

令和 3 年 4 月 12 日現在

機関番号：17102  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2020  
課題番号：19K18846  
研究課題名(和文) ROCK阻害剤を用いた抗VEGF治療抵抗性糖尿病黄斑浮腫に対する新規治療法の開発  
  
研究課題名(英文) Development of a novel treatment for anti-VEGF resistant diabetic macular edema using ROCK inhibitor  
  
研究代表者  
有馬 充 (Arima, Mitsuru)  
  
九州大学・大学病院・学術研究員  
  
研究者番号：60772845  
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)：糖尿病黄斑浮腫(DME)に対するfirst choiceは抗血管内皮増殖因子抗体の硝子体注射(抗VEGF治療)であるが、約4割が治療抵抗性(rDME)である。我々はrDME患者から採取した硝子体及びrDME動物モデル網膜の解析により、rDME病態にROCKが関与することをすでに同定している。本研究ではROCK(特にROCK2)が網膜炎症の惹起および炎症性サイトカインによるBRB破綻を介してrDME形成に関与することを明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦におけるDME患者数は約60万人に上ると推定されている。抗VEGF治療抵抗DMEに対しては現在打つ手がなく、視機能低下を抑止する術がない。本研究で我々は、ROCKがrDME治療標的分子となることを示した。海外との共同研究により、ROCK阻害剤のrDMEへの治療効果も確認している。DMEは壮年期にも発症する疾患であるため、臨床応用できれば多数の患者の社会復帰に貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：The first treatment modality for diabetic macular edema (DME) is intravitreal injection of anti-vascular endothelial growth factor agents (anti-VEGF treatment), but about 40% of patients are resistant to anti-VEGF treatment (rDME). We have already identified the involvement of ROCK in the pathogenesis of rDME by analyzing vitreous samples from rDME patients and retinal samples from rDME animal models. In this study, we demonstrated that ROCK (especially ROCK2) is involved in rDME formation through the BRB disruption by inflammatory cytokines.

研究分野：血液網膜関門

キーワード：糖尿病黄斑浮腫 抗VEGF治療 ROCK 分子標的治療

### 1. 研究開始当初の背景

本邦での糖尿病網膜症(DR)罹患数は約100万人に上る。糖尿病黄斑浮腫(DME)はDRにおける視力障害の主因病態であり、DRの約3割に合併する(Ophthalmology.2015)。大規模臨床試験の結果から、DMEへの抗VEGF治療の有効性が示され(Ophthalmology.2016)、現在DME治療の第一選択となっているが、同時に複数年継続的に抗VEGF治療を行っても約4割には効果が乏しいことも証明されている(JAMA ophthalmol.2018)。現時点でこのような抗VEGF治療抵抗性DMEに対する有効な治療法はなく視力低下を防ぐ術がないことが大きな問題となっている。我々はrDME患者から採取した硝子体及びrDME動物モデル網膜の解析により、rDME病態にROCKが関与することを同定した。既に動物モデルを用いて、ROCK阻害剤(リパスジル塩酸塩水和物)によりrDMEが軽減することを確認している。そこで本研究では、ROCKの分子機序同定に取り組んだ。

### 2. 研究の目的

DMEは血液網膜関門(BRB)の破綻により生じる。そこでBRBの機能維持に必須の分子であるclaudin-5の発現調節にROCKがどのように関わるのか、その具体的作用機序を解明することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### a. rDMEモデルマウスを用いた、リパスジルの薬効機序検証

ヒトDME硝子体中VEGF・炎症性サイトカインの発現解析から、VEGF高発現遷延化が炎症を誘発しrDME形成を促すという仮説を立て、視細胞特異的ヒトVEGF強制発現マウス(Kimbaマウス)の表現型を確認したところ、rDMEと同様の病態を再現することができた。さらにKimbaマウス網膜の網羅的解析からROCK活性化を同定し、ROCK阻害剤リパスジル点眼により網膜浮腫が軽減することを確認している(2017~2018年度科研費若手研究B)。そこで2~3週齢のKimbaマウスを用いてリパスジルの薬効機序検証を行った。治療タイムコースを図1に示す。

