

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09983

研究課題名(和文) フックス角膜内皮ジストロフィの病態におけるmTORシグナルの意義

研究課題名(英文) Significance of mTOR signaling in the pathogenesis 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) 3,300,000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)は角膜内皮細胞の進行性の障害により、重症の視力障害を生じる疾患であるが、原因不明で角膜移植以外に治療法がない。我々は疾患モデル細胞を用いた薬剤スクリーニングにより、mTOR阻害剤であるrapamycinがFECD患者の角膜内皮細胞死を抑制することを発見した。本研究ではmTORシグナルの阻害がFECDにおける角膜内皮細胞死と細胞外マトリックス過剰産生を抑制する作用機序を、疾患モデル細胞および患者角膜組織を用いた研究により明らかにした。また、mTORノックアウトの作成に成功した。

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。本研究はFECDの病態におけるmTORシグナルの関与の解明につながるものであり、mTORシグナルがFECDにおける角膜内皮障害の治療ターゲットとなる可能性を示した。角膜移植に代わる保存的治療薬の開発は、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もつながるものであり、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 progressive disorder of corneal endothelial cells that results in severe visual impairment, but the cause is unknown and there is no treatment other than corneal transplantation. We screened drug candidates using cell models of the disease and found that the mTOR inhibitor, rapamycin, suppressed corneal endothelial cell death in patients with FECD. In the present study, we elucidated the mechanism of action by which inhibition of mTOR signaling suppresses corneal endothelial cell death and extracellular matrix hyperproduction in FECD by using disease model cells and patient corneal tissue. In addition, we have also succeeded in generating mTOR knockout mice.

研究分野：眼科学

キーワード：フックス角膜内皮ジストロフィ 薬物治療 mTORシグナル ラパマイシン 創薬

## 1. 研究開始当初の背景

フックス角膜内皮ジストロフィ (Fuchs endothelial corneal dystrophy; FECD) は、角膜の透明性維持に不可欠な角膜内皮細胞が進行性に障害される疾患であり、進行すると角膜が白濁することで視力障害を生じる重症疾患である。

FECD 患者の角膜では、臨床的に①角膜内皮細胞障害と、②細胞外マトリックスの基底膜への異常沈着 (guttae) が認められ、細胞障害が進行すると角膜内皮機能不全により角膜が膨潤し混濁することで重篤な視力障害を生じる。また角膜内皮機能が代償されていても、早期から guttae による光の散乱により視機能が低下する。現在、FECD に対する唯一の治療法はドナー角膜を用いた角膜移植である。FECD は特に白人における罹患率が高く (40 歳以上の人口の約 4%)、世界で行われている角膜移植の原因疾患の第一位 (約 40%) を占める重要疾患である。一方、角膜移植には移植片不全、ドナー不足、拒絶反応などの問題があり、FECD に対する薬物治療の開発は眼科医療における unmet medical needs である。

FECD の病態に関して、これまでにミトコンドリア異常、酸化ストレス、小胞体ストレス、toxic RNA などの関与が報告されているが未だ不明点が多い。申請者は FECD 患者より採取した角膜内皮細胞を培養し不死化することにより FECD 疾患モデル細胞を樹立した。また、疾患モデル細胞や患者検体を用いた解析により、FECD の病態の本質は「TCF4 遺伝子の角膜内皮における発現上昇が、TGF- $\beta$  シグナルの活性化による細胞外マトリックスの過剰産生の原因となり、変性タンパク質の蓄積が小胞体ストレス応答を介した角膜内皮細胞のアポトーシスを引き起こす」という仮説を立てた。さらに、疾患モデル細胞に TGF- $\beta$  を添加すると、小胞体ストレス応答を介するアポトーシスが生じるという現象を応用し、cell-based の薬物スクリーニング系を構築した。

本スクリーニング系を用いてカスパーゼ 3/7 活性を指標に FDA 承認薬ライブラリー 765 種類の薬剤のスクリーニングを行ったところ、TGF- $\beta$  刺激により誘導されるカスパーゼ 3/7 活性率を 60%以下に抑制する薬剤が 46 種類あり、なかでも mTOR 阻害剤である rapamycin が細胞死を強く抑制することを見出した。そこで我々は、mTOR 阻害剤が FECD に対する治療薬として開発できる可能性があると考え、FECD モデルマウスに mTOR 阻害剤を点眼薬として投与し、vivo における効果を検証した。3 ヶ月の点眼により角膜内皮障害が抑制され、有意に高い細胞密度が維持され、さらに guttae の形成が有意に抑制されることを予備的に確認した。一方で、mTOR 阻害剤の FECD に対する有用性は薬剤スクリーニングにより見出されたものであり、その作用機序は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、mTOR シグナルの阻害が FECD における角膜内皮細胞死と細胞外マトリックス過剰産生を抑制する作用機序を明らかにし、FECD の病態における mTOR シグナルの意義を解明することである。

