

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18869

研究課題名（和文）抗酸化剤を対象としたハイスループットスクリーニングによる新規緑内障治療薬の探索

研究課題名（英文）Search for novel glaucoma therapeutics by high-throughput screening of antioxidants.

研究代表者

横山 悠（Yokoyama, Yu）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00597312

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：約6000化合物から細胞毒性を示さず、NF-kB活性を抑制する化合物をレポーターアッセイにより評価し、候補化合物を10以下までに絞り込んだ。このうちBV2細胞に対し化合物#38が最も炎症性サイトカインの産生を抑制した。NF-kBのリン酸化と核移行を免疫染色とウェスタンブロッティングで評価したところ、LPS刺激後の細胞内NF-kBのリン酸化が亢進し、化合物#38で処理すると顕著に抑制された。LPS刺激後のBV2細胞内カルシウム量は有意に増加したが、化合物#38で前処理すると有意に抑制された。本化合物は抗炎症作用をもつ適濃度においてBV2細胞に対し細胞毒性と増殖活性を認めないことも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は未だ眼圧下降治療以外にエビデンスのある治療法は確立されていない。眼圧下降治療による視野温存には限界があり、緑内障病態に基づく新たな緑内障治療薬は臨床現場において切望されている。しかし基礎研究で開発された候補薬を臨床応用するまでには多くの障壁があり時間を要する。本研究では本学が独自に保有する薬剤ライブラリ6000化合物を効率よくスクリーニングすることにより、より短期間で臨床応用を見据えたものである。これまでの基礎研究で指摘されてきた炎症と緑内障の関連に着目することで薬剤の絞り込みに成功した。今後はこの薬剤を臨床応用に向けて、その効果と安全性を評価していく予定である。

研究成果の概要（英文）：From about 6,000 compounds, we evaluated whether they could inhibit NF-kB activity without showing cytotoxicity using reporter assay, and narrowed down the candidate compounds to less than 10. We confirmed that the compound #38 inhibited most the production of inflammatory cytokines in BV2 cells. Using immunostaining and Western blotting, we evaluated phosphorylation and nuclear translocation of NF-kB in BV2 cells after LPS stimulation, found that the compound #38 suppressed these reactions. The amount of intracellular calcium in BV2 cells was significantly increased by LPS stimulation. However, the compound #38 significantly inhibited intracellular calcium influx. The compound #38 showed no cytotoxicity and no proliferative activity against BV2 cells at optimal concentrations with anti-inflammatory activity.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 神経保護 抗酸化 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障の本態は眼圧に依存して引き起こされる RGC 死である。緑内障は眼圧下降療法によりその進行を停止もしくは抑制できる疾患と定義されるが、実際には眼圧下降を十分行っても視野障害進行を抑制できない症例も多い。眼圧下降のための薬物療法や手術療法が発達した今日の緑内障診療でも失明率は非常に高いことは眼圧下降療法の限界を示している。その理由の一つとして、緑内障は多因子疾患であり、眼圧下降療法だけではこの複雑な病態をすべては抑制できないということが挙げられる。これまでの研究では、圧障害、慢性虚血、興奮毒性、小胞体ストレス、酸化ストレスの関与が報告されている。当施設でもこれまで様々な緑内障病態解明研究を行ってきたが、特に酸化ストレスに着目して実績を上げてきた。

しかし世界中で様々な緑内障病態の研究がなされているにもかかわらず、新しい治療薬は臨床の現場に登場していない。今、まさに緑内障治療において求められているものは、緑内障病態に基づいた非眼圧依存の新規治療法の開発である。緑内障病態に基づく新規治療法の開発により、画一的な眼圧下降療法を補完する、病態に応じた個別化医療の実現が期待できる。しかしながら現実問題として、緑内障研究において基礎研究から臨床応用には大きな障壁があり、なかなか新規薬剤の開発に結びつかない。高齢者の増加に伴い緑内障患者は急速に増えつつあり、短期間で、実現可能性の高い研究が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的を緑内障病態に応じた新薬開発とした。具体的には東北大学薬学部が独自に保有している化合物ライブラリから神経保護効果、特に RGC 保護効果を有する化合物をスクリーニングし、その有効性および安全性を動物実験や培養細胞を用いて実証することである。この化合物ライブラリには約 6000 種類の化合物が登録されているが、自動化され比較的短期間での化合物スクリーニングが可能である。本研究では、これまで我々がその重要性を実証してきた緑内障病態である、酸化ストレスならびに炎症に焦点を当てて、抗酸化作用や抗炎症作用の有する神経保護薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 化合物ライブラリからのヒット化合物の選別

マウス海馬由来神経細胞である HT22 細胞に NF- κ B 活性を測定するためのレポーターアッセイ用プラスミド (pGL4.32[Luc2P/NF- κ B-RE/Hygro]、Promega 社) をトランスフェクションし、ハイグロマイシン存在下でセクションし安定発現株を取得した。東北大学薬学部から提供された約 6000 種類の化合物を 96 ウェルプレートに添加し、さらに細胞自動分注機を用いて 96 ウェルプレートに 2000 cells/well で播種したのち TNF α (終濃度 50 ng/ml) で添加して CO₂ インキュベーターで培養した。24 時間後に Luciferase Reagent (Nano Glo, Promega) を添加したのち PHERASstar を用いて発光強度を定量した。細胞生存率は Alamar blue assay (Thermo) を用いた。

