

令和元年6月3日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11298

研究課題名(和文) P23Hノックイン網膜色素変性症モデルにおけるミトコンドリア保護治療の効果

研究課題名(英文) Effect of mitochondria protection in the retinitis pigmentosa models of P23H rhodopsin mutation

研究代表者

鈴木 美砂 (Suzuki, Misa)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：30404966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヘテロP23Hロドプシン変異マウスの網膜視細胞層の菲薄化は生後6週で既に明らかで、生後10週ではさらに進行していた。生後3週齢でTUNEL assay陽性細胞すなわちアポトーシスを生じた細胞が視細胞でのみ見られた。ミトコンドリア抗酸化剤を3週齢から連日投与し、組織学的変化を解析したところ、6週齢においてアポトーシス細胞はむしろ増加していた。この結果は予想に反したものであったが、ミトコンドリア抗酸化剤は網膜色素変性症の病態に変化を与えたことになり、ミトコンドリアの状態が、病態と関連する可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性症は進行性の視野欠損を呈する疾患であり、最終的には失明に至りうる。日本でも世界でも4000-8000人に1人が発症し、国内失明原因の第3位である。本疾患は遺伝子異常が原因であり、有効な治療法は国内・海外共に確立されていない。早期発見をされた症例でも、特別な進行予防法がないまま、経過観察されるのが通常である。近年では疾患iPS研究などにより研究への機運は上がってきたが、未だ実現可能な治療法は報告されていない。そこで、本疾患のメカニズムを解析し、新規治療法の開発に向けた研究はアンメットニーズに答えることにつながり学術的のみならず社会的に重要である。

研究成果の概要(英文)：Thinning of the retinal photoreceptor cell layer in the heterozygotes of P23H rhodopsin mutant mice was significant in the postnatal 6 weeks old, and further progressed in the 10 weeks old. TUNEL positive cells and apoptotic cells were observed only in the photoreceptor layer at 3 weeks old. Mitochondria targeting antioxidant was constantly administered to the model from the age of 3 weeks old. The apoptotic cells were increased at 6 weeks old. The results were not what we had expected, however, we found that mitochondria condition affected the pathogenesis of the retinitis pigmentosa.

研究分野：網膜研究

キーワード：網膜 失明 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

【網膜色素変性症とは】

網膜色素変性症は進行性の視野欠損を呈する疾患であり、最終的には失明に至りうる。日本でも世界でも 4000-8000 人に 1 人が発症し、国内失明原因の第 3 位である。本疾患は遺伝子異常が原因であり、有効な治療法は国内・海外共に確立されていない。早期発見をされた症例でも、特別な進行予防法がないまま、経過観察されるのが通常である。近年では疾患 iPS 研究などにより研究への機運は上がってきたが、未だ実現可能な治療法は報告されていない。

【ロドプシン異常による網膜色素変性症】

網膜色素変性症の原因遺伝子は、報告されているだけで 50 個ほどあり(Daiger et al. Clin Genet 2013)、その中で光受容体の性質を決める視物質ロドプシンの異常は最も多く報告されている(Kaushal. Trans Am Ophthalmol Soc 2006)。視野欠損は中間部から始まり中心と周辺に向かって進行し、ロドプシン異常では特に進行が速く失明に至る症例が多い(図 1)。

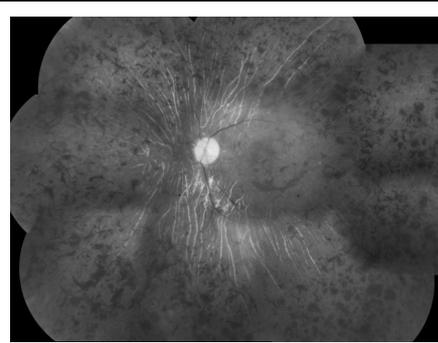


図 1 ロドプシン異常による網膜色素変性症患者の眼底写真。眼底中間部から中心へと特徴的な骨小体様の色素沈着に代表される病変がみられ、徐々に増加すると共に視野欠損が進行する。

ロドプシン異常の中でも米国で最も多いものがロドプシタンパクの N-末端から 23 番目のプロリンがヒスチジンに変わった Rho P23H (P23H) であり、常染色体優性遺伝を呈す。アメリカの網膜色素変性症の約 10% を占める。この変異については、細胞レベル、遺伝子改変マウスレベルで世界的に研究が行なわれているが、未だ確立された治療法はない。また、N-末端から 23 番目のプロリンがヒスチジンに変わる以外にもロドプシン変異による網膜色素変性症は複数あり、そのいくつかは、P23H 変異と同様の病態を示すであろうことが、ロドプシタンパクの構造変化のシミュレーションから、言われている。

