

新規 NF- κ B 阻害剤 (DHMEQ) を用いた眼炎症性疾患の制御

慶野 博

杏林大学医学部眼科学

〈背景と目的〉

Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) は種々の炎症刺激により活性化されて核内に移行する転写因子であり、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、接着分子などの炎症関連遺伝子群の発現を誘導する (Nature Immunol 12:709-714, 2011)。したがって炎症の関連する様々な疾患の進展に NF- κ B が重要な役割を果たしており、この分子の制御が新しい治療法へと繋がるのが期待される。

近年、梅澤らによって発見された新規低分子 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ (dehydroxymethylepoxyquinomicin) は NF- κ B 分子の核内移行を選択的に阻害する低分子化合物として知られ、癌治療薬剤として注目を集めている。例えば成人 T 細胞性白血病ウイルス (HTLV-1) 感染細胞は NF- κ B が過剰に活性化されており、これらの感染細胞を免疫不全状態のマウスに移植したモデルにおいて DHMEQ が NF- κ B の核内移行を抑制することで強い抗がん活性をもつことが報告された (Blood 106:2462-2471, 2005)。本剤は NF- κ B 特異性が高く、実際に活性化シグナルが入り、増殖・分化する細胞を主な標的と出来ることが特徴的である。またこれまでの小動物を用いた実験では明らかな毒性が認められていないことなどからも臨床応用の可能性が十分期待される。本研究では DHMEQ を用いて難治性ぶどう膜炎に対する NF- κ B 分子特異的な治療法の開発を目的に研究を行った。実験には眼内組織のヒト網膜色素上皮由来細胞株である ARPE-19 を用いて DHMEQ の炎症制御機構について解析を行った。

〈方法〉

本研究課題では以下に項目について検討を行った。

1) MTS assay を用いた ARPE-19 に対する DHMEQ の細胞毒性、2) フローサイトメーターを用いた ARPE-19 に

おける ICAM- 1 (intercellular adhesion molecule-1) の発現と DHMEQ による ICAM-1 の発現抑制効果、3) DHMEQ による IL-8 や MCP-1 などの炎症性ケモカインに対する発現抑制効果、4) ウェスタンブロッティング法による NF- κ B の核内移行の抑制効果、5) 免疫組織染色法による NF- κ B の核内移行の抑制効果

〈結果〉

1) DHMEQ の細胞毒性の検討

DHMEQ の ARPE-19 に対する細胞毒性を検討したところ、20 μ g/ml 以上の濃度で培養を行うと培養開始後 24 時間の時点で ARPE-19 の細胞増殖能が有意に低下することが確認された。

2) DHMEQ による ICAM-1 の発現抑制効果の検討

ARPE-19 を TNF- α にて 24 時間刺激培養と行うと、ARPE-19 における ICAM-1 の発現が上昇するが、DHMEQ を添加すると ICAM-1 の発現が濃度依存的に低下した (図 1)。

3) DHMEQ による IL-8, MCP-1 の産生抑制効果の検討

ARPE-19 を TNF- α を用いて 24 時間刺激培養と行うと、炎症性ケモカインである IL-8, MCP-1 などの産生が上昇するが DHMEQ を添加して培養を行うと、ELISA 法にて培養上清中の IL-8, MCP-1 の発現が DHMEQ の濃度依存的に有意に低下した (図 2)。

4) DHMEQ による NF- κ B 分子の核内移行阻害効果の検討

DHMEQ の作用機序として細胞質内から核内への NF- κ B 分子の移行抑制効果が知られていることから NF- κ B の核内移行阻害効果について検討した。その結果、ウェスタンブロッティング法では DHMEQ を添加すると核内の NF- κ B p65 分子の発現が低下すること、免疫組織染色

