

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09450

研究課題名(和文) 増殖組織特徴的遺伝子発現を基盤とした個別化「硝子体内分子切除」治療概念の確立

研究課題名(英文) Development of individualized molecular targeting therapy in the vitreous based on the specific genes in fibrovascular membrane.

研究代表者

吉田 茂生 (Yoshida, Shigeo)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：50363370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ペリオスチン・テネイシンC蛋白複合体によりテネイシンC、ペリオスチンとファイブロネクチン蛋白の存在が確認された。

PDR硝子体液において、ペリオスチン、テネイシンCとファイブロネクチンの間に有意な高い相関関係がみられた。ペリオスチンノックアウトの抑制効果はテネイシンCノックアウトの抑制効果より強く、ダブルノックアウトの抑制効果と同様であった。今回の研究では、血管新生の足場としてペリオスチン、テネイシンC、ファイブロネクチンを含むタンパク質複合体形成が重要であり、さらにペリオスチンがその複合体の形成過程でテネイシンCの結合に重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、極小検体である増殖組織のゲノムワイド遺伝子発現解析に初めて成功した。引き続き、抽出された増殖組織特徴的遺伝子群であるペリオスチン・テネイシンCが眼内増殖組織促進に極めて重要な役割を果たすことを明らかにした今回、ペリオスチン・テネイシンC蛋白複合体の抑制にペリオスチン抑制のみで十分効果的であることがわかった。ペリオスチン、テネイシンCの網膜での発現レベルは低く、ペリオスチンを標的とした分子標的薬を創製できれば、正常網膜にほとんど障害を与えることなく、増殖組織のみを消退させる治療となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found significant correlation between concentrations of PN, TNC and FN in PDR vitreous humor. Interleukin-13 (IL-13) promoted mRNA and protein expression of PN and TNC in human microvascular endothelial cells (HRECs). IL-13 promoted angiogenic functions of HRECs. Single inhibition of PN or TNC and their dual inhibition by siRNA suppressed the up-regulated angiogenic functions. Pathological pre-retinal neovessels of oxygen-induced retinopathy (OIR) mice were attenuated in PN knock-out, TNC knock-out and dual knock-out mice compared to wild-type mice. Both in vitro and in vivo, PN inhibition had a stronger inhibitory effect on angiogenesis compared to TNC inhibition, and had a similar effect to dual inhibition of PN and TNC. Furthermore, PN knock-out mice showed scant TNC expression in pre-retinal neovessels of OIR retinas. Our findings suggest that interaction of PN and TNC facilitates pre-retinal angiogenesis, and PN is an effective therapeutic target for PDR.

研究分野：眼科学

キーワード：糖尿病網膜症 テネイシンC ペリオスチン 分子標的

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

眼内細胞増殖は後天視覚障害の上位を占める糖尿病網膜症(DR)、加齢黄斑変性(AMD)や増殖硝子体網膜症(PVR)などで観察される。これらの増殖性網膜硝子体疾患においては、網膜の上下に生じる線維(血管)増殖組織が主要病態である。これは一種の創傷治癒反応であるが、眼内で過剰におこると難治で、視機能を低下させる。

DRは、全国で年間3,000人以上が失明する視覚障害原因の第2位であり、眼科医療の中で最も重要な疾患の一つとなっている。またAMDも高齢化社会の進展により増加の一途をたどっており、視覚障害原因の第4位であり、DR同様最も重要な眼科疾患の一つとなっている。今後もDR、AMDの患者数は増加すると予想され、よりよい治療法の確立が社会的急務である。

DRは大きく非増殖と増殖網膜症に分類される。増殖糖尿病網膜症(PDR)では血管成分(病的血管新生)と線維成分(線維組織形成)を含む線維血管増殖組織(以下PDR増殖組織)が網膜面上に出現し、その収縮による牽引性網膜剥離が視力低下の原因となる。日本人に多い滲出型AMDでは網膜下に線維血管増殖組織が生じ、視機能が障害される。さらに、PDR、AMDと同様の増殖組織形成は、手術侵襲に伴う術後眼内細胞増殖によるPVRでも認めるが、その分子機序は殆ど不明である。治療は光凝固術や硝子体手術が行われているが、視機能を維持できない症例も多い。近年、AMDやDRの治療に抗血管内皮増殖因子(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、1.薬効が一時的であり、繰り返し注射を必要とする、2.無反応例が存在する、3.増殖組織の"angio-fibrotic switch"による線維化により視機能を増悪させる場合がある、4.長期投与で神経網膜の萎縮性変化を生じる、などの問題点も明らかになってきた。したがって、病態に基づいた新しい"Beyond VEGF治療"が期待される。