## 3. 研究の方法

本研究では、mTOR シグナルの活性化がどのように FECD における角膜内皮細胞死と細胞外マトリックス過剰産生を生じているのかについて in vitro および in vivo の研究を通じてその機序を明らかにすることを目指した。FECD に対して mTOR 阻害剤が有用であることは、スクリーニングにより発見したものであるが、我々は mTOR の文献調査および予備的な実験により、TGF-

$\beta$  シグナルの活性化が mTOR シグナルを活性化させ、細胞外マトリックス関連タンパク質の過剰産生をきたしているのではないかという作業仮説を立て、以下の方法で研究を行った。

(1) mTOR 活性化と細胞外マトリックス産生および小胞体ストレス応答の検討

FECD 患者由来疾患モデル細胞において rapamycin のみならず他の mTOR 阻害剤や mTOR のノックアウトが、フィブロネクチンや I 型コラーゲンなど細胞外マトリックスの産生を抑制するかどうかを検討した。また、小胞体センサー、ミトコンドリア経路、アポトーシス関連タンパク質の活性化などを指標に、FECD 疾患モデル細胞における mTOR シグナルの阻害が小胞体ストレス応答に与える影響を評価した。

(2) FECD 患者の角膜内皮組織における mTOR シグナルの検討

角膜移植予定の FECD 患者より事前に書面同意を得て、角膜移植時に採取した角膜内皮を含むデスメ膜を用いて研究を行った。本研究は、ドイツエルランゲン大学の Kurse 教授との共同研究として、同志社大学大学院生命医科学研究科の大学院生をドイツに派遣して実施した。

(3) FECD モデルマウスにおける mTOR ノックアウトの疾患フェノタイプへの影響の検討

FECD モデルマウス (VIII 型コラーゲン変異マウス) と mTOR ヘテロノックアウトマウスを掛け合わせることで、mTOR ノックアウトの FECD の角膜内皮の疾患表現型への影響を検討した。本研究は、大阪大学微生物病研究所の伊川正人教授との共同研究として行った。

#### 4. 研究成果

(1) mTOR 活性化と細胞外マトリックス産生および小胞体ストレス応答の検討

FECD 患者より採取した角膜内皮から樹立した疾患モデル細胞において、TGF- $\beta$  刺激により細胞死を誘導し、mTOR 阻害剤 (temsirolimus) および mTOR ノックダウンのフィブロネクチン産生、小胞体ストレスセンサーおよびカスパーゼ 3 の活性化への影響をウエスタンブロット法にて評価した。タンパク質合成中に取り込まれる homopropargylglycine (HPG) についても免疫染色により評価した。また、mTOR の活性化により形成される eIF4E 複合体の阻害剤である 4E1RCat の疾患モデル細胞に対する影響も同様に評価した。疾患モデル細胞において TGF- $\beta$  によりフィブロネクチンの発現が亢進した一方で、temsirolimus および mTOR のノックダウンによりフィブロネクチンの発現は低下した。同様に、temsirolimus によりタンパク質合成中の HPG の取り込みが抑制された。TGF- $\beta$  による小胞体ストレスセンサーの活性化および細胞死は temsirolimus により抑制された。また、eIF4F 阻害剤は temsirolimus と同様に、TGF- $\beta$  により誘導されるフィブロネクチンの発現亢進、カスパーゼ 3 の活性化、細胞死を抑制した。以上の結果より、mTOR 阻害剤は eIF4F 複合体の形成を阻害し細胞外マトリックスの過剰産生を抑制することで小胞体ストレスを抑制し、FECD における角膜内皮細胞死を抑制する可能性が示唆された。

(2) FECD 患者の角膜内皮組織における mTOR シグナルの検討

角膜移植予定の FECD 患者 (32 名、年齢  $69.6 \pm 1.6$  歳) より事前に書面同意を得て、角膜移植時に採取した角膜内皮を含むデスメ膜を用いて研究を行った。コントロールとして正常ドナー角膜 (4 眼、年齢  $63.0 \pm 13.1$  歳) を用いた。ウエスタンブロット法により、mTOR、リン酸化 mTOR、S6K、リン酸化 S6K の発現を評価した。また我々が既に取得した RNAseq のデータより mTOR に関する分子の発現を調べた。その結果、FECD 患者角膜内皮ではコントロールと比較して、mTOR は 3.20 倍 ( $p < 0.01$ )、リン酸化 mTOR は 1.92 倍 ( $p < 0.05$ )、S6K は 1.34 倍

