

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09455

研究課題名(和文)線維化抑制と神経保護作用を標的とした加齢性黄斑変性症に対する治療法の開発

研究課題名(英文)Development of treatments for age-related macular degeneration targeting fibrosis suppression and neuroprotective effects

研究代表者

畑中 宏樹 (Hatanaka, Hiroki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：80368050

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)：OBP801がTGF-、TNF-だけでなく、CTGF、PDGF等で誘導された線維性変化に対しても抑制効果を示した。また線維化誘導された細胞ではHAT遺伝子の発現が抑制され、細胞のHAT活性が減少していることが判明した。このepigenetic調節機構の破綻からの回復がOBP801における線維化抑制効果の作用機序であることを見出し、これらの研究成果を論文にまとめ投稿し受理された。また、OBP801の線維性組織形成阻害効果は、線維芽細胞にも有効であることが判明した。さらにOBP801の血管新生に対する直接的な抑制効果もプリミティブな結果であるが確認できている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性(AMD)は近年著しく増加中の重篤な視力障害を引き起こす疾患である。現在主流の治療法である抗VEGF治療はCNV抑制を目的としており、視力予後因子である網膜組織の線維化に対する治療法は未だ存在しない。本研究で行われたOBP801の複数種細胞における線維性組織形成阻害効果の検証とその作用機序の解析、および血管内皮細胞に対する管腔形成阻害効果の実証により、CNVだけでなく線維性組織形成等を標的としたAMD治療薬としての開発が大きく前進したと言える。

研究成果の概要(英文)：OBP801 showed an inhibitory effect not only on TGF- and TNF- but also on fibrotic changes induced by CTGF and PDGF. It was also found that the expression of the HAT genes were suppressed in the fibrotic cells, and the HAT activity of the cells was decreased. We found that recovery from the disruption of this epigenetic regulatory mechanism was the mechanism of action of the fibrosis-suppressing effect in OBP801, and these research results were summarized in a paper and accepted. It was also found that the inhibitory effect of OBP801 on fibrotic tissue formation is also effective for fibroblasts. Furthermore, the direct inhibitory effect of OBP801 on angiogenesis has been confirmed as a primitive result.

研究分野：眼科

キーワード：加齢黄斑変性 網膜色素上皮細胞 線維化 脈絡膜血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性症(AMD)は加齢や酸化ストレスなどの環境因子により黄斑部の網膜色素上皮細胞 (RPE) が変性し、脈絡血管新生(CNV)を起こす疾患である。日本では、高齢化と生活の欧米化により近年著しく増加(10年で7倍以上)し、高齢者の重篤な視力障害疾患の1つとなっている。現在、AMDに対する治療の主流はCNVを標的にした抗 VEGF 抗体による血管除去療法である。しかし、この抗 VEGF 療法には様々な問題点が存在する。治療に抵抗を示す無反応症例や、経過途中に効果がなくなる耐性症例が多く割合で出現する。抗 VEGF 療法は、病態進行抑制を目的とするため視機能の改善効果は余り期待できない。長期複数回投与が不可欠で合併症や副作用(眼圧上昇、視力低下、眼痛、網膜出血)の危険性がある。高額医療費が高額となり治療を中断してしまうケースも見られる。これら多くの問題点から抗 VEGF 療法に代わる新規の AMD 治療法が臨床現場から強く求められている。

2. 研究の目的

本研究では、AMD 病態進行の中で、網膜色素上皮細胞 (RPE)の epigenetic な調節機構の破綻を引き金とした機能的相転移である線維化に注目している。申請者の保持する新規 HDAC(histone deacetylase)阻害化合物[OBP801]は、RPE の線維化に対し極めて低濃度、投与量で有効性を示すとともに、組織線維化に係る複数の遺伝子に対し包括的に抑制効果を示す初めての化合物であることを見出している。さらに、線維化のみならず、血管新生に関与する VEGF, PDGF, Collagen を架橋し瘢痕形成に関わる LOX 等、複数の遺伝子発現に対しても抑制効果を確認しており、AMD 患者の多様な病態に対し高い治療効果が期待される (H28-29 畑中 若手研究 B)。この OBP801 の薬理効果のさらなる解析を行い、AMD 病態における線維化組織形成抑制効果の確実性を示し、その作用機作を解明することで OBP801 の薬理効果の作用点を明確化する。さらに OBP801 の CNV に対する直接的な抑制効果を実証することで、OBP801 の薬理効果の確実性を立証する。これらの科学的根拠を基に、OBP801 を線維化抑制効果、血管新生抑制効果、瘢痕形成抑制効果を併せ持ち、現行の抗 VEGF 療法の限界を克服する治療法として確立させることを目的とする。