図 1. DHMEQによるICAM-1の発現変動

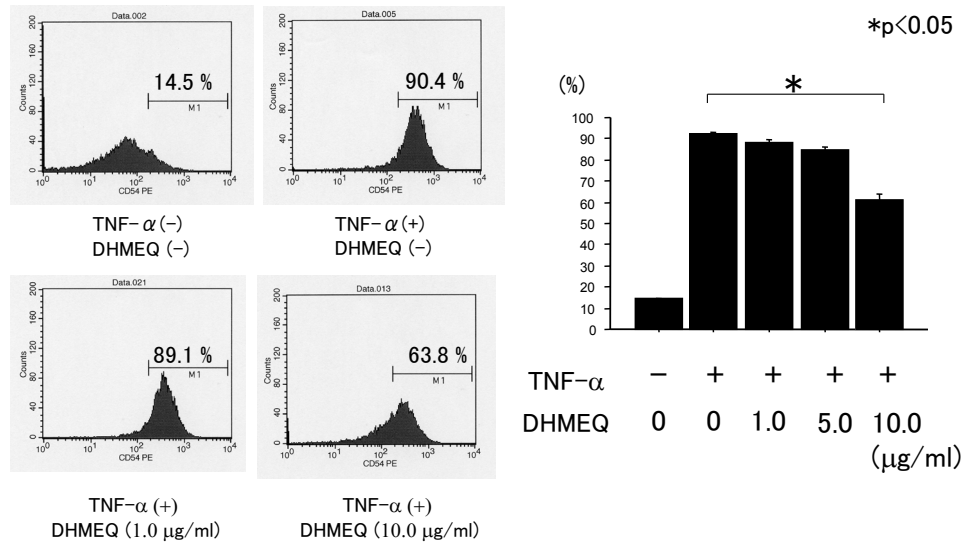
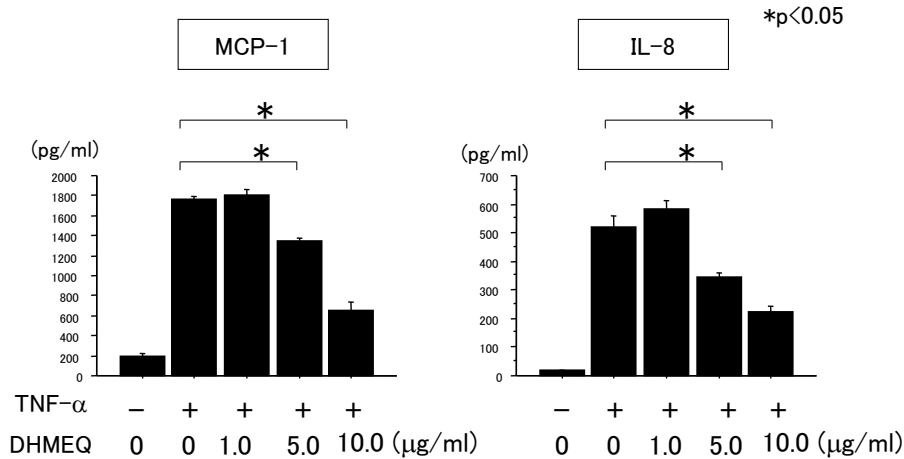


図 2. DHMEQによるケモカインの産生抑制効果



法でも同様の効果が認められた。

＜結論＞

本研究にて網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 を用いて DHMEQ による炎症性サイトカイン，ケモカインの産生抑制効果，さらにその作用機序として DHMEQ による NF-κB の核内移行阻害効果があることが明らかとなった。ただし，DHMEQ の濃度が高い場合 (20 μg/ml 以上)，ARPE-19 に対する細胞毒性が生じることから生体内へ DHMEQ を投与する場合は投与量についての十分な検討が必要と考えられた。これらの結果より DHMEQ は ICAM-1 やケモカインを介した炎症性疾患の制御に有効であると考えられた。今

後はぶどう膜炎の動物モデルを作成し，DHMEQ を投与することによる眼内炎症の抑制効果の検討，また他の眼組織由来の培養細胞株を用いた DHMEQ の抗炎症効果の検討を予定している。