P23H やその他の多くのロドプシン遺伝子異常では、細胞に強制発現させた実験等から、異常ロドプシタンパクの異常折りたたみ(misfolding)が生じ、それが蓄積することが細胞死につながると考えられてきた(Mendes et al. TRENDS in Molecular Medicine 2005)。misfolding した異常タンパクは一般に小胞体ストレスを引き起こし、これが細胞内の Ca^{2+} を放出させてミトコンドリアの呼吸鎖に作用し、ミトコンドリアの酸化ストレスを生じさせることが知られる(Bhandary et al. Int J Mol Sci 2013)。酸化ストレスはミトコンドリアの機能の過程で発生するものであり、内因性の抗酸化酵素の発現等による自浄能力があるが、それを超えた酸化ストレスの発生は、ミトコンドリア障害、ひいては細胞障害・細胞死につながりうる。そこで本研究では、Rho P23H 網膜色素変性モデルマウスにおいて酸化ストレスを抑制することが治療効果につながるかを解析することとした。

ミトコンドリアの呼吸システムは ATP を産生するとともに活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)を産生する。細胞内酸化ストレスを抑制するための抗酸化剤には、N-acetyl-cysteine (NAC) やレスベラトロール等、数多くあるが、ミトコンドリアに直接作用するものに MitoQ₁₀ (James, Murphy et al. JBC, 2005) がある。これはミトコンドリア内膜に取り込まれて、ROS による lipid peroxidation を抑制し、脂質二重膜への病的影響を抑制する。さらに、電子伝達系にある Complex II により還元され再利用可能な効率のよい抗酸化剤である。

そこで、MitoQ₁₀ を用いれば、P23H ロドプシン異常マウスのミトコンドリア酸化ストレスを抑制し、視細胞死を抑制できると考えた(図 2)。

その機構を解析すれば病態メカニズムの一端を解明し得る。ミトコンドリアで産生された ROS はミトコンドリアに対して障害を与えるばかりか、ミトコンドリアから流出して細胞全体に障害を与える可能性がある。また、ミトコンドリア障害自体が、細胞のエネルギー(ATP) 確保に支障をきたすため、細胞死の原因となりうる。なお、MitoQ₁₀ は既に、パーキンソン病や Friederich 病に対して臨床試験が行われており、臨床応用に近い位置にある (Murphy & Smith Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007)。



2. 研究の目的

P23H ロドプシン異常網膜色素変性症モデルマウスの表現型を解析したうえで、本モデルマウスに対して MitoQ₁₀ を投与し、視細胞の状態を解析する。MitoQ₁₀ の投与・非投与群における TUNEL 染色等による視細胞アポトーシスを組織学的に解析し比較する。これにより、将来的にはヒトにミトコンドリアや酸化ストレスに介入する新規治療法の可能性があるかを解析する。

3. 研究の方法

計画1. P23Hロドプシン異常網膜色素変性モデルマウスの網膜変性の過程を解析した。

P23Hロドプシン異常網膜色素変性症マウス(P23Hマウス)はPalczewski教授の研究室(米国 Case Western Reserve University)から既に供与され、当研究室で飼育中である。ロドプシタンパクのN-末端から23番目のプロリンがヒスチジンに置き換えられたノックインマウスである(Palczewski et al. Hum Mol Genet 2014)。出生後経時的にこのマウスの眼球を採取し、網膜切片を解析した。P23Hロドプシンヘテロマウス及びホモマウスについて、雄マウスを用いて、ヘマトキシリンエオジン染色をもとに解析した。

計画2. P23Hロドプシン異常網膜色素変性モデルマウスの網膜細胞のアポトーシスを解析した。

23Hロドプシンヘテロマウス及びホモマウスについて、雄マウスを用いて、出生後経時的に眼球を採取し、網膜切片を作製したうえで、ApopTag Red apoptosis detection kit (Millipore, Bedford, MA, USA) を用いてTdT-mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) assayにより染色し、蛍光顕微鏡(Olympus Co., Tokyo, Japan)で観察した。

計画3. P23Hマウスにおける網膜内酸化ストレスとMitoQ₁₀投与の効果解析した。

計画1と2に準じて、MitoQ₁₀を連日投与し、組織学的変化を解析した。投与は、網膜変性の始まる時期が生後3週前後であったため、生後3週目から週5回の腹腔内投与とし、容量は全身状態に影響がないことを確認したうえで決定した。