3. 研究の方法

<細胞培養>

・ヒト網膜色素上皮細胞株は ARPE-19 (ATCC CRL-2302 (登録商標) (P19)を購入した。培養は DMEM/F12 (Invitrogen: 11330-032)に 10% FBS を添加した培地を用い、手順書通りに培養した。実験は継代数 P23 ~ 26 で行なった。初代ヒト網膜色素上皮細胞は H-RPE (00194987 LONZA) (P2)を購入し手順書通りに培養し、継代数 P3 ~ 5 で使用した。ヒト結膜繊維芽細胞 (HconFs; ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA) は 10%FBS を添加した fibroblast medium (Thermo Fisher Scientific)を用いて手順書通りに培養し、継代数 P2 ~ P4 で使用した。ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC; PromoCell)は推奨培地(Endothelial Cell Growth Medium; PromoCell)を用いて手順書通りに培養し、継代数 P3 ~ P5 で使用した。いずれの細胞も 37°C 5% CO₂ の環境で培養した。

<薬剤処理>

OBP-801 は株式会社オンコリスバイオファーマ社から供与された。OBP-801 を DMSO(Dimethyl sulfoxide)で 10 μM の濃度に溶解しストック溶液として使用し、培地を用いて希釈し、投与群に投与するための医薬組成物を調製した。培養細胞が 80 ~ 90% confluent 時に FBS 抜きの培地に交換し OBP-801(1 nM)または Prostaglandin E₂ (50 μM), を添加した。24 時間後に TGF (20 ng/ml), TNF (10 ng/ml), PDGF-AA, BB, CC, DD (100 ng/ml each), CTGF (500 ng/ml) を添加し 48 時間曝露した。生細胞は位相差顕微鏡にて観察した。

<免疫染色>

細胞を Cold Methanol (-30) 中で 15 min 固定し、風乾した。ブロッキングは 1% ウシアルブミン溶液中室温で 60 分で行なった。一次抗体は、4 で一晚反応させた。二次抗体は室温で 60 分間反応行なった。5 μg/ml DAPI を用いて室温 15 分で核染色を行った。観察は蛍光顕微鏡(BZ9000 : KEYENCE)にて行った。

<ウェスタンブロッティング>

タンパク抽出試薬 (SDS-HBS ; 1%SDS, 150 mM NaCl in 10 mM Hepes (pH. 7.4)で細胞を溶解した。3 min 間沸騰し、5 min (15 sec- 10 sec pause)の Sonication により溶解を促進した。

タンパク定量には BCA kit (Thermo #23235)を用いた。SDS-page 電気泳動 (30µg/lane [iBlot 4-12% Bis-Tris Plus Gell]) を行い、PVDF メンブレンに転写 [iBlot PVDF トランスファースタックレギュラー] した。ブロッキング及び抗体反応 [iBind Western System] を行なった後、ECL 化学発光 [NOVEX ECL CHEMI SUBSTRATE] させ、検出を行った [LAS3000 (Fuji film)]。

<管腔形成アッセイ>

HUVEC を Growth Factor-reduced Matrigel (Invitrogen) でコートした 96 well プレートに 1x10⁴ cells/well で播種し 37°C 5% CO₂ でインキュベートした。16h 後に位相差顕微鏡で観察した。

<Quantitative real-time PCR array と 3D-gene microarray analysis >

Total RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) で抽出した。RNA の濃度は NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific) で測定した。cDNA は RT2 First Strand kit (Qiagen) を用い合成した。Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) と RT2 Profiler™ PCR Array (human fibrosis と EMT) (Qiagen) を使用し PCR アレイを行った。3D 遺伝子 DNA チップのマイクロアレイ分析は東レ株式会社に委託した。3D gene 測定は 3 回行った (n=3)。

