

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07387

研究課題名（和文）高解像度エピトープマッピングを駆使した分子標的薬の創成：眼内線維化の新規治療戦略

研究課題名（英文）Development of molecular targeted drug using high-resolution epitope mapping: a novel therapeutic strategy for intraocular fibrotic scarring

研究代表者

中村 信介（Nakamura, Shinsuke）

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80815613

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）：レーザー誘発脈絡膜血管新生モデルマウスの網膜色素上皮において、collagen-1で標識された線維性瘢痕の内部もしくは近傍でProtein Xの明瞭な局在が確認された。さらに、Protein Xが網膜色素上皮細胞の線維化を促進することを明らかにした。Protein Xにおける機能エピトープ領域構造を特定し、既存抗体よりも中和活性に優れた機能抗体の創成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

滲出型加齢黄斑変性の慢性期では、脈絡膜血管新生に伴う線維性瘢痕が形成され、不可逆的な視力低下を引き起こすことが知られる。しかし、眼内線維化病態の発症及び進行を防ぐ治療法は未だ確立されていない。本研究で作製した抗X抗体は線維性瘢痕を対象にした滲出型加齢黄斑変性の長期治療マネジメントに有用な治療薬になる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In the retinal pigment epithelium of laser-induced choroidal neovascularization model mice, protein X was clearly localized in or near collagen -1 labeled fibrotic scars. In addition, it was clarified that Protein X has an action of promoting fibrosis of retinal pigment epithelial cells. The functional epitope region structure in Protein X was specified, and it succeeded in creating the functional antibody which is more excellent in the neutralizing activity than the existing antibody.

研究分野：薬理学

キーワード：加齢黄斑変性 脈絡膜血管新生 線維性瘢痕 線維化 網膜色素上皮細胞

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

滲出型加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration : AMD) は、脈絡膜血管から発生する異常血管新生によって網膜が障害される病気で、世界的にも増加傾向にあり、本邦でも高齢化と生活の欧米化により近年著しく増加している。眼内の血管新生や血管透過性亢進に深く関わっている VEGF を標的とした分子標的薬が開発されて以降、抗 VEGF 療法の第一選択となっている。しかし、抗 VEGF 薬の投与は滲出型 AMD の根治には至らず、永続的に投与が繰り返され、最終的には線維化瘢痕が形成され難治例となる症例が増加している。近年、組織の線維化において、上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition : EMT) が着目されているが、ヒト脈絡膜血管新生の組織検体を用いた既報において、EMT を制御する転写因子の一つである Snail がヒト脈絡膜血管新生中の網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelium : RPE) に高発現し、線維化組織でその陽性率が高いことが明らかとなっている。滲出型 AMD は眼内の組織において複数の細胞が傷害される疾患であるが、現状、脈絡膜血管新生に起因する EMT の報告は RPE のみであり、線維芽細胞の由来となる細胞の同定は明確にはなされていない。脈絡膜血管新生に起因する線維化メカニズムの詳細は不明であり、治療法を確立するためには病態解明の研究が必要である。

2. 研究の目的

申請者は、脈絡膜血管新生の発生機序に Protein X が関与していることをすでに見出しており、他疾患で線維化との関与が報告されている Protein X が網膜下線維化にも関与していると考えている。本研究では、眼内線維化における Protein X の関与を解明し、独自開発した抗 X 抗体の線維化瘢痕への作用を詳細に検討する。高解像度エピトープマッピングを駆使して作製した抗 X 抗体が滲出型加齢黄斑変性に対する包括的な新規治療薬となる可能性を示すことを目的に研究を進めた。興味深いことに、Protein X を過剰発現させたマウスの心臓で線維化を表す膠原繊維が増加していることが報告されている。しかしながら、眼内線維化に対する Protein X の関与については全く明らかにされていない。Protein X が脈絡膜血管新生の形成自体に関与することから、Protein X の眼内線維化の関与を解明することにより、Protein X は滲出型 AMD の脈絡膜血管新生の発生から線維化形成に至る一連の病態に関わる因子として同定できる可能性が期待できる。