具体的には、網膜光干渉断層計(OCT)による網膜厚の計測、claudin-5の免疫染色、PCRによる網膜中の炎症性サイトカインの定量を行った。

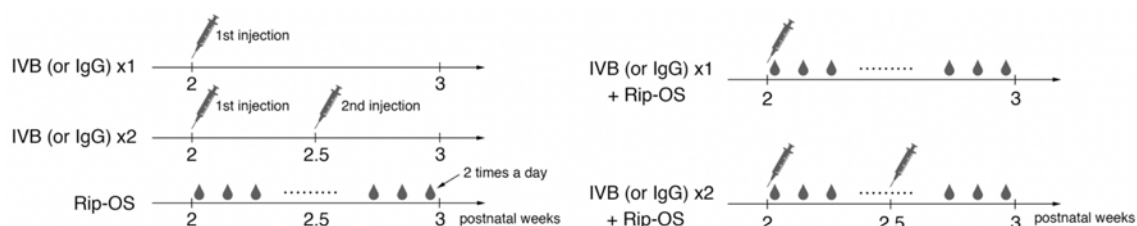


図1. rDMEマウスに対する治療タイムコース

2週齢のrDMEマウスに対し、抗VEGF抗体であるベバシズマブもしくはIgG硝子体注射(IVBもしくはIgG)、リパスジル点眼(Rip-OS)を施行し、3週齢で各種実験を行った。

#### b. 培養血管内皮細胞を用いた、リパスジルの薬効機序検証

マウス脳血管内皮細胞株bEND.3を用いて、リパスジルの薬効機序検証を行った。具体的には、培養血管内皮細胞をリパスジルで前処置後、VEGF及びTNF, IL-6, MCP-1で刺激し、血管内皮細胞間密着構造の主要構成分子であるclaudin-5発現変化を免疫染色とWBにて確認した。また、claudin-5の裏打ちタンパク質であるZO-1やアクチン線維(F-actin)の発現変化を免疫染色で確認し、ZO-1とclaudin-5の結合量の変化を免疫沈降にて検証した。さらに、claudin-5 mRNA量の変化もPCRで定量した。リパスジルがclaudin-5転写機構にどのように作用するか確かめるために、接着構造構成分子であるVE-cadherinとその裏打ちタンパク質であるβ-cateninの免疫染色およびβ-cateninによるクロマチン免疫沈降を行った。

ROCKにはROCK1, ROCK2の2つのアイソフォームが存在し、リパスジルは両アイソフォームの活性を抑制する。CRISPR/Cas9を用いてROCK1/2 KO bEND.3を作成し、どちらがclaudin-5発現調節機構により関与するのか検証した。

#### c. ヒトrDME患者における、ROCK阻害剤の薬効機序検証

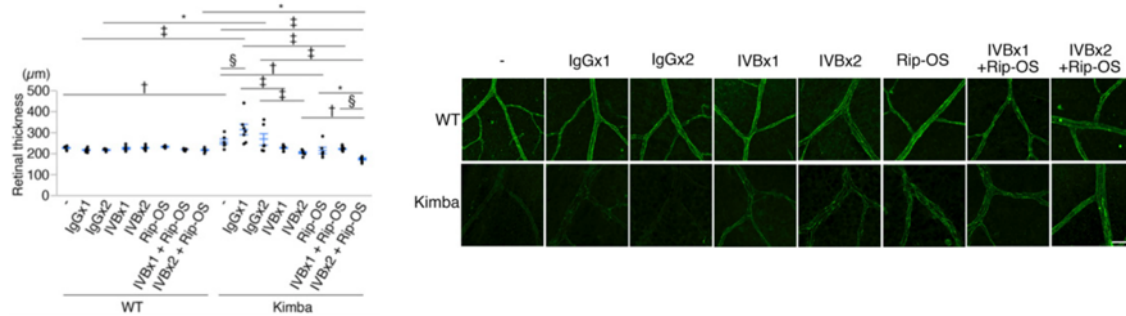
Shahid Beheshti Universityと共同研究を行い、rDMEに対するROCK阻害剤(ファスジル)硝子体注射(IVF)の効果検証を行った。IVB単独療法で再燃をきたした症例に対し、IVB+IVFを行い、血管透過性亢進を蛍光眼底造影検査で、網膜厚を網膜光干渉断層計で検証した。IVBとIVB+IVF併用療法は少なくとも3ヶ月の間隔をあけた。