<統計分析>

データは、3 回測定の前平均 ± SD として表す。統計分析は、スチューデント t 検定を使用した。サンプルは、P < 0.05 で有意に異なると見なした。

4 . 研究成果

TNF-α は HAT アイソフォームの発現を抑制し、HDAC1 遺伝子発現を TGF-β と相乗的に促進する。

RPE の線維化誘導時における HAT と HDAC アイソフォームの遺伝子発現変化を検証した。ARPE19 を TGF-β と TNF-α に暴露し 3D-GENE により網羅的に遺伝子発現解析を行った。TGF-β と TNF-α の暴露により筋繊維化マーカーである αSMA と EMT/線維化マーカーである MMP9, CD44 の発現増加が見られ線維化が誘導されていることがウエスタンブロットで確認できた (図 1a)。3D-GENE で得られたデータから [histone acetyl transferase] のキーワードで抽出された 12 個の遺伝子、MYST2、MYST3、KAT2B (PCAF)、MYST3、RBBP7 (CREBBP)、EP300、MYST1、HAT1、KAT5、MGEA5、KAT2A (GCN5)、MYST4 のうち、RBBP7 (CREBBP) と KAT2A (GCN5) のみが、TNF-α 単独および TGF-β との組み合わせで有意な変化を示した。代表的な HAT 関連遺伝子 (EP300, CREBBP, PCAF, GCN5) を図に示す。同様に [histone deacetylase] のキーワードで合計 21 個の遺伝子が抽出され、HDAC1~10 を図に示す。HDAC1~10 の遺伝子発現は、TNF-α または TGF-β 単独のいずれによっても有意な変化はみられなかった。しかし、TGF-β+TNF-α により、HDAC1 遺伝子発現のアップレギュレーションが確認された (図 1b)。この結果は、RPE が TNF-α および/または TGF-β 暴露により、HDAC/HAT のバランスが HDAC 増強に偏っている可能性を示唆している。この epigenetic 調節機構の破綻を HDAC 阻害活性によって正常に戻すことが、OBP801 における線維化抑制効果の作用機序であると考えられる。OBP801 は RPE だけでなく線維芽細胞の筋繊維性変化をも阻害する一般的な組織損傷時の線維組織形成

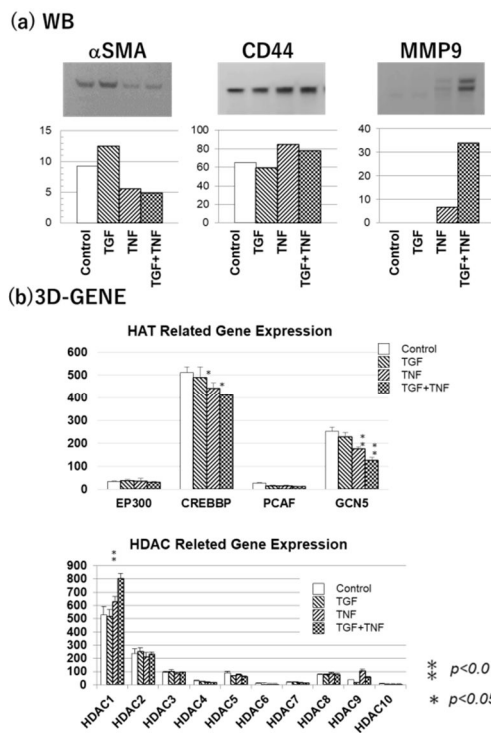


図 1

3D 遺伝子 DNA チップのマイクロアレイ分析は東レ株式会社に委託した。3D gene 測定は 3 回行った (n=3)。

<統計分析>

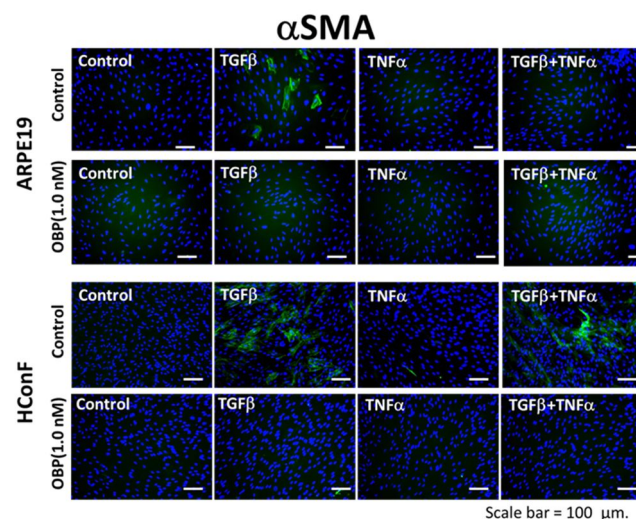
データは、3 回測定の前平均 ± SD として表す。統計分析は、スチューデント t 検定を使用した。サンプルは、P < 0.05 で有意に異なると見なした。