3. 研究の方法

(1) マウスレーザー誘発脈絡膜血管新生モデル

本実験に用いた動物は 8 週齢 C57BL/6J 系統雄性マウスであり、日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。トロピカミド・フェニレフリン塩酸塩 (ミドリン[®]P: mydrin-P) 点眼液をマウスの右眼に点眼し散瞳させた。麻酔後、眼球が乾燥しないように精製ヒアルロン酸ナトリウム (ヒアレイン[®]: hyalein) 点眼液 0.1% を点眼し、カバーガラスを右眼に宛てがいがながら眼底を覗き、レーザー光凝固装置 (MC500; ニデック, Aichi, Japan) を用いて、視神経乳頭の周囲円周上に等間隔に 6 箇所レーザー照射 (波長: 647 nm、スポットサイズ: 50 μ m、照射時間: 100 msec、レーザー出力: 120 mW) を行なった。

(2) マウス眼組織切片の免疫染色

レーザー照射後のマウス眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液 (phosphate buffer: PB) (pH 7.4) を 2 μ L 硝子体内投与し、同液にて 1 晩静置した。次いで、25% スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液に 48 時間静置した。その後、液体窒素を用いて O.C.T. compound (サクラファインテックジャパン, Tokyo, Japan) 内に包埋凍結した。その後、厚さ 10 μ m の切片を作製した。リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffer saline: PBS) で 10 分間洗浄した後、M.O.M blocking reagent (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) にて 1 時間ブロッキングを行った。PBS で 5 分間洗浄後、一次抗体 (溶媒 : M.O.M protein concentrate を PBS で希釈) を 4°C で 1 晩反応させた。二次抗体の反応前に PBS で洗浄した。二次抗体 (溶媒 : M.O.M protein concentrate を PBS で希釈) を 1 時間反応させ、その後 Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて核染色を行った。染色後の組織切片は水溶性封入基材 Fluoromount (Diagnostic Bio Systems, Pleasanton, CA, USA) で封入した。免疫染色後、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて撮影した。

(3) 細胞培養

ヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19) は American Type Culture Collection から購入した。10% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシンを含む dulbecco's modified eagle's medium/ham's F12 nutrient (DMEM/Ham's F-12) (富士フィルム 和光純薬) を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下にて培養した。3~4 日ごとにトリプシン処置により継代を行った。

(4) 免疫細胞染色

細胞にパラホルムアルデヒドを添加して30分後にTriton X-100/PBSを添加し、30分後に0.05% Tweenを含む0.01 M PBS (T-PBS) で洗浄した。1%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) /PBSにて1時間ブロッキングを行った。T-PBSで洗浄後、一次抗体 (溶媒: 1% BSA/PBS) を4°Cで1晩反応させた。二次抗体の反応前にT-PBSで洗浄した。二次抗体 (溶媒: 1% BSA/PBS) を1時間反応させ、その後Hoechst 33342を用いて核染色を行った。その後、ウェル内をPBSで満たして撮影を行った。一次抗体には、rabbit anti-fibronectin antibody (1:500; Abcam) を用いた。二次抗体には、Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG (1:1,000; Thermo Fisher Scientific) を用いた。

(5) ペリサイトの培養

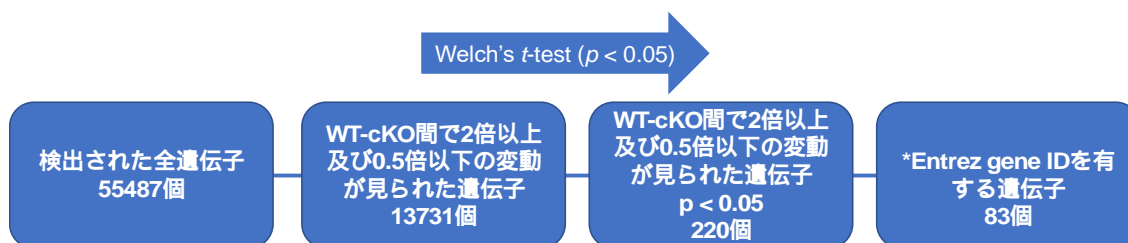
ラット網膜ペリサイト細胞(TR-rPCT)を10% FBS含有DMEMで培養した。細胞密度は、30,000 cells/mLで播種した。培養から48時間後、1.0% FBS含有DMEMへ培地交換し、recombinant rat VEGF (10 ng/mL)、recombinant rat Protein X (20 ng/mL)、recombinant rat TGF- β (5.0 ng/mL)を添加した。培地交換を2日毎に行い、上記試薬の添加も同時に行った。試薬添加から144時間後に細胞をウエスタンブロット解析用に回収した。

