

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07351

研究課題名(和文)筋線維芽細胞の機能発現に焦点を当てた網膜変性疾患に対する創薬研究

研究課題名(英文) Drug discovery against retinal degenerative diseases based on the functional regulation of myofibroblasts.

研究代表者

林 謙一郎 (Hayashi, Kenichiro)

山口大学・医学部附属病院・学術研究員(寄附金)

研究者番号：90238105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：筋線維芽細胞機能発現の分子メカニズムの解明及び筋線維芽細胞の活性化に起因する網膜変性疾患に焦点を当てた創薬研究が本研究の目的である。に関して、筋線維芽細胞の機能発現に重要な役割を果たすタンパク質としてCRP2を同定した。CRP2は筋線維芽細胞に特有な転写を促進する。CRP2の3D構造解析によりこの機能に必須の領域及びアミノ酸配列を同定した。に関して、Benzoylphenyl urea (BPU) 類縁体、BPU17と命名した化合物が網膜変性疾患モデル動物を用いた解析で瘢痕形成及び血管新生を抑制することを明らかにし、その標的タンパク質の同定と阻害機構の解明に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性(AMD)は血管新生とその破綻に起因する網膜変性疾患で、高齢化の進行により患者の増加が予想される。AMD治療薬として抗VEGF剤が使用されるが、根治的な治療には至らず病変部で瘢痕が形成され、視覚障害を起こす。

本研究でCRP2が筋線維芽細胞の機能発現に重要な役割を果たすことを明らかにし、CRP2が線維化に向けた新たな創薬標的であることを示した。また、元来殺虫剤として開発されたBenzoylphenyl ureaに属する化合物が網膜変性疾患に対する創薬に応用可能なことを明らかにした。以上の結果はAMDをはじめとする網膜変性疾患に対する新たな創薬基盤を提示し、その社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：Objectives of this study are as follows: 1) Elucidation of molecular mechanisms of myofibroblast functional expression; 2) Drug discovery against retinal degenerative diseases whose cause is an activation of the myofibroblast. This study leads to the following novel findings.

1) We identified CRP2 as a protein that plays a role in myofibroblast function: CRP2 promotes myofibroblast-specific transcription, and 3D structural analysis of CRP2 identified the region and amino acid sequence essential for this function. 2) Benzoylphenyl urea (BPU) analog, named BPU17, inhibits scar formation and angiogenesis in an animal model of retinal degenerative disease. We identified the target protein and elucidated its inhibitory mechanism.

研究分野：細胞生物学

キーワード：加齢黄斑変性 網膜色素上皮細胞 筋線維芽細胞 瘢痕 血管新生 血管内皮細胞 Benzoylphenyl urea (BPU) CRP2

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

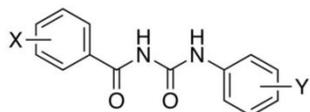
1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞は臓器間質に存在する間質細胞で、コラーゲン等の細胞外基質 (ECM) を産生するが、正常組織においては ECM 産生能及び細胞運動能も抑制された状態を維持している。一方、創傷を受けた場合は炎症反応にตอบสนองして線維芽細胞や上皮細胞は増殖能、ECM 産生能及び細胞運動能が亢進した筋線維芽細胞に形質転換し (上皮細胞からの形質転換は上皮間葉転換 [EMT] として知られている) 創傷治癒を促す。しかし、過剰な筋線維芽細胞の機能発現 (ECM 産生・ α SM-actin に代表される SMC gene の発現増強・細胞運動の亢進) は網膜変性疾患をはじめとする線維化症を誘起させる。また、ガン組織においては間質に局在する筋線維芽細胞 (がん関連線維芽細胞) がガン浸潤・転移を促進させる。

加齢黄斑変性 (AMD) は網脈絡膜における血管新生とその破綻に起因する線維化を伴う網膜変性疾患で、高齢化の進行により患者数の増加が予想される。AMD 治療法として抗 VEGF 剤が使用されている。抗 VEGF 剤による新生血管退縮により、予後の改善が認められるが、根治的な治癒には至らず、障害を受けた網膜組織は網膜下で癒痕 (線維性増殖組織) が形成される。炎症に伴う新生血管破綻に起因する網膜色素上皮細胞 (RPE) の EMT により派生した筋線維芽細胞の増殖・脈絡膜への浸潤・ECM の過剰産生が癒痕形成の要因で、癒痕は網膜視細胞障害を誘起し、視覚障害を起こす。現時点で、癒痕形成に対する有効な治療法は確立されていない。