近年の抗VEGF薬の眼科臨床応用は、単一の分子標的療法が網膜硝子体疾患の治療に有用であることを呈示した。しかし、抗VEGF薬の増殖組織への効果は限定的である。我々の検証では、増殖組織特徴的遺伝子中にはVEGFシグナル関連遺伝子は皆無であったことから、ペリオスチン・テネイシンC蛋白複合体を標的とした分子標的治療を創製できれば、抗VEGF薬と相乗効果をもたらすことが期待される。

2. 研究の目的

ペリオスチン・テネイシンC蛋白複合体の構成蛋白群を同定し、各分子の相互作用を検証する。さらに、ペリオスチン、テネイシンCの一方あるいは両方の抑制による網膜血管新生抑制効果を定量する。

3. 研究の方法

(1) ペリオスチン・テネイシンC蛋白複合体の質量分析

ヒト培養RPE細胞にペリオスチンを強制発現後にタンデムアフィニティー精製によりペリオスチン・テネイシンC蛋白複合体を単離・精製し、質量分析により構成蛋白群を網羅的に同定した。構成蛋白群に含まれる分子ターゲットをピックアップし、分子標的とした。

(2) 患者サンプルの収集

九州大学において硝子体手術時にPDRに伴う線維血管増殖組織および特異性網膜上膜(iERM)を採取した。同時に各硝子体液も同時に採取した。

(3) In vitro アッセイ系でのペリオスチン/テネイシンC siRNAの細胞増殖能、遊走能、形質転換の抑制効果

培養ヒト網膜血管内皮細胞(HREC)を用いて、IL-13刺激による増殖能、遊走能、管腔形成の亢進に対する、ペリオスチン/テネイシンC siRNAの抑制効果について定量化を行った。管腔形成に関してもマトリゲル上にHRECを培養、IL-13で刺激後管腔形成の面積を画像処理し、ペリオスチン/テネイシンC siRNAの管腔形成抑制効果を定量化した。

(4) In vivo 網膜血管新生モデルでのペリオスチン・テネイシンC阻害効果の評価

ペリオスチン、テネイシンCノックアウトマウスを用いた網膜前血管増殖抑制効果
ワイルドタイプ、ペリオスチン、テネイシンCノックアウトマウスを用いてマウス虚血網膜血管新生モデルを作成する。虚血負荷5日に、網膜前血管増殖抑制効果を定量化した。

4. 研究成果

マトリセルラー蛋白であるペリオスチン・テネイシンCを培養ヒト網膜色素上皮細胞に強制発現後Flag抗体をタンデムアフィニティー精製により用いて抽出し、SDSPAGE、銀染色で確認後、分子量単位で切り出しを行い、蛋白複合体の構成蛋白を質量分析のスクリーニングを行った。ペリオスチン、テネイシンCいずれの強制発現株においても質量分析により各々テネイシンC、ペ

リオスチンとファイブロネクチン蛋白の存在が確認された。免疫沈降法でこれらの関連蛋白結合の再現性を確認できた。

PDR 患者から切除された網膜前線維血管増殖組織から mRNA およびタンパク質発現を検証したところ、ペリオスチン、テネイシン C とファイブロネクチンは対照に比べて有意に発現上昇していた。PDR 硝子体液においてもペリオスチン、テネイシン C とファイブロネクチンの濃度は PDR 患者で有意に高値を示した。さらに、ペリオスチン、テネイシン C とファイブロネクチンの間に有意な高い相関関係がみられた。

ヒト微小血管内皮細胞 (HREC) において、インターロイキン-13 (IL-13) は、ペリオスチン、テネイシン C とファイブロネクチンの mRNA およびタンパク質発現を促進した。また HREC においてペリオスチン、テネイシン C とファイブロネクチンは共沈降した。

IL-13 は HREC の増殖、遊走、管腔形成を促進した。HREC の細胞増殖はペリオスチン、テネイシン C siRNA の両方によって阻害され、ペリオスチン siRNA はテネイシン C siRNA よりも高い阻害効果を示した。一方、ペリオスチン siRNA の単回投与と、ペリオスチン siRNA とテネイシン C siRNA の併用投与との間に有意差はなかった。細胞遊走アッセイにおいても両 siRNA によって細胞遊走が有意に阻害され、ペリオスチン siRNA はテネイシン C siRNA よりも高い抑制効果を示した。管腔形成に関しても、管腔形成の全長が両 siRNA によって減少した。ペリオスチン siRNA はテネイシン C siRNA よりも高い抑制効果を示した。ペリオスチン、テネイシン C siRNA の併用投与は、管腔形成における相加的な阻害効果を示さなかった。

