフィブロネクチンなどの ECM タンパク質であり、小胞体に局在することが明らかとなった。また電子顕微鏡による観察により、FECD 患者の角膜内皮細胞には小胞体の形態異常が見られることを示した。これらの結果より、FECD 患者の角膜内皮では、過剰な細胞外マトリックス (ECM) の産生が unfolded protein の小胞体への蓄積による小胞体ストレス応答の原因となっていることが示唆された。これらの検討は角膜内皮移植の権威であるドイツエルランゲン大学の Friedrich Kruse 教授およびカーディフ大学の Andrew J. Quantock 教授との共同研究として行った。

(2) FECD における小胞体ストレス応答およびミトコンドリア機能障害の検討

正常ドナー角膜由来の不死化角膜内皮細胞にタブシガルギンを添加して小胞体ストレスを誘導すると、小胞体ストレスセンサーである ATF6 α 、PERK、IRE1 α が活性化され、CHOP の発現亢進、ミトコンドリア膜電位の低下、Bcl-2 の減少、caspase 9 の発現の増加、caspase 3 の活性化が認められた。さらに siRNA を用いて CHOP をノックダウンすると、ミトコンドリア膜電位、Bcl-2、caspase 9 の変化が認められなくなった。また、FECD 患者由来の疾患モデル細胞においても、TGF- β の添加により小胞体における unfolded protein の蓄積が生じ、上記の小胞体ストレスセンサーが活性化した。また、小胞体ストレスセンサーの中でも PERK が p38 MAPK シグナルを介して CHOP を誘導し、ミトコンドリア経路 (intrinsic pathway) によるアポトーシスを引き起こすことが明らかとなった。本研究により、FECD では小胞体ストレスにより CHOP を介してミトコンドリア経路が活性化され、それによって角膜内皮細胞のアポトーシスが誘導されることが示された。

(3) TGF- β シグナル阻害による角膜内皮細胞障害の抑制効果の検討

FECD 疾患モデル細胞において、TGF- β 受容体阻害剤や siRNA など複数の方法によって TGF- β シグナルを阻害すると、過剰な ECM 産生を抑制し unfolded protein の凝集が抑制され、小胞体ストレス応答を介する角膜内皮細胞障害が抑制された。これらの知見は、現在はドナー角膜組織を用いた角膜移植しか治療法のない疾患である FECD に対して、点眼薬による治療の可能性を示す社会的意義の高いものであり、論文発表とともにプレスリリースを行って研究成果を社会に発信した。また、疾患モデル細胞を用いた cell-based の FECD 治療薬スクリーニング系を確立した。また、疾患モデル細胞を用いた in vitro の検討で効果が認められた化合物に関して、疾患モデルマウスを用いた in vivo の検討を開始した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Okumura N, Hayashi R, Koizumi N. Perspective of Future Potent Therapies for Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Open Ophthalmol J*. 2018 Jul 23;12:154-163. doi: 10.2174/1874364101812010154. eCollection 2018. (査読あり)
2. Okumura N, Hashimoto K, Kitahara M, Okuda H, Ueda E, Watanabe K, Nakahara M, Sato T, Kinoshita S, Tourtas T, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE, Koizumi N. Activation of TGF- β signaling induces cell death via the unfolded protein response in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Sci Rep*. 2017 Jul 28;7(1):6801. doi: 10.1038/s41598-017-06924-3. (査読あり)
3. Okumura N, Kitahara M, Okuda H, Hashimoto K, Ueda E, Nakahara M, Kinoshita S, Young RD, Quantock AJ, Tourtas T, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE, Koizumi N. Sustained Activation of the Unfolded Protein Response Induces Cell Death in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 Jul 1;58(9):3697-3707. doi: 10.1167/iovs.16-21023. (査読あり)
4. Okumura N, Fujii K, Kagami T, Makiko N, Kitahara M, Kinoshita S, Koizumi N. Activation of the Rho/Rho kinase signaling pathway is involved in cell death of corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1;57(15):6843-6851,2016. doi: 10.1167/iovs.16-20123. (査読あり)

[学会発表] (計 15 件)

1. 中川理咲子, 奥村直毅, 大西貴子, 大嶋剛史, 上田江美, 渡辺恭子, 小泉範子: 薬剤スクリーニングによるフックス角膜内皮ジストロフィの治療薬の探索. 角膜カンファランス 2019 第 43 回日本角膜学会総会・第 35 回日本角膜移植学会, 京都, 2019.2.8.
2. 松本紗季, 奥村直毅, 奥田浩和, Robert D. Young, Quantock AJ, 小泉範子: 角膜内皮細胞の小胞体ストレス応答における mitochondria-associated ER membranes の関与. 角膜カンファランス 2019 第 43 回日本角膜学会総会・第 35 回日本角膜移植学会, 京都, 2019.2.7.
3. Matsumoto S, Okumura N, Okuda H, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE, Young RD, Quantock AJ, Koizumi N: Involvement of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane in the pathophysiology of Fuchs endothelial corneal dystrophy. The 11th Joint Meeting of Japan-China-Korea Ophthalmologists, Fukuoka, Japan, 2018.12.1.
4. Oshima T, Okumura N, Onishi T, Ueda E, Watanabe K, Tourtas T, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE, Koizumi N: Establishment of a drug screening system for Fuchs endothelial corneal