4 . 研究成果

TNF-α は HAT アイソフォームの発現を抑制し、HDAC1 遺伝子発現を TGF-β と相乗的に促進する。

RPE の線維化誘導時における HAT と HDAC アイソフォームの遺伝子発現変化を検証した。ARPE19 を TGF-β と TNF-α に暴露し 3D-GENE により網羅的に遺伝子発現解析を行った。TGF-β と TNF-α の暴露により筋繊維化マーカーである αSMA と EMT/線維化マーカーである MMP9, CD44 の発現増加が見られ線維化が誘導されていることがウエスタンブロットで確認できた (図 1a)。3D-GENE で得られたデータから [histone acetyl transferase] のキーワードで抽出された 12 個の遺伝子、MYST2、MYST3、KAT2B (PCAF)、MYST3、RBBP7 (CREBBP)、EP300、MYST1、HAT1、KAT5、MGEA5、KAT2A (GCN5)、MYST4 のうち、RBBP7 (CREBBP) と KAT2A (GCN5) のみが、TNF-α 単独および TGF-β との組み合わせで有意な変化を示した。代表的な HAT 関連遺伝子 (EP300, CREBBP, PCAF, GCN5) を図に示す。同様に [histone deacetylase] のキーワードで合計 21 個の遺伝子が抽出され、HDAC1~10 を図に示す。HDAC1~10 の遺伝子発現は、TNF-α または TGF-β 単独のいずれによっても有意な変化はみられなかった。しかし、TGF-β+TNF-α により、HDAC1 遺伝子発現のアップレギュレーションが確認された (図 1b)。この結果は、RPE が TNF-α および/または TGF-β 暴露により、HDAC/HAT のバランスが HDAC 増強に偏っている可能性を示唆している。この epigenetic 調節機構の破綻を HDAC 阻害活性によって正常に戻すことが、OBP801 における線維化抑制効果の作用機序であると考えられる。OBP801 は RPE だけでなく線維芽細胞の筋繊維性変化をも阻害する一般的な組織損傷時の線維組織形成

図 2



には、上皮細胞、炎症細胞、内皮細胞、線維芽細胞が関与する。AMD 病態で形成される線維性組織の細胞由来が RPE 以外の他種細胞を含む可能性を考慮し、fibroblast の Myofibroblast 化に対する OBP801 の抗線維化効果を検証した。ARPE19 を TGFβ に暴露することで誘導される筋繊維化マーカー-αSMA の発現は 1nM の OBP801 により阻害される(図 2 上段)。線維芽細胞である HconF では TGFβ 単独または TNFα と組み合わせて暴露することで αSMA が発現誘導された。この発現は TGFβ 暴露 ARPE19 同様 1nM の OBP801 により阻害された(図 2 下段)。この線維芽細胞の筋繊維化に対する阻害効果は、OBP801 の線維化抑制効果が RPE 細胞特異的でないことを実証し、AMD 病態における線維化組織形成抑制効果の確実性の担保となると思われる。

OBP801 は TGFβ や TNFα 以外の線維性変化も阻害する

AMD における線維性組織形成への線維芽細胞の関与を考慮し、TGFβ、TNFα に加えて、PDGF や CTGF の影響を検証した。また、他臓器における線維化症への関与が報告されている Prostaglandin の影響に対しても検証を行った。CTGF や PDGF でも RPE の筋線維化(αSMA の発現増強)が誘導されることが判明した。また、ECM (COL1, COL4, COL16) の発現増強も確認できた。

さらに、今回使用した誘導剤全てにおいて OBP801 は αSMA の発現をほぼ完全に抑えることが判明した。一方、プロスタグランジン E2(PE2)は線維化による ECM(COL1, COL4, COL16)の発現を抑制したが、αSMA の発現に対する抑制効果はほぼ見られなかった(図3)。これら多様な線維化誘導因子に対し OBP801 が示した阻害効果の有効性は、AMD 病態における線維化組織形成抑制効果の確実性をより強固に支持すると考える。