虚血網膜血管新生マウスモデルにおいてペリオスチン、テネイシン C とのノックアウトにより網膜前血管新生を抑制した。ペリオスチンノックアウトの抑制効果はテネイシン C ノックアウトの抑制より強く、ダブルノックアウトと同程度の抑制効果であった。ペリオスチンおよびテネイシン C の抑制により虚血誘導網膜前血管新生が抑制されることが明らかとなった。

以上の *in vitro*、*in vivo* の結果より、ペリオスチンノックアウトの抑制効果はテネイシン C ノックアウトの抑制効果より強く、ダブルノックアウトの抑制効果と同様であることが明らかとなった。今回の研究では、血管新生の足場としてペリオスチン、テネイシン C、ファイブロネクチンを含むタンパク質複合体形成が重要であり、さらにペリオスチンがその複合体の形成過程でテネイシン C の結合に重要であることが明らかとなった。眼内血管新生を抑制するにあたり、ペリオスチンは現在主流の VEGF に続く標的分子として期待できることが期待された。

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 3件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida Shigeo, Umeno Yumi, Haruta Masatoshi	4. 巻 1132
2. 論文標題 Periostin in Eye Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 113 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-13-6657-4_12	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 該当する
1. 著者名 Peng Yingqian, Zou Jingling, Wang Jiang-Hui, Zeng Huilan, Tan Wei, Yoshida Shigeo, Zhang Liwei, Li Yun, Zhou Yedi	4. 巻 17
2. 論文標題 Small RNA Sequencing Reveals Transfer RNA-derived Small RNA Expression Profiles in Retinal Neovascularization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 1713 ~ 1722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijms.46209	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 Liu Xiao, Zhang Liwei, Wang Jiang-Hui, Zeng Huilan, Zou Jingling, Tan Wei, Zhao Han, He Yan, Shi Jingming, Yoshida Shigeo, Li Yunping, Zhou Yedi	4. 巻 45
2. 論文標題 Investigation of circRNA Expression Profiles and Analysis of circRNA-miRNA-mRNA Networks in an Animal (Mouse) Model of Age-Related Macular Degeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Eye Research	6. 最初と最後の頁 1173 ~ 1180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02713683.2020.1722179	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 Kubo Yuki, Ishikawa Keijiro, Mori Kenichiro, Kobayashi Yoshiyuki, Nakama Takahito, Arima Mitsuru, Nakao Shintaro, Hisatomi Toshio, Haruta Masatoshi, Sonoda Koh-Hei, Yoshida Shigeo	4. 巻 10
2. 論文標題 Periostin and tenascin-C interaction promotes angiogenesis in ischemic proliferative retinopathy	5. 発行年 2020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/s41598-020-66278-1	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 -

1. 著者名 Watari Kosuke, Shibata Tomohiro, Fujita Hideaki, Shinoda Ai, Murakami Yuichi, Abe Hideyuki, Kawahara Akihiko, Ito Hiroshi, Akiba Jun, Yoshida Shigeo, Kuwano Michihiko, Ono Mayumi	4. 巻 3
2. 論文標題 NDRG1 activates VEGF-A-induced angiogenesis through PLC 1/ERK signaling in mouse vascular endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	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/s42003-020-0829-0	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yoshida S
2. 発表標題 Alteration in the number of microaneurysms in diabetic macular edema after anti-vascular endothelial growth factor therapy.
3. 学会等名 Retina Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 茂生
2. 発表標題 増殖糖尿病網膜症におけるマトリセラー蛋白の役割
3. 学会等名 第24回日本糖尿病眼学会 (招待講演)
4. 発表年 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
研究分担者	石川 桂二郎 (ISIKAWA Keijiro) (00795304)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	園田 康平 (SONODA Kohei) (10294943)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	池田 康博 (IKEDA Yasuhiro) (20380389)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	久富 智朗 (HISATOMI Toshio) (50404033)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	中尾 新太郎 (NAKAO Shintaro) (50583027)	九州大学・医学研究院・講師 (17102)	

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