- dystrophy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2018, Honolulu, Hawaii, USA, 2018.4.30. (ARVO2018 Travel Grant 受賞)
5. 小泉範子: 再生医療と創薬で角膜内皮治療の未来を切り拓く. 第14回滋賀県眼科治療フォーラム, 大津, 2018.2.10. (招待講演)
 6. 小泉範子: 角膜内皮治療の最前線. 北海道眼科医会北海道ブロック講習会, 札幌, 2017.12.9. (招待講演)
 7. 小泉範子: 基礎から臨床へ 角膜内皮トランスレーショナル研究. 第46回関西医科大学眼科同窓会春の勉強会, 大阪, 2017.5.14. (招待講演)
 8. 大西貴子, 奥村直毅, 上田江美, 渡辺恭子, Tourtas Theofilos, Schlotzer-Schrehardt Ursula, Kruse Friedrich E., 小泉範子: Fuchs 角膜内皮ジストロフィの治療薬開発を目指した薬剤スクリーニング法の確立. 角膜カンファレンス 2018 第42回日本角膜学会総会・第34回日本角膜移植学会, 広島, 2018.2.15.
 9. 奥田浩和, 奥村直毅, 松本紗季, Young Robert D, Quantock Andrew J, 小泉範子: Fuchs 角膜内皮ジストロフィにおける mitochondria-associated membranes の病態への関与. 角膜カンファレンス 2018 第42回日本角膜学会総会・第34回日本角膜移植学会, 広島, 2018.2.15.
 10. Onishi T, Okumura N, Hashimoto K, Koizumi N: Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase pathway in Fuchs endothelial corneal dystrophy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017, Baltimore, USA, 2017.5.10.
 11. Okumura N, Hashimoto K, Okuda H, Ueda E, Tourtas T, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE, Koizumi N: Feasibility of TGF- β inhibition for the treatment of Fuchs endothelial corneal dystrophy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017, Baltimore, USA, 2017.5.8.
 12. Endo M, Okumura N, Tourtas T, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE, Koizumi N: Feasibility of caspase inhibitor to treat Fuchs endothelial corneal dystrophy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017, Baltimore, USA, 2017.5.8.
 13. Okuda H, Okumura N, Kitahara M, Hashimoto K, Koizumi N: Activation of an intrinsic pathway by endoplasmic reticulum stress in corneal endothelial cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017, Baltimore, USA, 2017.5.8.
 14. Onishi T, Okumura N, Kusakabe A, Kitahara M, Hashimoto K, Nakahara M, Ueda E, Tourtas T, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse F, Koizumi N: p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor suppresses apoptosis in a Fuchs endothelial corneal dystrophy cellular model. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2016, Seattle, USA, 2016.5.4.
 15. Okumura N, Hashimoto K, Kitahara M, Nakahara M, Kinoshita S, Tourtas T, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse F, Koizumi N: Unfolded protein accumulation induced endoplasmic reticulum stress of corneal endothelial cells in Fuchs endothelial corneal dystrophy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2016, Seattle, USA, 2016.5.3.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計6件)

名称: カスパーゼ阻害活性を有する化合物, これらの化合物を含む, 角膜内皮の症状, 障害または疾患を治療または予防するための医薬およびその応用

発明者: 小泉範子, 奥村直毅

権利者: 学校法人同志社

種類: 特許

番号: PCT/JP2018/22945

出願年: 2018年

国内外の別: 国外

名称: TGF- β 阻害剤の新規スクリーニング法

発明者: 小泉範子, 奥村直毅

権利者: 学校法人同志社

種類: 特許

番号: PCT/JP2018/22944

出願年: 2018年

国内外の別: 国外

名称: mTOR インヒビターを含む, 眼の症状, 障害または疾患を治療または予防するための医薬およびその応用

発明者: 小泉範子, 奥村直毅

権利者: 学校法人同志社

種類: 特許

番号: PCT/JP2018/22942

出願年: 2018年

国内外の別：国外

名称：mTOR インヒビターを含む,眼の症状,障害または疾患を治療または予防するための医薬およびその応用

発明者：小泉範子, 奥村直毅

権利者：学校法人同志社

種類：特許

番号：特願 2017-118619

出願年：2017 年

国内外の別：国内

名称：カスパーゼ阻害活性を有する化合物,これらの化合物を含む,角膜内皮の症状,障害または疾患を治療または予防するための医薬およびその応用

発明者：小泉範子, 奥村直毅

権利者：学校法人同志社

種類：特許

番号：特願 2017-118617

出願年：2017 年

国内外の別：国内

名称：TGF- β 阻害剤の新規スクリーニング法

発明者：小泉範子, 奥村直毅

権利者：学校法人同志社

種類：特許

番号：特願 2017-118615

出願年：2017 年

国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：カスパーゼ阻害活性を有する化合物,これらの化合物を含む,角膜内皮の症状,障害または疾患を治療または予防するための医薬およびその応用

発明者：小泉範子, 奥村直毅

権利者：学校法人同志社

種類：特許

番号：第 6273636 号

取得年：2018 年

国内外の別：国内

〔その他〕

新聞記事

1. 奥村直毅, 小泉範子ら：角膜白濁、不要タンパク質が原因 同志社大教授ら解明. 京都新聞, 2017.7.27.
2. 奥村直毅, 小泉範子ら：角膜濁り視力低下「フックス角膜ジストロフィー」同大、治療薬の候補物質発見. 京都新聞, 2017.7.29.
3. 小泉範子ら：角膜白濁する病気 治療薬の候補発見. 朝日新聞, 2017.7.29.

ホームページ

同志社大学ティッシュエンジニアリング研究室 <http://www.tissue-engineering-doshisha.jp/>

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：奥村 直毅

ローマ字氏名：Okumura, Naoki

研究協力者氏名：佐藤 貴彦

ローマ字氏名：Sato, Takahiko

研究協力者氏名：クルーゼ フリードリッヒ

ローマ字氏名：Kruse, Friedrich

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。