筋線維芽細胞の機能発現機構として myocardin family の転写補助因子 myocardin related transcription factors (MRTF-A & -B [MRTF]) の核集積が挙げられるが、これ以外に MRTF の機能発現には cysteine and glycine-rich protein 2 (CRP2) が必要であることを見いだした。根拠として CRP2 の knock-down (KD) が筋線維芽細胞の機能発現及び TGF- β にตอบสนองした RPE の EMT を抑制したことが挙げられる。本研究とは直接的には関係ないが、がん関連線維芽細胞を介する扁平上皮ガンの集団的浸潤も CRP2 に依存する。

以上の知見から、「CRP2 阻害剤は RPE の EMT 並びに筋線維芽細胞の機能を阻害し癒痕形成を抑える薬剤にならないか?」と考えた。また、研究分担者・中川から供与された数十個の benzoylphenyl urea (BPU) 類縁体を検証した結果、筋線維芽細胞の機能発現、RPE の EMT、血管内皮細胞の増殖・細胞運動・管腔形成 (血管新生) を阻害し、且つ *in vivo* での網膜癒痕化をも阻害する化合物 (BPU17 と命名) を見いだした。以上の結果から「BPU17 は根治的 AMD 治療薬の創薬シードにならないか?」と考えた。



BPU の基本構造を左図に示す。本研究はこれらの発想を基盤に立案し、2019 - 2022 年度に実施した。

2. 研究の目的

RPE の EMT による筋線維芽細胞への形質転換が AMD 等の網膜変性疾患の要因となっている。EMT は MRTF の機能発現により誘起され、CRP2 がこの現象に深く関わること及び BPU17 が筋線維芽細胞及び血管内皮細胞の機能発現を阻害することを見出していた。この知見を基盤に以下の2つのアプローチから AMD に向けた根治的治療薬の創成を目指す。

CRP2 に焦点を当てた MRTF 機能阻害メカニズムの解明と筋線維芽細胞阻害化合物の探索。 BPU 類縁体、BPU17 を創薬シードとした網膜変性疾患に向けた創薬研究。

3. 研究の方法

培養細胞: 株化線維芽細胞 NIH3T3 細胞の培養には DMDM-10% FCS を用いた。初代培養網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelial cell [RPE]) 及び血管内皮細胞(endothelial cell [EC]) の培養にはそれぞれ RtEGM BulletKit (ロンザ) 及び HEC-C1 培地 (機能性ペプチド研究所) を用いた。

細胞運動: 創傷治癒アッセイにより細胞運動能に及ぼす効果を評価した。

血管新生: マトリゲル上で EC の培養を行い、管腔形成を誘導する。管腔の長さ及び分岐点の数に及ぼす効果を定量化することで血管新生に対する効果を評価した。

細胞増殖・生存アッセイ: BPU の細胞増殖及び生存率に対する効果はそれぞれプロモデオキシウリジン(BrdU)の取り込みや MTT アッセイにより評価した。

イムノブロット・qPCR: それぞれの培養細胞を 2% SDS sample buffer で溶解させた総抽出液を SDS-PAGE にかけてタンパク質を分離後、PVDF 膜に転写する。対象となる抗体を用いたイムノブロットによりタンパク質レベルでの発現を解析する。この際、GAPDH をローディングコントロールとして用いた。mRNA レベルでの発現は total RNA を鋳型にして cDNA 合成を行い、real-time qPCR により解析する。この場合も GAPDH mRNA の発現量を内在性コントロールとして用いた。

siRNA を介したノックダウン(KD): 目的とする遺伝子に対する siRNA は Sigma から購入し、Lipofectoamine RNAiMAX を用いて培養細胞へ導入した。siRNA 導入後 2 日目に細胞増殖及び細胞運動に対する目的遺伝子の KD 効果を解析した。

タンパク質間相互作用の解析: In vitro タンパク質翻訳システム (Pomega)で合成したタンパク質を用いてタンパク質間相互作用を解析した。相互作用の検出には免疫沈降法・イムノブロット (IB)を用いた。

網膜変性疾患モデル動物: 以前に報告されている方法に準じて施行した (Kimura et al. 2015)。網膜組織にレーザー照射により障害を与え (この際に BPU17 またはコントロールとして DMSO を眼球内に投与する) 7 日後 (血管新生解析) もしくは 21 日後 (は癬痕形成解析) に眼球を取り出し、組織染色により血管新生 (イソレクチン染色) 及び癬痕形成 (collagen 抗体による染色) に対する薬剤効果を評価する。

