

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861660

研究課題名(和文) Rhoキナーゼ阻害剤を用いたアポトーシス制御による水疱性角膜症の新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of Rho kinase inhibitor eye drop as the therapy for treating corneal endothelial dysfunction

研究代表者

奥村 直毅 (Okumura, Naoki)

同志社大学・生命医科学部・助教

研究者番号：10581499

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)：角膜内皮は角膜透明性の維持に不可欠であるが、ジストロフィ、手術、外傷などにより障害されると角膜の混濁による重篤な視力障害に至る。現在唯一の治療法は角膜移植であるが、薬物療法の開発が望まれる。本研究ではRhoキナーゼ(ROCK)阻害剤の角膜内皮の細胞死抑制についての作用機序を解明する。我々は培養した角膜内皮細胞のアポトーシス誘導モデルを用いて、ROCK阻害剤がMLCのリン酸化によるアクチン線維の収縮による細胞収縮、基質からの剥離を抑制することでアポトーシスを抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Human corneal endothelial cells (HCECs) are known to have poor regenerative ability, and non-compensatory damage of those cells causes irreversible corneal haziness. Although corneal transplantations provide considerable clinical benefits, allograft rejection, primary graft failure, and the worldwide shortage of donor corneas are associated problems that have yet to be overcome. Since the development of new therapies is the key to solving these problems, we have attempted to establish a new clinical intervention for the treatment of corneal endothelial dysfunction. In this research, we investigate the mechanism by which ROCK inhibitor suppresses apoptosis. We demonstrated that ROCK inhibitor suppresses apoptosis by suppressing cell detachment from the substrate via inhibiting MLC phosphorylation, and that it could be further developed as a therapeutic agent to modulate CEC apoptosis.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜内皮 Rhoキナーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

角膜内皮細胞は、ポンプ機能とバリア機能を有し、角膜の透明性の維持に不可欠な細胞である。Fuchs 角膜内皮ジストロフィ、加齢、外傷、眼科手術などにより角膜内皮障害が生じると、角膜が不可逆的に混濁し重症の視覚障害をきたす(水疱性角膜症)。水疱性角膜症に対しては、ドナー角膜を用いた角膜移植が行われている。しかし、水疱性角膜症に対する角膜移植の治療成績は良好ではなく、角膜移植に伴う種々の合併症、ドナー不足、患者への高負荷も克服すべき問題であり患者に優しい斬新な新規治療法の開発が強く望まれている。

一方、Fuchs 角膜内皮ジストロフィや角膜移植後においては、長期にわたって角膜内皮が障害され水疱性角膜症となり失明に至る進行性の病態であるにもかかわらず、角膜内皮障害の発症、進行を予防する治療法すら存在しない。そこで、申請者らが見出した Rho キナーゼ (ROCK) 阻害剤が角膜内皮細胞のアポトーシスを抑制するという独自の科学的知見に基づき、本研究を発案するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、ROCK 阻害剤のアポトーシス抑制機序の解明および動物モデルにおける ROCK 阻害剤点眼投与による角膜内皮障害治療効果の検討を行い、水疱性角膜症におけるアポトーシス制御による新規治療法の基盤技術開発を行う。具体的には、1. ROCK 阻害剤の角膜内皮アポトーシス抑制による新規治療法の基盤技術の開発、2. ROCK 阻害剤点眼投与による角膜内皮障害治療効果の検討について研究を進める。

### 3. 研究の方法

角膜内皮細胞のアポトーシスへの Rho/ROCK シグナルの寄与の解明を行った。培養ヒトおよびサル角膜内皮細胞に対して紫外線 (UV) によりアポトーシスを誘導し、in vitro における Rho/ROCK シグナルおよびアポトーシス関連シグナルの解析を行った。具体的には、アポトーシスを誘導した角膜内皮細胞において、ROCK シグナル、アポトーシスシグナルについてウエスタンブロッティング法、免疫染色にて検討することで、角膜内皮における Rho/ROCK シグナルとアポトーシスシグナルの関係性を検討した。

また、ROCK 阻害剤の角膜内皮治療への臨床応用が可能であるかについて検討するために、Fuchs ジストロフィや角膜移植後の細胞障害の細胞障害モデルを作成した。さらには ROCK 阻害剤の有用性の検討を行った。