4. 研究成果

計画1により解析したところ、ヘテロP23Hロドプシン変異マウスの網膜視細胞層の菲薄化は生後6週で既に明らか(図3)で、生後10週ではさらに進行していた。ホモP23H ロドプシン変異マウスについては生後3週で既に変性しており生後10週ではほぼ視細胞が消失していた。ヒトP23Hロドプシン変異は優性遺伝であり、ヘテロで発症することと、ホモモデルマウスの変性が非常に速く介入の効果が検出できない可能性が高いことから、ヘテロP23Hロドプシン変異マウスの解析を進めることとした。

計画2により解析したところ、ヘテロP23Hロドプシン変異マウスでは、生後3週齢でTUNEL assay陽性細胞すなわちアポトーシスを生じた細胞が視細胞でのみ見られた。また、生後3週齢のほか、6週齢、10週齢の網膜も解析したところ、それらに比べ生後3週齢で特にアポトーシス細胞の出現が多いことが明らかとなった。すなわち、生後3週齢で最も視細胞死を生じ、その後、それ以外の視細胞の死がゆっくり進行していき、徐々に視細胞層の菲薄化が進むものと考えられた。

計画3により、MitoQ₁₀を3週齢から連日投与し、組織学的変化を解析したところ、6週齢において明らかアポトーシス細胞はむしろ増加していた。

この結果は予想に反したものであったが、MitoQ₁₀は網膜色素変性症の病態に変化を与えたことにはなり、ミトコンドリアの内膜の状態が、病態と関連する可能性があると考えられた。MitoQ₁₀を治療に用いる仮説とは別の結果ではあったが、P23Hロドプシン変異による網膜変性の進行には、ミトコンドリアの状態が関与しうる可能性が示唆されることとなった。

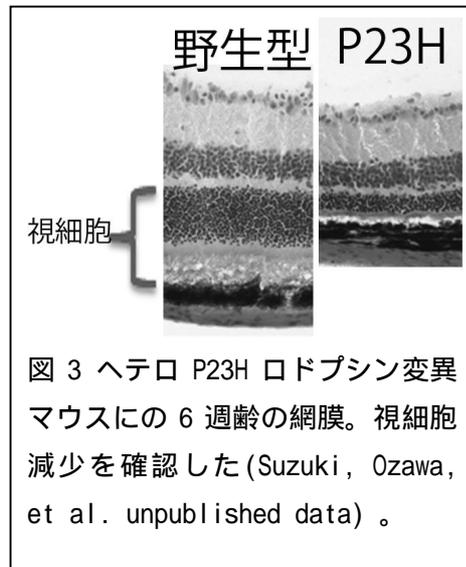


図3 ヘテロ P23H ロドプシン変異マウスにの6週齢の網膜。視細胞減少を確認した(Suzuki, Ozawa, et al. unpublished data)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1. QD laser eyewear as a visual field aid in a visual field defect model.
Iyama C, Shigeno Y, Hirano E, Kamoshita M, Nagai N, Suzuki M, Minami S, Kurihara T, Sonobe H, Watanabe K, Shinoda H, Tsubota K, Ozawa Y. Sci Rep. 2019 Jan 30;9(1):1010. doi: 10.1038/s41598-018-37744-8. 査読あり
2. Benefits of aflibercept treatment for age-related macular degeneration patients with good best-corrected visual acuity at baseline.
Minami S, Nagai N, Suzuki M, Kurihara T, Sonobe H, Kamoshita M, Uchida A, Shinoda H, Takagi H, Sonoda S, Sakamoto T, Tsubota K, Ozawa Y. Sci Rep. 2018 Jan 8;8(1):58. doi: 10.1038/s41598-017-18255-4. 査読あり
3. Absolute and estimated values of macular pigment optical density in young and aged Asian participants with or without age-related macular degeneration.
Ozawa Y, Shigeno Y, Nagai N, Suzuki M, Kurihara T, Minami S, Hirano E, Shinoda H, Kobayashi S, Tsubota K. BMC Ophthalmol. 2017 Aug 29;17(1):161. doi: 10.1186/s12886-017-0557-5. 査読あり
4. Predictive factors of better outcomes by monotherapy of an antivascular endothelial growth factor drug, ranibizumab, for diabetic macular edema in clinical practice.
Sato S, Shinoda H, Nagai N, Suzuki M, Uchida A, Kurihara T, Kamoshita M, Tomita Y, Iyama C, Minami S, Yuki K, Tsubota K, Ozawa Y. Medicine (Baltimore). 2017 Apr;96(16):e6459. doi: 10.1097/MD.0000000000006459. 査読あり
5. Non-responsiveness to intravitreal aflibercept treatment in neovascular age-related macular degeneration: implications of serous pigment epithelial detachment.
Nagai N, Suzuki M, Uchida A, Kurihara T, Kamoshita M, Minami S, Shinoda H, Tsubota K, Ozawa Y. Sci Rep. 2016 Jul; 11; 6: 29619. 査読あり
6. Distinct Responsiveness to Intravitreal Ranibizumab Therapy in Polypoidal Choroidal Vasculopathy With Single or Multiple Polyps. Suzuki M, Nagai N, Shinoda H, Uchida A,