( $p = 0.29$ )、リン酸化 S6K は 1.82 倍 ( $p < 0.05$ ) の発現を認めた。mRNA レベルでは、mTOR、S6K、4EBP1 の発現レベルは FECD 患者とコントロールで有意な差を認めなかった。以上の結果より、FECD 患者角膜内皮では、コントロールと比べて mTOR および S6K のリン酸化が上昇

しており、mTOR/S6K 経路が活性化していることが示された。

(3) FECD モデルマウスにおける mTOR ノックアウトの疾患フェノタイプへの影響の検討  
Johns Hopkins 大学から分与された FECD 疾患モデルマウス (VIII 型コラーゲン変異マウス) と *Mtor* ノックアウトマウスを交配させたマウス (FECD-*Mtor* KO マウス) を作製し、20、40、60 週齢時にスペキュラーマイクروسコープを用いて角膜内皮細胞の形態的特徴を解析した。また採取した角膜内皮細胞の遺伝子発現を調べた。

また、*Mtor* 遺伝子はホモ欠損を行うと胚性致死となることが報告されているため、角膜組織特異的に *Mtor* 遺伝子の発現を抑制する *Mtor* コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製した。現在、同志社大学において *Mtor* cKO マウスを FECD 疾患モデルマウスと掛け合わせたマウス (FECD-*Mtor* cKO マウス) を作製し、フェノタイプの解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 2件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Okumura Naoki, Koizumi Noriko  | 4. 巻<br>45              |
| 2. 論文標題<br>Regeneration of the Corneal Endothelium   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Current Eye Research   | 6. 最初と最後の頁<br>303 ~ 312 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/02713683.2019.1700529  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Okumura Naoki, Hayashi Ryouzuke, Nakano Masakazu, Tashiro Kei, Yoshii Kengo, Aleff Ross, Butz Malinda, Highsmith Edward W., Wieben Eric D., Fautsch Michael P., Baratz Keith H., Komori Yuya, Ueda Emi, Nakahara Makiko, Weller Julia, Tourtas Theofilos, Schl?tzer-Schrehardt Ursula, Kruse Friedrich, Koizumi Noriko | 4. 巻<br>38              |
| 2. 論文標題<br>Association of rs613872 and Trinucleotide Repeat Expansion in the TCF4 Gene of German Patients With Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Cornea   | 6. 最初と最後の頁<br>799 ~ 805 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1097/ICO.0000000000001952   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Okumura Naoki, Puangsrucharern Vilavun, Jindasak Raina, Koizumi Noriko, Komori Yuya, Ryouzuke Hayashi, Nakahara Makiko, Nakano Masakazu, Adachi Hiroko, Tashiro Kei, Yoshii Kengo, Chantaren Patchima, Ittiwut Rungnapa, Shotelersuk Vorasuk, Suphapeetiporn Kanya   | 4. 巻<br>34              |
| 2. 論文標題<br>Trinucleotide repeat expansion in the transcription factor 4 (TCF4) gene in Thai patients with Fuchs endothelial corneal dystrophy  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Eye  | 6. 最初と最後の頁<br>880 ~ 885 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41433-019-0595-8  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Okumura Naoki, Koizumi Noriko  | 4. 巻<br>15              |
| 2. 論文標題<br>Review and perspective of tissue engineering therapy for the treatment of corneal endothelial decompensation  | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Expert Review of Ophthalmology   | 6. 最初と最後の頁<br>347 ~ 354 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/17469899.2020.1811088  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Tokuda Yuichi, Okumura Naoki, Komori Yuya, Hanada Naoya, Tashiro Kei, Koizumi Noriko, Nakano Masakazu | 4. 巻<br>7          |
| 2. 論文標題<br>Transcriptome dataset of human corneal endothelium based on ribosomal RNA-depleted RNA-Seq data      | 5. 発行年<br>2020年    |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Data   | 6. 最初と最後の頁<br>407- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41597-020-00754-1  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Schl?tzer-Schrehardt Ursula, Zenkel Matthias, Strunz Maria, Gie?l Andreas, Schondorf Hannah, da Silva Heather, Schmidt Gregory A., Greiner Mark A., Okumura Naoki, Koizumi Noriko, Kinoshita Shigeru, Tourtas Theofilos, Kruse Friedrich E. | 4. 巻<br>224             |
| 2. 論文標題<br>Potential Functional Restoration of Corneal Endothelial Cells in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy by ROCK Inhibitor (Ripasudil)   | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>American Journal of Ophthalmology   | 6. 最初と最後の頁<br>185 ~ 199 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ajo.2020.12.006   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|   |                                |
|---|--------------------------------|
| 1. 著者名<br>Thuret Gilles, Ain Anthony, Koizumi Noriko, Okumura Naoki, Gain Philippe, He Zhiguo | 4. 巻<br>Publish Ahead of Print |
| 2. 論文標題<br>Radial Endothelial Striae Over 360 Degrees in Fuchs Corneal Endothelial Dystrophy  | 5. 発行年<br>2021年                |
| 3. 雑誌名<br>Cornea  | 6. 最初と最後の頁<br>-                |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1097/ICO.0000000000002666                                      | 査読の有無<br>有                     |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                   |

