

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20255

研究課題名(和文) VCP ATPase阻害剤による虚血性眼疾患に対する新規神経保護治療の開発

研究課題名(英文) Development of neuroprotective treatments for ischemic eye diseases.

研究代表者

畑 匡侑 (Hata, Masayuki)

京都大学・臨床研究総合センター・助教

研究者番号：70748269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、虚血性眼疾患に対するVCP ATPase阻害剤の神経保護効果の検討および神経保護メカニズムの検証を目標とした。虚血再灌流ラットにおけるVCP ATPase阻害剤の腹腔内投与による神経保護効果の検討したところ、薬剤投与群では、虚血誘導後の網膜内層菲薄化および網膜神経節細胞減少が有意に抑制され、網膜電図での評価では網膜内層機能を反映するb波振幅の減衰が抑制されていた。また、神経保護効果メカニズムの検討では、VCP ATPase阻害剤は小胞体ストレスを緩和することで、細胞死を抑制していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the neuroprotective effects of VCP ATPase inhibitor for ischemic eye diseases. We showed that the VCP modulator exerts a profound anti-apoptotic effect on ischemic retinal injury by suppressing ER stress, resulting in morphological and functional neuroprotection. Our findings may provide a novel therapeutic strategy for the treatment of neural ischemic diseases.

研究分野：難治性網膜視神経疾患の病態解明および治療法開発

キーワード：虚血性眼疾患 神経保護薬 VCPタンパク ATPase

1. 研究開始当初の背景

虚血性眼疾患は、網膜動脈閉塞症、網膜静脈閉塞症、虚血性視神経症、糖尿病性網膜症など眼虚血に起因する疾患の総称であり、日本における発症率は、網膜中心動脈閉塞症で 500 人/年、網膜動脈分枝閉塞症で 5000 人/年、虚血性視神経症で 1000 - 5000 人/年程度と推定されている。視力はほぼ正常に近いものから完全失明に至るものまで様々であるが、特に網膜中心動脈閉塞症では患者は高確率で失明等の永続的な高度視機能障害に至る。虚血性眼疾患の有効な治療方法は確立されておらず、新規の治療方法が必要とされている現状がある。

網膜中心動脈閉塞症および網膜動脈分枝閉塞症は、網膜を栄養する唯一の血管である網膜中心動脈の閉塞に起因し、極度の視力低下が起こる疾患である。急性の虚血により、網膜内層（神経節細胞、内顆粒層）の細胞機能障害が生じ、数日で網膜神経節細胞をはじめとする網膜内層の細胞死に至る。虚血性視神経症は、視神経を栄養する短後毛様動脈の閉塞に起因し、視力および視野の障害をもたらす疾患である。視神経を構成する網膜神経節細胞の軸索障害をきたすことで、細胞ストレスを惹起し、その後網膜神経節細胞死に至る。細胞体あるいは軸索の違いはあるが、ともに網膜神経細胞の虚血が共通の病態である。

近年、神経細胞死の原因として、従来知られていた DNA 障害やミトコンドリア障害によるものとは異なる、小胞体機能の破綻の関与の存在が明らかとなってきた。特に、虚血時における神経細胞では、小胞体ストレスを中心とした過剰な細胞内ストレス応答が生じた結果、小胞体の機能異常を起源とする細胞死に至ることが明らかになってきた(文献、文献)。

京都大学生命科学研究科高次生体統御学講座で、長年研究対象としている VCP (valocin-containing protein) (文献)は、AAA(ATPase associated with various cellular activities) class の ATPase であり、細胞がストレスに反応して小胞体ストレス応答等を引き起こす過程で重要な働きをすると推測されている。当該研究室では、この VCP の ATPase に対する阻害剤の合成・開発に成功している(特願 2010-172467)。我々は、この新規に合成した VCP ATPase 阻害剤の一部に、小胞体ストレスを抑制し細胞死抑制効果があることを見出し(文献)、VCP ATPase 阻害剤のモデル動物への投与により、小胞体ストレスが関わる視細胞や神経節細胞の細胞死を抑制することを明らかにしてきた(文献、特願 2010-221873、特願 2013-031190)。また我々は現在までに、少数例の高眼圧虚血再灌流ラットを用いた予備検討において、VCP ATPase 阻害剤の腹腔内投与により網膜神経保護効果が得られることを形態的、機能的に明らかにしつつある(特願 2014-038457)。したがって、本 VCP ATPase 阻害剤が、虚血性眼疾患に対して新規神経保護治療薬となる可能性が出てきた。