(6) ウエスタンブロット解析

SDS polyacrylamide gel (SuperSep 5-20%) (富士フィルム 和光純薬) を泳動装置にセットし、容器に泳動用緩衝液を入れ、ゲルを取り付けた泳動装置を浸した。1ウェルあたりのアプライ量は、分子量マーカー、各サンプルをそれぞれ3 μ L、10 μ Lとした。アプライ後のゲルは、1枚あたり20 mAで泳動を行った。泳動終了後、ゲルはcathode buffer (25 mM Tris、40 mM 6-aminohexanoic acid、20% methanol) に15分間浸した。転写膜はメタノールに15秒間、超純水に15分間、最後にanode buffer 2 (25 mM Tris、20% methanol) に15分間浸した。Anode buffer 1 (0.3 M Tris、20% methanol) を浸したろ紙、anode buffer 2を浸したろ紙、転写膜、ゲル、cathode bufferに浸したろ紙を陽極側から順にセットし、0.8 mA/cm²の条件で転写を行った。転写後は、0.05% Tweenを含む0.01 M tris buffered saline (T-TBS) で洗浄し、Blocking One-P (ナカライテスク, Kyoto, Japan) で30分間ブロッキングした。続いて、T-TBSで洗浄し、一次抗体 (溶媒: Can Get Signal Solution 1) を4°Cで一晩反応させた。T-TBSで洗浄を行い、二次抗体 (溶媒: Can Get signal solution 2) を室温で1時間反応させた。T-TBSで洗浄後、ImmunoStar LD (東洋紡, Osaka, Japan) で発色した。その後、luminescent image analyzer (LAS-4000; Fuji Film, Tokyo, Japan) もしくはAmersham Imager 680 (GE lifescience, Chicago, IL, USA) を用いてバンドを検出した。

(7) RNA シーケンス解析

野生型マウス及び因子 X conditional knockout (cKO) マウスを用いて、レーザー照射誘発脈絡膜血管新生モデルを作製し、脈絡膜血管新生エリアの組織を採集した。その組織を用いてRNA抽出を行い、以下の流れでRNA シーケンス解析を実施した。



4. 研究成果

(1) マウスレーザー照射誘発脈絡膜血管新生モデルにおける線維瘢痕形成と Protein X の局在
 レーザー照射 7 日後において、 α -SMA 及び collagen I の発現増大が確認され、新生血管が明瞭に確認できるレーザー照射 14 日後では α -SMA 及び collagen I の発現がさらに亢進した。レーザー照射 28 及び 35 日後においては、RPE 及びその近傍で collagen I の蓄積が見られ、組織の線維化が認められた (図 1)。レーザー照射 28 日後の collagen I 陽性細胞と Protein X の発現が共局在していた (図 2)。Protein X は脈絡膜血管新生に起因する線維化促進に関与している可能性が示唆された。