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| 1. 著者名<br>Okumura Naoki, Velumani Thenmozhi, Hadiya Farhath, Padmanaban Vasanthi, Komori Yuya, Hanada Naoya, Hirono Taisuke, Srinivas Sangly P., Koizumi Noriko, Padmanabhan Prema | 4. 巻<br>Publish Ahead of Print |
| 2. 論文標題<br>Analysis of Immune Cells on Donor Corneal Endothelium After Corneal Transplantation Using the HRT-Rostock Cornea Module   | 5. 発行年<br>2021年                |
| 3. 雑誌名<br>Cornea   | 6. 最初と最後の頁<br>-                |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1097/ICO.0000000000002706   | 査読の有無<br>有                     |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                   |

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| 1. 著者名<br>Okumura Naoki, Yamada Shohei, Nishikawa Takeru, Narimoto Kaito, Okamura Kengo, Izumi Ayaka, Hiwa Satoru, Hiroyasu Tomoyuki, Koizumi Noriko | 4. 巻<br>Publish Ahead of Print |
| 2. 論文標題<br>U-Net Convolutional Neural Network for Segmenting the Corneal Endothelium in a Mouse Model of Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy         | 5. 発行年<br>2021年                |
| 3. 雑誌名<br>Cornea   | 6. 最初と最後の頁<br>-                |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1097/IC0.0000000000002956   | 査読の有無<br>有                     |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                   |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Okumura Naoki, Padmanaban Vasanthi, Balaji Janarthanam Jothi, Srinivasan Bhaskar, Hanada Naoya, Komori Yuya, Yoshii Kengo, Srinivas Sangly P., Koizumi Noriko, Padmanabhan Prema | 4. 巻<br>41              |
| 2. 論文標題<br>Clinical, Morphological, and Optical Correlates of Visual Function in Patients With Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy   | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Cornea   | 6. 最初と最後の頁<br>171 ~ 176 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1097/IC0.0000000000002814   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>6. 大山裕貴, 奥村直毅, 小森裕也, 中野正和, 徳田雄市, Theofilos Tourtas, Friedrich E. Kruse, Matthias Zenkel, Ursula Schlotzter-Schrehardt, 小泉範子 |
| 2. 発表標題<br>フックス角膜内皮ジストロフィ患者角膜内皮におけるmTOR/S6K経路の活性化の検討.  |
| 3. 学会等名<br>角膜カンファランス2021. 第45回日本角膜学会総会・第37回日本角膜移植学会  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Nakagawa R, Okumura N, Onishi T, Oshima T, Ueda E, Watanabe K, T. Tourtas, U. Schlotzter-Schrehardt, F. E. Kruse, Koizumi N |
| 2. 発表標題<br>Drug discovery for the treatment of Fuchs corneal endothelial dystrophy by cellbased drug screening system.                 |
| 3. 学会等名<br>The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2019 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Nakayama G, Okumura N, Oshima T, Ueda E, Watanabe K, T. Tourtas, U. Schlotzer-Schrehardt, F. E. Kruse, Koizumi N |
| 2. 発表標題<br>Feasibility of mTOR inhibitor for the treatment of Fuchs endothelial corneal dystrophy.                          |
| 3. 学会等名<br>The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2019 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|  |
|--|
| 同志社大学生命医科学部ティッシュエンジニアリング研究室<br><a href="http://tissue-engineering-doshisha.jp/">http://tissue-engineering-doshisha.jp/</a> |
|--|

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|---|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 奥村 直毅<br><br>(OKUMURA Naoki)                    | 同志社大学・生命医科学部・教授       |    |
| 研究協力者 | 伊川 正人<br><br>(IKAWA Masahito)<br><br>(20304066) | 大阪大学・微生物病研究所・教授       |    |

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  |  |  |  |
|---------|----------|--|--|--|
| ドイツ     | エルランゲン大学 |  |  |  |