2. 研究の目的

本研究では、虚血性眼疾患動物モデルにおいて、VCP ATPase 阻害剤の網膜神経細胞死の抑制効果の有無を検討するとともに、その神経細胞死抑制のメカニズムを究明し、虚血性眼疾患に対する新規治療法開発することを目的とする。

(1) 虚血性眼疾患モデルの作成

虚血性眼疾患には、網膜中心動脈閉塞症の動物モデルとしてラット高眼圧モデル、虚血性視神経症モデルとしてレーザー光凝固誘発モデルが報告されており、現在も標準的な動物モデルとして広く使用されている

(文献 , 文献)。本研究においても、既に作成に成功している高眼圧による網膜動脈閉塞症モデルに加え、レーザー光凝固による虚血性視神経症モデルを作成する。

(2) 虚血性眼疾患モデルのライブイメージング評価系の確立

動物モデルにおける薬剤の神経保護効果を検討する上で、生体下で非侵襲的かつ客観的な評価系を確立することが重要である。評価系として、網膜の厚み・網膜神経細胞の細胞数の両面から、客観的に網膜障害の程度を判定する評価系を確立する。具体的には、網膜の厚み測定には光干渉断層計による評価系を用い、網膜神経細胞の細胞数測定には網膜神経節細胞が蛍光ラベルされているトランスジェニックラット(文献)を用いて動物モデルを作成することで走査型レーザー検眼鏡で非侵襲的に定量可能である。

(3) VCP ATPase 阻害剤の神経保護効果の検討

虚血性眼疾患ラットモデルに対して、VCP ATPase 阻害剤を全身(腹腔内投与)・眼局所(硝子体内注射)投与し、その神経保護効果の有無を形態的、機能的に評価検討する。

(4) VCP ATPase 阻害剤の神経保護メカニズムの検討

VCP ATPase 阻害剤による神経保護効果が、どのようなメカニズムによるものかを虚血性眼疾患ラットモデルを用いて究明する。VCP 蛋白は、細胞内の主要な ATPase の一つであり、この VCP ATPase 阻害剤の投与により細胞内の ATP 濃度低下を抑制している可能性がある。また、VCP ATPase 阻害剤の一部に、小胞体ストレスを抑制し細胞死抑制効果があることが現在わかっている。細胞内 ATP 濃度・小胞体ストレス・神経細胞死

や細胞保護にかかわる各分子がどのようにかわりを持ち、保護作用を示すのか、総合的に明らかにする。

3. 研究の方法

虚血性眼疾患の動物モデルとして thy1-GFP Tg ラットを用い、高眼圧虚血再灌流ラット、レーザー光凝固誘発虚血性視神経症ラットを作成する。ラットは薬剤投与群、非投与群に分け、光干渉断層計・眼底蛍光などの *in vivo* イメージングによる形態的評価、更に網膜電図による機能的評価により、VCP ATPase 阻害剤の神経保護効果の判定をおこなう。薬剤の投与方法としては、腹腔内投与による全身投与に加え、眼内局所投与での薬剤効果の検討を行う。更に、VCP ATPase 阻害剤の神経保護効果のメカニズム解析のため、培養神経細胞や網膜器官培養、動物モデルの摘出網膜における細胞内 ATP 濃度、更に遺伝子発現、蛋白発現を小胞体ストレス関連分子を中心に解析する。以上により、われわれの開発した VCP ATPase 阻害剤が、虚血性眼疾患に対して新規神経保護治療薬となりうるか検討する。

4. 研究成果

本研究は、虚血性眼疾患モデルの作成および虚血性眼疾患モデルのライブイメージング評価系の確立を行い、虚血性眼疾患に対する VCP ATPase 阻害剤の神経保護効果の検討および神経保護メカニズムの検証を目標とし、以下の点を明らかにした。

(1)高眼圧虚血再灌流ラット・レーザー光凝固誘発虚血性視神経症ラットの作成に成功した。このモデルラットでは、光干渉断層計・眼底蛍光などの *in vivo* イメージングによる形態的評価、更に網膜電図による機能的評価により、網膜障害の継時的な変化を詳細