プロモーターアッセイ: 3xCArG-box-Luciferase をレポーターとして SRF/CArG-box を介し

た転写 (SMC gene の転写) に及ぼす MRTF-A・CRP2 の相乗効果や BPU17 による阻害効果の検証を行った。培養細胞への遺伝子導入は ViaFect (Promega)を使用した。

DNA アフィニティーを用いたタンパク質-DNA 結合解析: SRF 結合部位 (CArG-box)を連結させた 3xCArG のビオチン化プローブを Streptavidin M-280 Dynabeads (Invitrogen) と反応させ、プローブに結合したタンパク質は、IB により検出した。

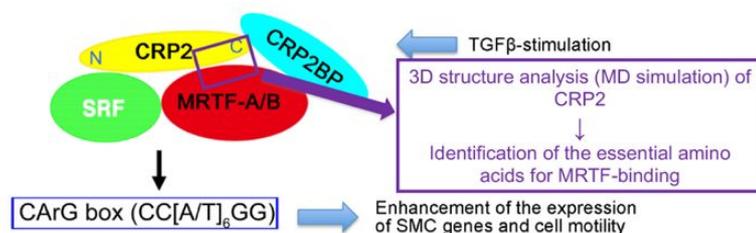
BPU17 の標的タンパク質の同定: BPU17 を FG beads (TAMAGAWA SEIKI)とカップリングさせた BPU17-affinity beads を調製し、細胞抽出液 (RPE 及び EC) と反応させた後、洗浄・抽出を行った。抽出液を SDS-PAGE で分離後、銀染色により BPU17-affinity beads に結合したタンパク質を可視化し、質量分析でタンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) CRP2 の機能制御に焦点を当てた MRTF 機能阻害メカニズムの解明と筋線維芽細胞阻害化合物の探索

CRP2-MRTF 相互作用による SRF/CArG-box を介した転写促進の分子機構解明

CRP2 は MRTF-A 及び SRF と直接結合し、MRTF-A/SRF/CArG-box を介した転写を増強する。この効果は CRP2 が MRTF-A の CArG-box に結合した SRF に対する親和性を高めることに起因し、epigenetic factor である CRP2BP がアダプタータンパク質として上記の CRP2 機能を促進することを見出した。この CRP2BP の機能には C 末側に存在する histone acetyltransferase domain を必要としない。詳細な結合実験から、CRP2 の C 末端側の LIM domain (101-193 amino acids)と MRTF-A の C 末部分がそれぞれの結合領域であることが判明した。



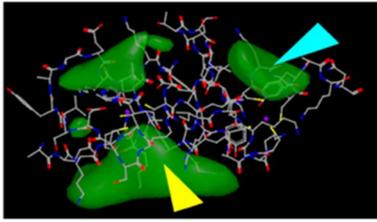
ることが判明した。図1にCRP2及びCRP2BPを介した転写促進の概要を示す。

図1：CRP2-MRTF 相互作用による SRF/CArG-box を介した転写促進機構

3次元 (3D)構造解析による CRP2-MRTF-A 相互作用に必須のアミノ酸配列の同定

MRTF-A と結合する CRP2 の C 末端側 LIM domain の 3D 構造を Molecular dynamics (MD) simulation により分析し、MRTF-A 結合に関わる protein-binding cavity の探索を行った。

図2に黄色矢印で示す一番大きな cavity は MRTF-A との結合に関わらず、水色矢印で示した cavity が MRTF-A との結合に重要で、極性アミノ酸 (serine-152, glutamate-154, serine-155, threonine-156, threonine-157, and threonine-159 in human CRP2)が MRTF-A との直接結合に必須であることと疎水性アミノ酸 (tryptophan-139, phenylalanine-144,



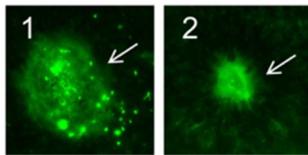
leucine-153, and leucine-158 in human CRP2)が水色矢印で示した cavity 形成に重要であることを明らかにした。この cavity に安定配座する可能性のある低分子化合物の探索をドッキングシミュレーションで行ったが、候補となり得る化合物を同定できなかった。

図 2 : CRP2 の C 末部に存在する protein-binding cavity (緑色)

(2) BPU17 を創薬シードとした網膜変性疾患に向けた創薬研究

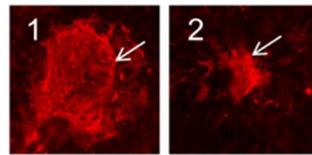
網膜変性疾患モデル動物を用いた解析

BPU17 を投与した群はコントロール (cntl)群に比べてイソレクチン及び collagen 抗体による染色強度が低下した (図 3)。以上の結果から、in vivo で BPU17 は血管新生と癒痕の両