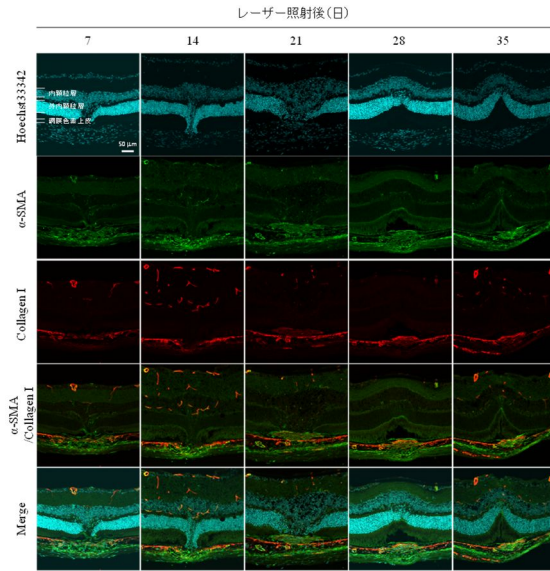


図1. 脈絡膜血管新生部位における線維化関連因子の発現

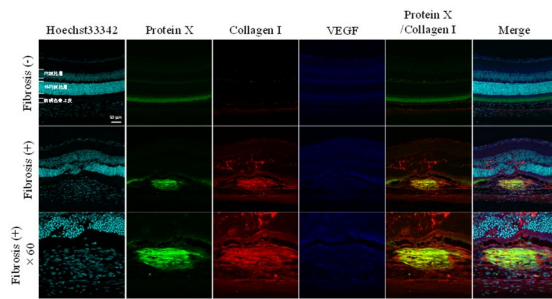


図2. 脈絡膜血管新生線維化部位におけるProtein Xの局在

(2) 網膜色素上皮細胞における Protein X の線維化促進作用

滲出型加齢黄斑変性の瘢痕形成の病変部位の一部と想定される網膜色素上皮細胞を用いた実験系で、Protein X が線維化マーカーの fibronectin を過剰に発現させることを見出した (図 3)。Protein X の線維化促進作用は陽性対照群の TGF β 添加群と同等程度であった。加えて、高解像度エピトープマッピングを駆使した実験手法により Protein X を標的にした新規中和抗体の作製に着手し、既存抗体よりも中和活性の高い抗 X 抗体を作製した (図 4)。エピトープ均質化抗体パネルを用いた既知抗原から新規の機能を発掘可能な技術 (特願 2018 - 551721、PCT/JP2017/041683) を用いて、Protein X における機能エピトープ領域構造を特定し、医薬品開発に有用な構造を同定した。結果、既存抗体よりも中和活性に優れた機能抗体の作出に成功した。

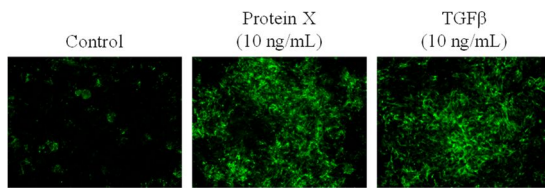


図3. Fibronectinの発現誘導

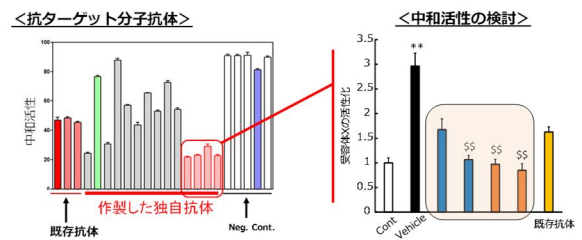


図4. 抗X抗体の作製

**P<0.01, vs. Control (Student's *t*-test). \$\$P<0.01, vs. 既存抗体 (Student's *t*-test).

(2) ペリサイト細胞における Protein X の線維化促進作用

ペリサイトは血管壁を離れると fibroblast 様細胞に形質転換することが知られており、眼内において Protein X はこの形質転換を促す可能性を考えた。網膜ペリサイト細胞を用いた *in vitro* の検討において、TGF β は線維化マーカーである fibronectin 及び α -SMA の発現を顕著に増大させたが、Protein X によるこれらの因子の発現亢進は認められなかった (図 3)。Protein X は単独ではペリサイトの線維化あるいは EMT を促進しない可能性が考えられる。

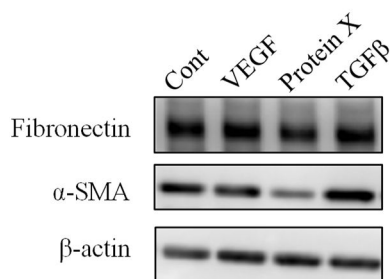


図5. ペリサイトに対する Protein X の作用

(3) Protein X の線維化促進機構に関する ncRNA の同定

Protein X の線維化促進分子機構に関する機能解析を目的に研究を進めた。滲出型加齢黄斑変性のモデルとして汎用されているマウスレーザー照射脈絡膜血管新生モデルを用いた検討から、Protein X 欠損マウスにおいて線維化が抑制されることを既に見出している。そこで、Protein X 欠損マウスと野生型マウスのそれぞれの線維化部位を採集し、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子発現解析を実施した。Protein X 欠損マウスと比較して、野生型マウスの線維化組織において non-coding RNA (ncRNA) X の発現が 10 分の 1 程度に減少した。さらに、同モデルの線維化部と非線維化部を比較すると、ncRNA X は線維化部において顕著な増大を認めた。ncRNA X は胆管の線維化を認めるマウスモデルの肝細胞で発現増加することが報告されているが、詳細な機能や生物学的意義は不明である。眼内の線維化制御因子としての ncRNA X の機能解析は Protein X の線維化機構解明に繋がる可能性がある。

これらの検討により、我々は滲出型加齢黄斑変性における線維化促進新規因子として Protein X を同定し、Protein X を標的とした現状得られる抗体の中で最も中和活性の高い抗体の作製に成功した。また、Protein X が網膜色素上皮細胞の線維化促進機構に ncRNA X の関与が推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	鎌田 春彦 (Kamada Haruhiko) (00324509)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー (84420)	
研究分担者	原 英彰 (Hara Hideaki) (20381717)	岐阜薬科大学・薬学部・学長 (23701)	

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