#### 4. 研究成果

##### a. rDME モデルマウスを用いた、リパスジルの薬効機序検証

3週齢の野生マウス (WT) 並びに rDME マウスの網膜における網膜厚計測結果及び claudin-5 免疫染色結果を図 2 に示す。IVBx2+Rip-OS で最も効果を認めており、両治療法に相乗効果があることがわかった。

図 2. リパスジル点眼による網膜厚 (左) 及び claudin-5 発現 (右) の変化



IVBx2+Rip-OS で Kimba マウスの網膜厚は最も減少し、claudin-5 の低下も抑制された。平均値±標準誤差, n=6, † P<0.05, \*P<0.01, §P<0.001, ‡P<0.0001, Student's t test. スケールバー=50 μm

ROCK が VEGF とは別機序で BRB 破綻、claudin-5 発現低下に関与していることが示唆されたため、網膜内における炎症性サイトカイン (TNF, IL-6, MCP-1) の発現を検証した (図 3)。Kimba マウスにおける炎症性サイトカインの発現はリパスジルにより減少したが、IVB, Rip-OS 単独療法と IVBx2+Rip-OS 間で有意差はなかった。

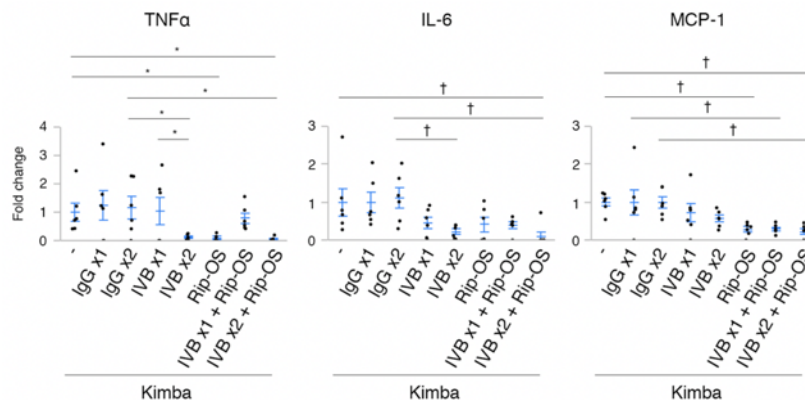


図 3. リパスジル点眼による炎症性サイトカインの発現量の変化

IVB, Rip-OS 単独療法でも TNF, IL-6, MCP-1 の発現は IVBx2+Rip-OS と同等に低下していた。平均値±標準誤差, WT は n=3, Kimba は n=6, \*P<0.05, † P<0.01, Student's t test.

##### b. 培養血管内皮細胞を用いた、リパスジルの薬効機序検証

ROCK は網膜炎症を鎮静化する作用を有するものの、それだけでは IVBx2+Rip-OS の相乗効果を説明できない。我々は ROCK が炎症性サイトカインの下流分子として作用し、直接 claudin-5 の発現を調節しているのではないかと仮説を立て、培養血管内皮細胞を用いてリパスジルの効果を検証した。Claudin-5, ZO-1, F-actin の免疫染色結果を図 4 に示す。リパスジルにより claudin-5 や ZO-1 の発現が維持され、アクチン重合が阻害されることが示された。

また、ZO-1 と claudin-5 の結合量の変化を免疫沈降にて検証したところ、リパスジルにより ZO-1 と claudin-5 の結合が保持されたことから (図 5)、リパスジルがアクチン重合による細胞骨格の変化を抑制することで ZO-1 と claudin-5 の解離を抑制し、claudin-5 の細胞膜からの消失を抑制することが示唆された。