イソレクチンによる新生血管内皮の染色 (矢印)

1: cntl
2: BPU17投与



コラーゲン抗体による癒痕染色 (矢印)

1: cntl
2: BPU17投与

方を阻害することが判明した。

図 3 : 網膜変性疾患モデル動物での BPU17 の血管新生と癒痕形成に対する阻害効果

培養細胞 (初代培養 RPE 及び EC) を用いた解析

上記の阻害機構の解明に向けて初代培養細胞 (RPE 及び EC)での解析を進めた。この結果、CRP2 は RPE の EMT に重要な役割を果たし、BPU17 は CRP2 発現を抑制することで EMT を阻害することを明らかにした。EC の機能発現 (細胞運動・閉空形成) に対する BPU17 の効果検証の結果、BPU17 は細胞運動及び細胞接着に関わる β -actin や integrin 類の発現を低下させ EC 機能を阻害した。この阻害効果は BPU17 処理された EC で MRTF-A/B の発現低下に起因する。

BPU17 の標的タンパク質の探索

BPU17 とカップリングさせた FG beads (BPU17-affinity beads) を用いて RPE 及び EC 由来の細胞抽出液から BPU17 結合タンパク質の単離し、proteomics による同定を行った。この結果、両細胞に共通する複数のタンパク質が検出された。これらは何もミトコンドリア機能維持に関わるタンパク質で、機能解析を継続中である。

引用文献

Kimura K, Orita T, Liu Y, Yang Y, Tokuda K, Kurakazu T, Noda T, Yanai R, Morishige N, Takeda A, Ishibashi T, Sonoda KH. Attenuation of EMT in RPE cells and subretinal fibrosis by an RAR- γ agonist. J Mol Med. 2015; 93: 749–758.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yokoi Taiyo, Nabe Taku, Ishizuka Chiharu, Hayashi Ken'ichiro, Ito Harashima Sayoko, Yagi Takashi, Nakagawa Yoshiaki, Miyagawa Hisashi	4. 巻 76
2. 論文標題 Transcription inducing activity of natural and synthetic juvenile hormone agonists through the Drosophila Methoprene tolerant protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pest Management Science	6. 最初と最後の頁 2316 ~ 2323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ps.5766	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 Yokoi Taiyo, Nabe Taku, Horoiwa Shinri, Hayashi Ken'ichiro, Ito-Harashima Sayoko, Yagi Takashi, Nakagawa Yoshiaki, Miyagawa Hisashi	4. 巻 46
2. 論文標題 Virtual screening identifies a novel piperazine-based insect juvenile hormone agonist	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 68 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1584/jpestics.D20-074	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 Tsuyoshi Morita and Ken'ichiro Hayashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Actin-related protein 5 functions as a novel modulator of MyoD and MyoG in skeletal muscle and in rhabdomyosarcoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e77746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.77746	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 Tsuyoshi Morita and Ken'ichiro Hayashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Actin-related protein 5 suppresses cooperative activation of cardiac transcriptions by myocardin and MEF2.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 363-379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13549	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 Tsuyoshi Morita and Ken'ichiro Hayashi	4. 巻 667
2. 論文標題 Regulation of Arp5 expression by alternative splicing coupled to nonsense-mediated RNA decay.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 50-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.03.047	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 Hayashi, K., Horoiwa, S., Mori, K., Miyata, H., Labios, R.J., Morita, T., Kobayashi, Y., Yamashiro, C., Higashijima, F., Yoshimoto, T., Kimura, K., and Nakagawa, Y.	4. 巻 48
2. 論文標題 Role of CRP2-MRTF interaction in functions of myofibroblasts.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 83-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.23004	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 0件)

1. 発表者名 林 謙一郎
2. 発表標題 Benzoylphenyl urea (BPU) の新たな生理機能の発見と作用機序解明
3. 学会等名 37th 藤田カンファレンス (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐久間 彩乃, 山城 知恵美, 徳田 和央, 長谷川 実茄, 濱田 和花, 東島 史明, 吉本 拓矢, 小林 由佳, 芦森 温茂, 寺西 慎一郎, 湧田 真紀子, 林 謙一郎, 木村 和博
2. 発表標題 BACによるHTFの形態変化に対するHCEの影響
3. 学会等名 第24回眼創傷治癒研究会
4. 発表年 2022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	木村 和博 (Kimura Kazuhiro) (60335255)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究 分担者	中川 好秋 (Nakagawa Yoshiaki) (80155689)	京都大学・農学研究科・研究員 (14301)	

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
---------	---------