(2) 培養マイクログリア細胞株による抗炎症化合物の作用機序の評価

スクリーニングにより選別された候補化合物に対し、マウス培養マイクログリア細胞株である BV2 を用い、炎症性サイトカインの遺伝子発現を評価した。BV2 に対し評価対象化合物を種々の濃度で添加したのち、LPS を添加して 6 時間後に SuperPrep[®] IICell Lysis & RT Kit for qPCR (Toyobo) を用いて RNA 抽出ならびに cDNA 合成をおこなった。qPCR は Predesign の primer, probe (Thermo) と Taqman Fast Universal PCR Master Mix (ABI) を用い、ABI 7500 を用いてリアルタイム PCR をおこなった。各サイトカインの遺伝子発現補正には gapdh を用いた。ウェスタンブロットティングのためのサンプル調整として、6 ウェルプレートに播種した BV2 細胞核分画を抽出した。分画調整には Nuclear/Cytosolic Fractionation kit (Cell Biolabs) を使用し、LPS 刺激 6 時間後に添付マニュアルに従って BV2 細胞核分画を抽出した。SDS-PAGE でタンパク質を分離したのち、セミドライ法でタンパク質を PVDF 膜に転写した。ウェスタンブロットティングには抗 NF- κ B 抗体 (Cell signaling) を用い、コントロールとして抗 lamin B 抗体を用い、ECL prime (GE) による化学発光シグナルを Chemi Dog (Bio Rad) にて検出した。免疫染色には 8 ウェルスライドチャンバーを用い、p-NF- κ B 抗体 (Cell signaling) を用い、二次抗体に anti-rabbit IgG-Alexa 488 を用いてシグナルを検出した。蛍光写真は BZ-X800 (キーエンス) を用いて撮影した。細胞内カルシウム測定には FLIPR Calcium 5 assay kit (Molecular Devices) を用い、マルチプレートリーダー FlexStation3 (Molecular Devices) にて測定した。

4. 研究成果

まず抗酸化メディエーターである Nrf2 を活性化する東北大学薬学部が保有する約 6000 化合物からライブラリースクリーニングにより探索することを目的とした。まずマウス海馬由来神経細胞株 HT22 に対し酸化ストレスの誘導を試みた。既報にある過酸化水素、グルタミン酸、メナ

ジオンなどによる刺激により、それぞれ細胞死を誘導することを確認した。続いてフリーラジカル検出のため CellRox による酸化ストレスの測定を試みたが、バックグラウンドが高くシグナルが正確に検出されていない可能性が示唆された。この現象はプレートリーダーおよびフローサイトメトリーにおいても同様であり、実験系の問題ではない可能性が高いと判断した。

酸化ストレスの測定が困難な可能性があるため、緑内障治療に有用と考えられる抗炎症作用を持つ化合物も平行して探索した。標的因子として NF- κ B に着目し、化合物ライブラリーから NF- κ B 活性を抑制する化合物を探索する手法として NF- κ B レスポンスエレメント配列下流にレポーターが存在するプラスミドを HT22 細胞にトランスフェクションして作製した安定発現株を用いた。まず一次スクリーニングとして TNF α 刺激による NF- κ B 活性を終濃度 10 μ M で抑制する化合物を評価した結果、ヒットクライテリアとして設定した Luc 活性値 3SD を満たす化合物が 44 種ヒットした。続いて二次スクリーニングとして Alamar blue による毒性評価をおこなったところ、化合物終濃度 10 μ M において Luc 活性値 3SD かつ細胞生存率 3SD を満たす化合物が 22 種ヒットした。続いて三次スクリーニングとして化合物の薬効と毒性の濃度依存性を 0.1~50 μ M の範囲で評価したところ 4 種ヒットした。

続いてこの 4 種の化合物について BV2 マウスマイクログリア細胞株で炎症性サイトカイン (TNF α , IL-1 β , IL-6, ccl2) の発現量を qPCR で評価したところ、化合物#38 が最も強いサイトカイン発現抑制効果を示した。そのため、今後は#38 に着目し、抗炎症作用のメカニズムについて検討した。NF- κ B のリン酸化ならびに核移行を免疫染色とウェスタンブロッティングで評価したところ、LPS 刺激後の BV2 細胞では細胞内 NF- κ B のリン酸化が亢進し、NF- κ B の核内移行が誘導されることが確認された。これらの現象は LPS 添加前に化合物#38 を処理することで顕著に抑制された。この化合物#38 はジヒドロピリジン骨格を持ち、L-type カルシウムチャンネルブロッカーであることが推測されたため、LPS 刺激後の細胞内カルシウム流入を測定した。LPS 刺激後の BV2 細胞内カルシウム量は有意に増加したが、化合物#38 を前処理した群においては細胞内カルシウム流入が有意に抑制された。本化合物は抗炎症作用をもつ至適濃度において BV2 細胞に対し細胞毒性ならびに増殖活性を認めないことも明らかにした。今後、共培養や動物試験において本化合物の神経保護作用ならびに緑内障治療薬としての可能性を検証する予定である。

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

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