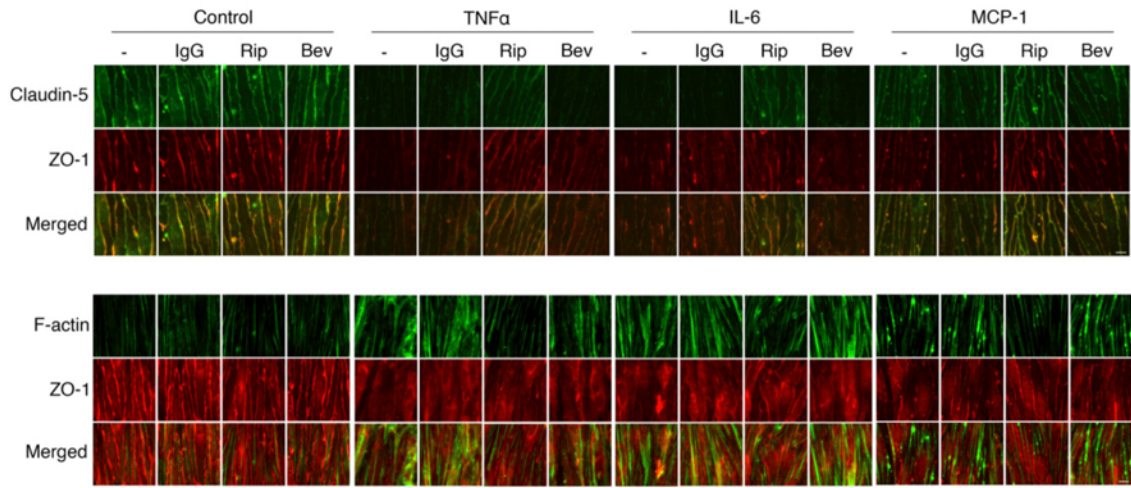


図 4. リパスジルによる claudin-5, ZO-1 消失抑制、アクチン重合抑制

炎症性サイトカイン刺激による claudin-5, ZO-1 の細胞膜からの消失、アクチン重合はベバシズマブでは抑制できないが、リパスジルによって抑制される。Rip=リパスジル, Bev=ベバシズマブ, n=3, †P<0.05, \*P<0.01, §P<0.001, ‡P<0.0001, Student's t test. スケールバー=10 μm

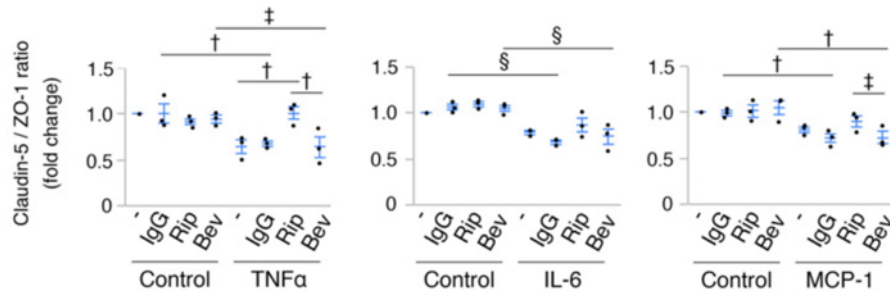


図 5. リパスジルによる ZO-1 と claudin-5 の解離抑制

炎症性サイトカイン刺激による ZO-1 と claudin-5 の結合の解離が、リパスジルによって抑制される。平均値±標準誤差, n=3, †P<0.05, \*P<0.01, §P<0.001, ‡P<0.0001. Student's t test.