原著論文

- 1) Nakayama M, Keino H, Okada AA, Watanabe T, Taki W, Inoue M, Hirakata A: Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in Vogt-Koyanagi-Harada disease. Retina. 2012;32:2061-2069. doi: 10.1097/IAE.0b013e318256205a.
- 2) Imai A, Sugita S, Kawazoe Y, Horie S, Yamada Y, Keino H, Maruyama K, Mochizuki M: Immunosuppressive properties of regulatory T cells generated by incubation of peripheral blood mononuclear cells with supernatants of human RPE

- cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:7299-7309. doi: 10.1167/iovs.12-10182.
- 3) Nakayama M, Keino H, Hirakata A, Okada AA, Terado Y: Exudative retinal astrocytic hamartoma diagnosed and treated with pars plana vitrectomy and intravitreal bevacizumab. *Eye* 2012;26:1272-1273. doi:10.1038/eye.2012.124.
- 4) Okada AA, Goto H, Ohno S, Mochizuki M; Ocular Behçet' s Disease Research Group of Japan: Multicenter study of infliximab for refractory uveoretinitis in Behçet' s disease. *Arch Ophthalmol.* 2012;130:592-598. doi: 10.1001/archophthalmol.2011.2698.
- 5) Taki W, Keino H, Watanabe T, Okada AA: Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in recurrent unilateral posterior scleritis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2013; 251:1003-1004. doi: 10.1007/s00417-012-1972-1.
- 口演**
- 1) 慶野博: シンポジウム 12 眼炎症疾患のメカニズム最前線 レチノイドによる眼炎症性疾患の制御. 第 116 回日本眼科学会総会, 東京, 2012 年 4 月 5-8 日
- 2) 渡辺交世, 慶野博, 瀧和歌子, 越前成旭, 岡田アナベルあやめ: インフリキシマブ治療を導入した若年性ベーチェット病ぶどう膜網膜炎の 2 症例. 第 116 回日本眼科学会総会, 東京, 2012 年 4 月 5-8 日
- 3) 慶野博, 渡辺交世, 瀧和歌子, 岡田アナベルあやめ: インフリキシマブ長期投与ベーチェット病患者の蛍光眼底造影の推移. 第 46 回日本眼炎症学会, 横浜, 2012 年 7 月 14-16 日
- 4) 肥留川京子, 慶野博, 渡辺交世, 瀧和歌子, 平形明人, 岡田アナベルあやめ: 網膜動脈閉塞症に対してステロイドパルス療法が奏功した SLE 網膜炎の 1 例. 第 46 回日本眼炎症学会, 横浜, 2012 年 7 月 14-16 日
- 5) 慶野博 ベーチェット病治療の最近の進歩. 第 9 回 免疫疾患フォーラム, 筑波, 平成 24 年 7 月 19 日
- 6) 慶野博, 渡辺交世, 瀧和歌子, 岡田アナベルあやめ: EDI-OCT を用いた交感性眼炎回復期の脈絡膜厚の評価. 第 66 回日本臨床眼科学会, 京都, 2012 年 10 月 25-28 日
- 7) 慶野博 難治性眼炎症疾患に対する新しい治療戦略 — 基礎研究からのアプローチ 第 33 回 西中国眼疾患フォーラム, 宇部, 平成 24 年 11 月 1 日
- 8) 慶野博, 梅沢一夫¹, 宮東昭彦², 川上速人², 岡田アナベルあやめ (杏林大学医学部眼科学, ¹愛知医科大学医学部分子標的医薬探索講座, ²杏林大学医学部解剖学): ヒト網膜色素上皮細胞株を用いた新規 NF-κB 阻害剤 DHMEQ による抗炎症作用の検討. 第 41 回 杏林医学会, 三鷹, 平成 24 年 11 月 17 日
- 9) 廣田和成, 平形明人, 慶野博, 井上真, 渡邊卓¹, 石田均² (¹臨床検査医学, ²第 3 内科学): 眼内における microRNA (miRNA) の発現解析. 第 41 回 杏林医学会, 三鷹, 平成 24 年 11 月 17 日
- 10) 慶野博, 岡田アナベルあやめ: ベーチェット病治療の最近の進歩. 第 14 回 西東京眼科フォーラム 吉祥寺, 平成 24 年 11 月 21 日