Kurihara T, Tomita Y, Kamoshita M, Iyama C, Tsubota K, Ozawa Y. Am J Ophthalmol. 2016 Jun;166:52-59. doi: 10.1016/j.ajo.2016.03.024. Epub 2016 Mar 24. 査読あり

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 鈴木美砂、永井紀博、南早紀子、園部秀樹、鴨下衛、渡邊一弘、栗原俊英、篠田肇、坪田一男、小沢洋子。視力良好例の網膜中心静脈分枝閉塞症に伴う黄斑浮腫に対するラニビズマブ投与の検討。第 57 回日本網膜硝子体学会総会。2018。
2. 南早紀子、永井紀博、鈴木美砂、栗原俊英、内田敦郎、鴨下衛、園部秀樹、篠田肇、園田祥三、坂本泰二、坪田一男、小沢洋子。視力良好な滲出型加齢黄斑変性におけるアフリベルセプト硝子体内注射の脈絡膜の解析。第 121 回日本眼科学会総会。2017。
3. 永井紀博、鈴木美砂、南早紀子、栗原俊英、鴨下衛、篠田肇、坪田一男、小沢洋子。糖尿病黄斑浮腫の嚢胞反射強度とラニビズマブ硝子体内注射後の網膜外層変化。第 121 回日本眼科学会総会。2017。
4. 鈴木美砂、永井紀博、栗原俊英、南早紀子、鴨下衛、園部秀樹、内田敦郎、篠田肇、坪田一男、小沢洋子。網膜中心静脈分枝閉塞症の黄斑浮腫に対するラニビズマブ投与後の視力と再発予測因子。第 71 回日本臨床眼科学会。2017。
5. 永井紀博、鈴木美砂、南早紀子、栗原俊英、篠田肇、坪田一男、小沢洋子。健常者の黄斑色素密度と OCT 所見の相関。第 71 回日本臨床眼科学会。2017。
6. 南早紀子、永井紀博、鈴木美砂、栗原俊英、鴨下衛、園部秀樹、篠田肇、坪田一男、小沢洋子。日本人健常者の EvokeDx 網膜電図所見。第 71 回日本臨床眼科学会。2017。
7. Nagai N, Suzuki M, Uchida A, Kurihara T, Kamoshita M, Minami S, Shinoda H, Tsubota K, Ozawa Y. Predictive factors for non-response to intravitreal aflibercept treatment in neovascular age-related macular degeneration. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2016.
8. Minami S, Nagai N, Suzuki M, Kurihara T, Shinoda H, Tsubota K, Ozawa Y. Treatment Responses to the Intravitreal Aflibercept in Polypoidal Choroidal Vasculopathy at year 1. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2016.
9. 南早紀子、永井紀博、鈴木美砂、栗原俊英、鴨下衛、内田敦郎、篠田肇、坪田一男、小沢洋子。視力良好な滲出型加齢黄斑変性に対するアフリベルセプト硝子体内注射の前向き研究。第 120 回 日本眼科学会総会。2016。
10. 永井紀博、鈴木美砂、南早紀子、内田敦郎、栗原俊英、鴨下衛、篠田肇、坪田一男、小沢洋子。漿液性網膜色素上皮剥離を合併する加齢黄斑変性に対するアフリベルセプト。第 70 回 日本臨床眼科学会。2016。

11. 南早紀子, 永井紀博, 鈴木美砂, 栗原俊英, 鴨下衛, 内田敦郎, 篠田肇, 坪田一男, 小沢洋子. ポリブ上脈絡膜血管症に対するアフリベルセプト硝子体内注射の効果の解析. 第70回 日本臨床眼科学会. 2016.
12. 南早紀子, 永井紀博, 鈴木美砂, 栗原俊英, 鴨下衛, 内田敦郎, 篠田肇, 坪田一男, 小沢洋子. 視力良好な滲出型加齢黄斑変性に対するアフリベルセプト硝子体内注射の前向き研究. 第55回 日本網膜硝子体学会総会. 2016.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小澤 洋子

ローマ字氏名：OZAWA, Yoko

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：専任講師

研究者番号(8桁)：90265885

(2)研究協力者

研究協力者氏名：川島 弘彦

ローマ字氏名：KAWASHIMA, Hirohiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。