OBP801 における血管新生阻害効果の検証

OBP801 の CNV に対する直接的な抑制効果を、血管内皮培養細胞(HUVEC)による tube-formation assay 系を用いて検証した。また、抗 VEGF 剤(アイリニア)と OBP801 併用による血管抑制効果向上の可能性を検証した。10nM OBP801 単独で管腔形成阻害効果が見られた。アイリニアは 0.04μg/ml で管腔形成阻害効果が見られ、0.4μg/ml でさらにその効果は明瞭となった。また、OBP801 とアイリニアの併用による相乗効果は認められなかったが、相加的な効果は確認できた。OBP801 の直接的な管腔形成阻害効果が明らかとなり、AMD 病態における CNV 阻害効果に期待が持てる結果となった。

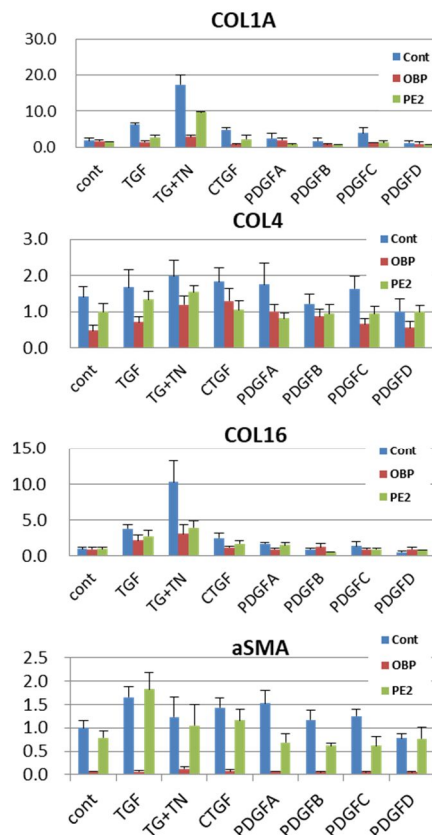


図3

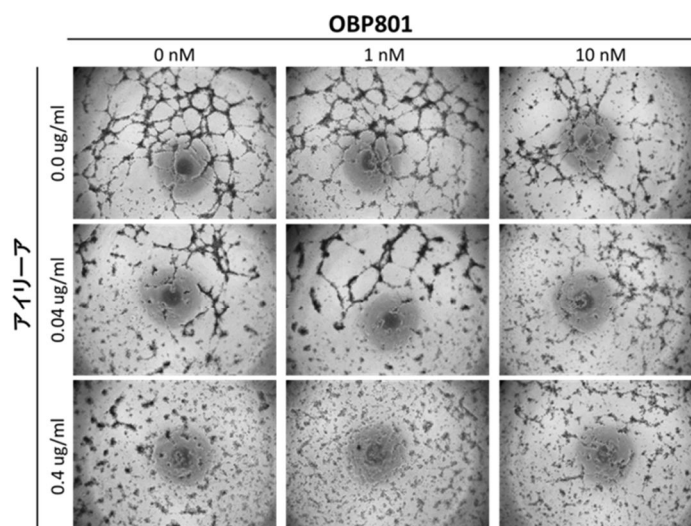


図4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hatanaka Hiroki, Mukai Atsushi, Ito Eiko, Ueno Morio, Sotozono Chie, Kinoshita Shigeru, Hamuro Junji	4. 巻 544
2. 論文標題 Epigenetic regulation of the epithelial mesenchymal transition induced by synergistic action of TNF- and TGF- in retinal pigment epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 31~37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.01.060	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Atsushi Mukai, Hiroki Hatanaka, Morio Ueno, Tetsuya Yamagishi, Kazuhito Yoneda, Yasuo Urata, Shigeru Kinoshita, Chie Sotozono, Junji Hamuro
2. 発表標題 A new pluripotent epigenetic repressor of diverse genes, OBP801, remarkably prevents chorioretinal fibrosis and choroidal neovascularization
3. 学会等名 2018 XXIII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research (国際学会)
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	外園 千恵 (Sotozono Chie) (30216585)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	

	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
研究協力者	向 敦史 (Mukai Atsushi) (00419152)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員 (24303)	

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
研究協力者	上野 盛夫 (Ueno Morio) (40426531)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	
研究協力者	羽室 淳爾 (Hamuro Junji) (80536095)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員教授 (24303)	

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