に検討することが可能であった。

(2)虚血再灌流ラットにおける VCP ATPase 阻害剤の腹腔内投与 (50 mg/kg/日、虚血誘導 3 日前から誘導後 7 日後まで投与) による神経保護効果の検討したところ、薬剤投与群では、虚血誘導 4 週間後の網膜内層菲薄化および網膜神経節細胞減少が有意に抑制されていた。また、2 週間後の網膜電図での評価では、薬剤投与群では網膜内層機能を反映する b 波振幅の減衰が抑制されていた。

(3)VCP ATPase 阻害剤の眼内局所投与の有効性の検討については、VCP ATPase 阻害剤の硝子体内投与 (25 µg/眼、虚血誘導 2 時間前) により、網膜虚血後の網膜内層菲薄化および網膜神経節細胞減少が軽減されることがわかった。

(4)VCP ATPase 阻害剤の神経保護効果メカニズムの検討では、VCP ATPase 阻害剤は小胞体ストレスを緩和することで、細胞死を抑制していることが明らかとなった。

<引用文献>

Ogawa S, Kitao Y, Hori O.
Ischemia-induced neuronal cell death and stress response. *Antioxid Redox Signal*. 2007 May;9(5):573-87.
Li H, Zhu X, Fang F, Jiang D, Tang L.
Down-regulation of GRP78 enhances apoptosis via CHOP pathway in retinal ischemia-reperfusion injury. *Neurosci Lett*. 2014 Jul 11;575:68-73.
Koike M, Fukushi J, Ichinohe Y, Higashimae N, Fujishiro M, Sasaki C, Yamaguchi M, Uchihara T, Yagishita S, Ohizumi H, Hori S, Kakizuka A.
Valosin-containing protein (VCP) in novel feedback machinery between

abnormal protein accumulation and transcriptional suppression. *J Biol Chem*. 2010 Jul 9;285(28):21736-49.
Ikeda HO, Sasaoka N, Koike M, Nakano N, Muraoka Y, Toda Y, Fuchigami T, Shudo T, Iwata A, Hori S, Yoshimura N, Kakizuka A. Novel VCP modulators mitigate major pathologies of rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa *Sci Rep*. 2014 Aug 6;4:5970.
Büchi ER. Exp Eye Res. Cell death in the rat retina after a pressure-induced ischaemia-reperfusion insult: an electron microscopic study. I. Ganglion cell layer and inner nuclear layer. 1992 Oct;55(4):605-13.
Bernstein SL, Guo Y, Kelman SE, Flower RW, Johnson MA. Functional and cellular responses in a novel rodent model of anterior ischemic optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Oct;44(10):4153-62.
Magill CK, Moore AM, Borschel GH, Mackinnon SE. A new model for facial nerve research: the novel transgenic Thy1-GFP rat. *Arch Facial Plast Surg*. 2010 Sep-Oct;12(5):315-20. doi: 10.1001/archfacial.2010.71.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Hata M, Ikeda HO, Kikkawa C, et al. KUS121, a VCP modulator, attenuates ischemic retinal cell death via suppressing endoplasmic reticulum stress. 査読有 *Sci Rep* 2017;7:44873.

〔学会発表〕(計2件)

畑匡侑 他、網膜虚血再灌流ラットモデルにおける valosin-containing protein modifier の神経保護効果の検討、第53回日本網膜硝子体学会総会、2014年11月28日-30日、「大阪国際会議場(大阪府大阪市)」

畑匡侑 他. Neuroprotective effects of a VCP modulator on rat models of ischemia and reperfusion-induced retinal degeneration. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 2014年5月4日-8日「オーランド(アメリカ合衆国)」

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：虚血性眼疾患の処置および/または予防用の医薬組成物

発明者：垣塚 彰、池田華子、吉村長久、畑匡侑

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：PCT/JP2015/055619

出願年月日：平成27年2月26日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑 匡侑 (HATA, Masayuki)

京都大学・医学部附属病院臨床研究総合センター・助教

研究者番号：70748269

(2) 研究協力者

池田華子 (IKEDA, Hanako)

京都大学・医学部附属病院臨床研究総合センター・准教授

村岡勇貴 (MURAOKA, Yuki)

京都大学・大学院医学研究科眼科学・助教

長谷川智子 (HASEGAWA, Tomoko)

京都大学・大学院医学研究科眼科学・大学院生

垣塚彰 (KAKIZUKA, Akira)

京都大学・生命科学研究科 高次生体統御学・教授