タンパク質の発現は分解だけでなく産生量によっても規定されるため、claudin-5 mRNA 量の比較を行ったところ、興味深いことにリパスジルによって claudin-5 転写量が上昇することがわかった (図 6)。

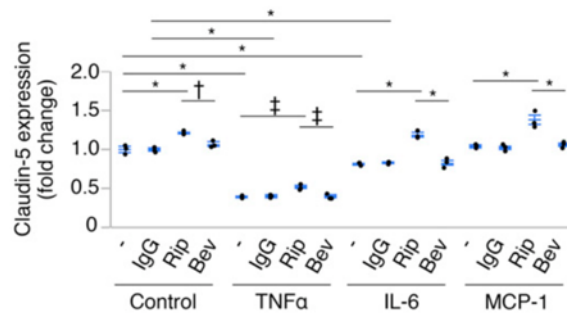


図 6. リパスジルによる claudin-5 mRNA 量の上昇

炎症性サイトカイン刺激による claudin-5 mRNA の低下が、リパスジルによって有意に上昇しており、claudin-5 の転写が活性化されていることが示唆される。平均値±標準誤差, n=3, †P<0.05, \*P<0.01, §P<0.001, ‡P<0.0001, Student's t test.

既報によると(Nat Cell Biol.2008)、接着構造構成分子である VE-cadherin の裏打ちタンパク質である β-catenin が claudin-5 の転写に重要な役割を担っており、β-catenin が核内へ移行し claudin-5 のプロモーター領域に結合すると claudin-5 の転写が off になる。そこで VE-cadherin と β-catenin の免疫染色を行ったところ、TNF, MCP-1 刺激においては VE-cadherin の細胞膜への発現が低下し、β-catenin が細胞膜直下から遊離する像が得られた。β-catenin によるクロマチン免疫沈降を行ったところ、TNF, MCP-1 刺激においてはリパスジルにより確かに β-catenin の claudin-5 プロモーター領域への結合が抑制されており、核内移行が抑えられていることが示された (図 7)。以上から、リパスジルは分解・産生の両側面から claudin-5 の細胞膜へ

の発現維持に貢献していることが示唆された。

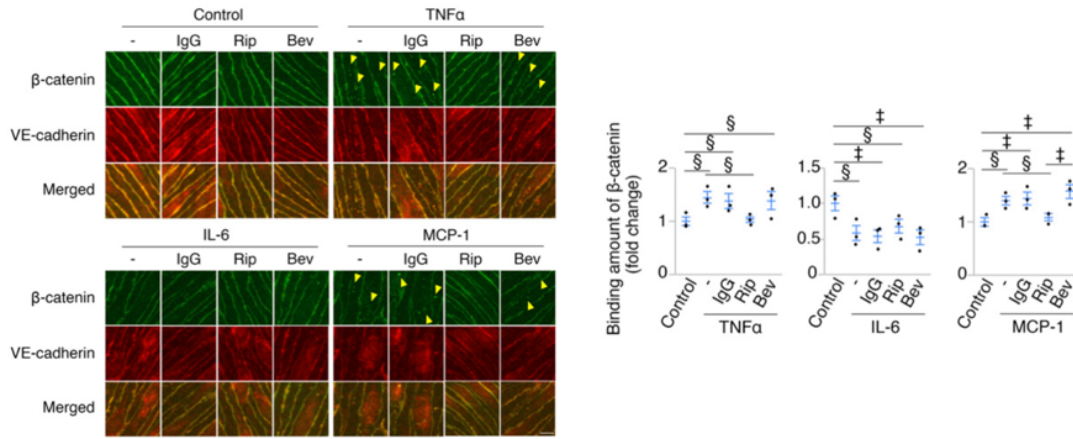


図 7. リパスジルによる  $\beta$ -catenin の局在 (左) と  $\beta$ -catenin の claudin-5 プロモーター領域への結合量 (右) の変化

TNF, MCP-1 刺激では、VE-cadherin の発現が減少するとともに  $\beta$ -catenin は細胞質へ遊離する (黄矢頭) が、リパスジルによりこの現象は抑制される。また、 $\beta$ -catenin によるクロマチン免疫沈降では、TNF, MCP-1 刺激による  $\beta$ -catenin の claudin-5 プロモーター領域への結合量増加が、リパスジルにより抑制された。Rip=リパスジル, Bev=ベバシズマブ, 平均値±標準誤差, n=3, †P<0.05, \*P<0.01, §P<0.001, ‡P<0.0001, Student's t test. スケールバー=10  $\mu$  m