### 4. 研究成果

角膜内皮に対する紫外線や TNF などによる細胞傷害性シグナルが、ROCK シグナルを活性化させることで MLC をリン酸化し、アクチン線維の収縮を生じることが明らかになった。

アクチン線維の収縮は細胞の収縮、基質からの剥離を引きおこし、アポトーシス実行分子である caspase3 の切断による活性化を介してアポトーシスを実行することが明らかになった。ROCK 阻害剤が細胞傷害性シグナルによる ROCK 活性を抑制することによりアポトーシスを抑制するという作用機序が解明された。

また、特筆すべき成果として ROCK 阻害剤点眼投与による角膜内皮障害治療効果の検討を目的として、Fuchs 角膜内皮ジストロフィモデルを用いた検討を開始した。Fuchs 角膜内皮ジストロフィは欧米人の 40 歳以上の有病率が 5%とされ角膜移植の最大の原因疾患である一方で一切の薬物療法が存在しないために、ROCK 阻害剤の進行予防効果が得られた場合には非常に巨大な市場化につながる。現在、製薬メーカーとの共同研究により世界初となる角膜内皮治療薬の開発を目指している。

### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計7件)(すべて査読あり)

1. Okumura N, Kakutani K, Numata R, Nakahara M, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse K, Kinoshita S, and Koizumi N: Laminin-511 and 521 enable efficient in vitro expansion of human corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. in press.
2. Okumura N, Hirano H, Numata R, Nakahara M, Ueno M, Hamuro J, Kinoshita S, Koizumi N: Cell surface markers of functional phenotypic corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014 Nov 11; 55(11):7610-8. doi: 10.1167/iovs.14-14980.
3. Okumura N, Nakamura T, Kay EP, Nakahara M, Kinoshita S, Koizumi N: R-spondin1 Regulates Cell Proliferation of Corneal Endothelial Cells via the Wnt3a/ $\beta$ -catenin Pathway. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014 Oct 2. pii: IOVS-14-14091.
4. Okumura N, Nakano S, Kay EP, Numata R, Ota A, Sowa Y, Sakai T, Ueno M, Kinoshita S, Koizumi N: Involvement of cyclin D and p27 in cell proliferation mediated by ROCK inhibitors Y-27632 and Y-39983 during corneal endothelium wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci. 15;55(1):318-29, 2014
5. Koizumi N, Okumura N, Kinoshita S: Author Response: Human Corneal Endothelium Regeneration: Effect of ROCK Inhibitor. Invest Ophthalmol Vis Sci. 19;54(8):5594-5, 2013
6. Koizumi N, Okumura N, Ueno M, Nakagawa H, Hamuro J, Kinoshita S: Rho-associated kinase inhibitor eye drop

treatment as a possible medical treatment for Fuchs corneal dystrophy. *Cornea*. ;32(8):1167-70, 2013

7. Okumura N, Koizumi N, Kay EP, Ueno M, Sakamoto Y, Nakamura S, Hamuro J, Kinoshita S: The ROCK Inhibitor Eye Drop Accelerates Corneal Endothelium Wound Healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 3;54(4):2493-502, 2013

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 奥村直毅、中野新一郎、角谷和哉、北野絢嗣、木下茂、小泉範子: 培養角膜内皮細胞移植におけるラミニン 511 の有用性の検討. 第 14 回日本再生医療学会総会, 横浜, 2015.3.20.
2. 奥村直毅、中村隆宏、Kay EunDuck、中原マキ子、木下茂、小泉範子: R-spondin1 の角膜内皮細胞増殖に対する影響. 角膜カンファランス 2015 第 39 回日本角膜学会総会・第 31 回日本角膜移植学会, 高知, 2015.2.12.
3. Okumura N: ROCK Inhibitor Suppresses Apoptosis of Corneal Endothelial Cells by Inhibiting MLC phosphorylation. 4th Biennial Scientific Meeting Asia Cornea Society. Taipei, Taiwan, 2014.12.11.
4. 奥村直毅: 角膜内皮治療の未来予想図. 第 7 回 North Osaka Ophthalmology Seminar, 大阪, 2014.10.30.
5. Okumura N: Cultivated corneal endothelial cell injection for the treatment of bullous keratopathy. Seminar in Kyungpook National University Hospital, 2014.9.27
6. Okumura N, Minamiyama R, Kay EP, Kawasaki S, Young R, Quantock A, Schlotzer-Schrehardt U, Friedrich EK, Kinoshita S, Koizumi N: The involvement of transforming growth factor beta in endoplasmic reticulum stress of corneal endothelial cells in Fuchs' endothelial corneal dystrophy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2014. Florida, USA, 2014.5.5.
7. 奥村直毅、南山竜輝、Leona Ho、川崎諭、Theofilos Tourtas、Ursula Schlötzer-Schrehardt、Friedrich E. Kruse、木下茂、小泉範子: Fuchs 角膜内皮ジストロフィにおける小胞体ストレスに対する TGF- $\beta$  シグナルの影響. 第 118 回日本眼科学会総会, 東京, 2014.4.4.
8. 奥村直毅、沼田諒平、角谷和哉、Ursula Schlötzer-Schrehardt、Friedrich E. Kruse、木下茂、小泉範子: 角膜内皮細胞培養におけるラミニン 511 および 521 の有用性. 第 13 回日本再生医療学会総会, 京都, 2014.3.6.