リパスジルは ROCK の 2 つのアイソフォーム、ROCK1, ROCK2 の活性を共に阻害する。ROCK1 KO, ROCK2 KO bEND.3 を作成し、claudin-5 の発現変化を追ったところ、ROCK2 が claudin-5 発現調節機構に関与していることがわかった (図 8)。

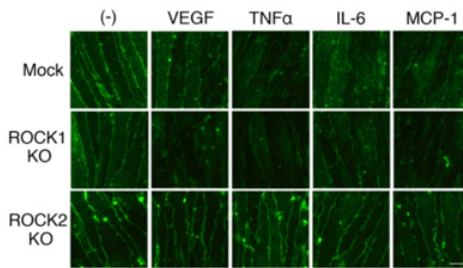


図 8. Claudin-5 発現調節

機構への ROCK2 の関与

ROCK2 をノックアウトすることで claudin-5 の発現が維持された。n=4, スケールバー=10  $\mu$  m

c. ヒト rDME 患者における、ROCK 阻害剤の薬効機序検証

Shahid Beheshti University との共同研究により、ヒト rDME に対する ROCK 阻害療法の効果を検証した。IVB+IVF 併用療法で rDME における血管透過性亢進は抑制され、網膜厚も減少した (図 9)。今後さらに n 数を増やし、有効性検証を行う予定である。

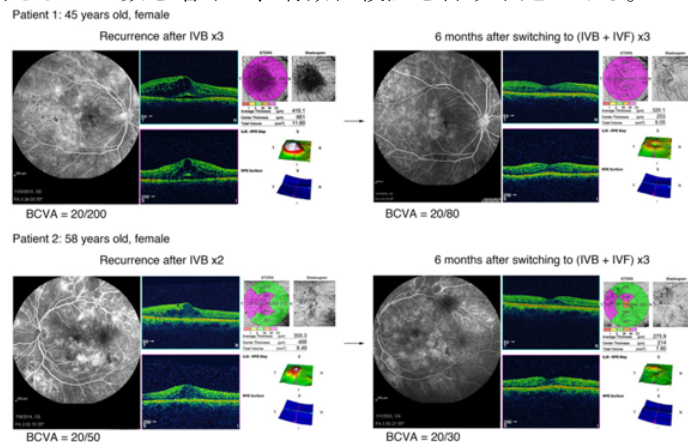


図 9. ヒト rDME 患者における ROCK 阻害療法の効果

IVB 抵抗症例に対し、IVB+IVF 併用療法を行ったところ、rDME が消失した。

本研究成果より、ROCK (特に ROCK2) が網膜炎の惹起および炎症性サイトカインによる BRB 破綻を介して rDME 形成に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Arima M, Nakao S, Yamaguchi M, Feng H, Fujii Y, Shibata K, Wada I, Kaizu Y, Ahmadi H, Ishibashi T, Stitt AW, Sonoda KH.	4. 巻 69
2. 論文標題 Claudin-5 Redistribution Induced by Inflammation Leads to Anti-VEGF-Resistant Diabetic Macular Edema.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 981-999
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db19-1121	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 該当する

1. 著者名 Arima M, Nakao S, Kaizu Y, Wada I, Yamaguchi M, Fujiwara K, Akiyama M, Stitt AW, Sonoda KH.	4. 巻 11
2. 論文標題 Diabetic vascular hyperpermeability: optical coherence tomography angiography and functional loss assessments of relationships among retinal vasculature changes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 4185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83334-6	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有馬 充
2. 発表標題 Claudin-5 Redistribution Induced by Inflammation Leads to Anti-VEGF Resistant Diabetic Macular Edema
3. 学会等名 第26回日本糖尿病眼学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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			
英国	Queen's University			
イラン	Shahid Beheshti University			