9. Okumura N: Cell-Based Approach for the Treatment of Corneal Endothelial Dysfunction. Gordon Research Conference. California, USA, 2014.2.17.
10. Okumura N, Leona Ho, EunDuck P. Kay, Kawasaki S, Theofilos Tourtas, Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE, Kinoshita S, Koizumi N: The Effect of EMT-Related Genes on the Regulation of Excessive Production of Extracellular Matrix in a Cellular Model of Fuchs' Corneal Dystrophy. Gordon Research Conference. California, USA, 2014.2.17.
11. 奥村直毅、Ho Leona, Kay EunDuck、川崎諭、Tourtas Theofilos、Ursula Schlötzer-Schrehardt、Friedrich E. Kruse、木下茂、小泉範子: Fuchs 角膜内皮ジストロフィにおける ECM 産生に対する TGF- $\beta$  シグナルの影響. 角膜カンファランス 2014 第 38 回日本角膜学会総会・第 30 回日本角膜移植学会, 沖縄, 2014.1.30.
12. 奥村直毅: 再生医療研究の最前線! トランスレーショナル・リサーチの実践. 第 67 回 日本臨床眼科学会, 横浜, 2013.11.2.
13. Okumura N: Paradigm Shift for Corneal Endothelial Regeneration, 28th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress. New Delhi, India, 2013.10.28.
14. Okumura N: A Paradigm Shift in Corneal Endothelial Tissue Engineering Therapy. TERMIS-AP 2013 Annual Conference. Shanghai and Wuzhen 2013. 10.26
15. Okumura N: A Paradigm Shift in Corneal Endothelial Tissue Engineering Therapy. TERMIS-AP 2013 Annual Conference. Shanghai and Wuzhen, China, 2013.10.25.
16. Okumura N: Development of cell therapy for treating corneal endothelial dysfunction. Seminar in the Catholic University of Korea. Seoul, Korea, 2014.9.23
17. Okumura N, Odajima A, EunDuck P. Kay, Chen W, Ueno M, Hamuro J, Kinoshita S, Koizumi N: Activation of the Rho/ROCK Signaling Pathway in the Apoptosis of Corneal Endothelial Cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2013. Seattle, USA, 2013.5.6.
18. 奥村直毅、小田嶋愛、EunDuck Kay、陳文、上野盛夫、羽室淳爾、木下茂、小泉範子: Rho キナーゼ阻害剤の角膜内皮細胞に対するアポトーシス抑制効果の検討. 第 117 回日本眼科学会総会, 東京, 2013.4.4.

〔図書〕(計 2 件)

1. 奥村直毅: 確定診断と治療の進め方 / 角膜内皮障害と水疱性角膜症, PPCD と PCV. 角膜疾患 外来でこう診てこう治せ(木下 茂編), Page196-197, メジカルビュー社, 東京, 2015
2. 奥村直毅: 確定診断と治療の進め方 / 角膜内皮障害と水疱性角膜症, 敵状角膜と Fuchs 角膜内皮ジストロフィ. 角膜疾患 外来でこう診てこう治せ(木下 茂編), Page194-195, メジカルビュー社, 東京, 2015
3. 〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

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

<http://tissue-engineering-doshisha.jp/index.html>

Research & Map

<https://researchmap.jp/okumura.n/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 直毅 (OKUMURA, Naoki)

同志社大学・生命医科学部・助教

研究者番号: 10581499