

令和元年6月20日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11313

研究課題名(和文) 網膜色素変性に対するカルパイン分子標的を応用した新規治療法

研究課題名(英文) Development of novel treatment for retinitis pigmentosa using molecular target to calpain

研究代表者

中澤 満 (Nakazawa, Mitsuru)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：80180272

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)：我々が開発したラットのミトコンドリアカルパイン-1の活性を特異的に競合阻害するペプチドを用いて、網膜色素変性モデルラットに投与することで視細胞変性の進行を阻止できるかどうかを検討することを最終目的として研究を進めた。網膜変性モデルラットとしてRCSラットを用いて、まず網膜変性の自然経過を光干渉断層計にて詳細に観察した後、カルパイン阻害ペプチドを徐放するデバイスを作成してそのデバイスがラット眼球結膜下に安全かつ確実に埋植できることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いまだ有効な治療法のない網膜色素変性についてその本質である視細胞死を直接の標的とする治療法の開発を目的とした研究である。カルパイン阻害ペプチドを投与することで視細胞死の進行が少しでも遅延させることができればそれだけ患者の視機能保持期間の延長につながる。本研究はカルパイン阻害ペプチドの細胞死阻害効果を臨床的に応用する道筋を見いだすことを目標としており、ペプチドの徐放デバイスの安全性が確認できたことはさらに次の段階へと進む基盤となったことを示している。

研究成果の概要(英文)：We previously developed a peptide that could specifically inhibit the activation of rat mitochondrial calpain-1. This research project has aimed to confirm the effect of photoreceptor protection by the calpain inhibitory peptide on retinal degeneration model rats. We first observed the natural course of photoreceptor degeneration in RCS rats by optical coherence tomography. And then, we created a slowly releasing device of the calpain inhibitory peptide. We transplanted the device into the subconjunctival space of the RCS rats and confirmed the safety and stability of using the device transplanted into the subconjunctival space.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素変性 カルパイン 視細胞死 ミトコンドリアカルパイン ペプチド治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 網膜色素変性と視細胞死について

網膜色素変性は進行性の視細胞変性を本態とする遺伝性網膜変性疾患である。その原因となる遺伝子はすでに約 80 種類程度明らかになり、その知見に基づいて視細胞死のメカニズムが徐々に解明されようとしている。近年、細胞死に関する研究が徐々に進み、網膜色素変性における視細胞死が以前考えられたカスパーゼ依存性アポトーシスのみで起こる単純な機構ではなく、カスパーゼ非依存性アポトーシスやネクロトーシス、オートファジーなど様々な反応経路を駆使して達成されるきわめて多様性に富む反応であることが明らかにされてきた。その中でもカルパインがいくつかの細胞死経路に共通に働くことが分かっている。

2) 網膜色素変性とカルパインについて

我々は視細胞死におけるカルパインとアポトーシス誘導因子 (apoptosis inducing factor, AIF) の関与に注目し、網膜変性モデル動物において変性の進行にともなって網膜内でカルパイン活性が高まることや視細胞死に AIF が関与することを報告した。さらに AIF 活性化を触媒する酵素としてミトコンドリア・カルパインにも注目し、ミトコンドリア・カルパインの活性化を特異的に阻害する低分子デコイペプチドを合成した。このペプチドは膜透過を誘導するアミノ酸配列を含むため、網膜へ有効量が送達されさえすれば視細胞内やさらにミトコンドリア膜内にも容易に取り込まれる特性を有している。したがって、本ペプチドはミトコンドリア・カルパインを分子標的とした新規の視細胞保護治療の有望な候補となりうるポテンシャルを有していると言える。

2. 研究の目的

本研究ではカルパイン阻害ペプチドの遺伝性網膜変性疾患への治療効果を明らかにすることを目的として、以下の3点に絞って明らかにしたいと考えた。

- 1) カルパイン阻害ペプチドが点眼投与によってウサギ網膜まで送達できるか。
- 2) カルパイン阻害ペプチドを徐放するデバイスを作成してその効果を検証する。
- 3) ヒト由来細胞、とくに培養網膜色素上皮細胞を用い、酸化ストレス環境で培養して細胞死を誘発し、それがカルパイン阻害ペプチドによって抑制されるかどうかを解析する。

3. 研究の方法

- 1) 各種濃度のカルパイン阻害ペプチド (Tat- μ CL) をウサギに点眼し、免疫組織化学にて網膜への送達の有無を検討する。
- 2) カルパイン阻害ペプチドを徐放するデバイスを作成する。本研究課題ではまず安全性試験を行う。
- 3) ヒト網膜色素上皮細胞を用いて培養系でヒト型カルパイン阻害ペプチドの細胞死抑制効果を解析する。

4. 研究成果

1) カルパイン阻害ペプチドの網膜への送達法の検討と薬物動態

SD ラットに対して 1mM の Tat- μ CL 液 (0.9%NaCl に溶解) を 1 滴点眼すると 1 時間後には後極部の網膜視細胞や視神経乳頭にまでペプチドが到達していた。1 時間後、3 時間後および 6 時間後の網膜内の濃度はそれぞれ 15.3, 5.8, 1.0 pg/mg protein であり、時間と共に急速に減衰す

るものの、in vitro における Tat- μ CL の IC50 (197nM) に比べるといずれも高値を示した。本研究ではさらに対象をウサギとして、Tat- μ CL 濃度を 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 および 20.0 mM として点眼し、点眼 1 時間後の網膜内ペプチドの移行を免疫組織化学にて検討した。

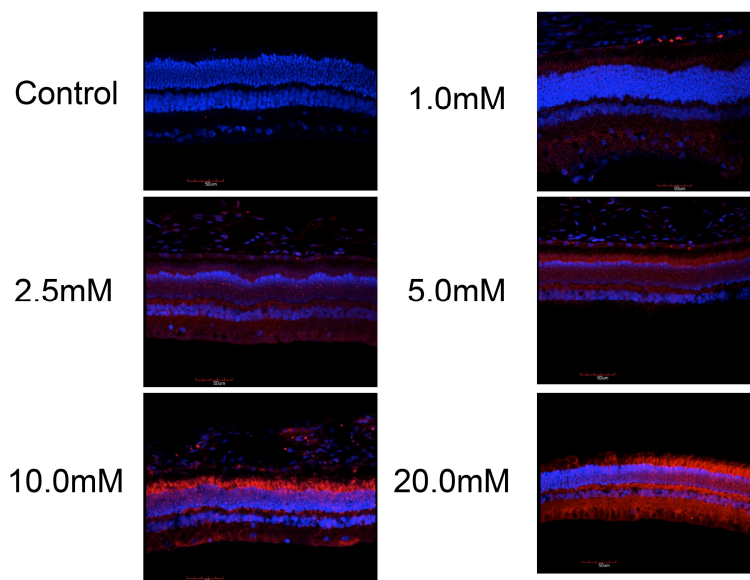


図 1 各種濃度の Tat- μ CL 点眼 1 時間後のウサギ網膜でのペプチド分布。赤色がペプチドの免疫染色、青色は DAPI による核染色を示す。網膜は下方が内層（硝子体側）であり上方が視細胞外節側を示す。

結果を図 1 に示す。1.0 mM 濃度のペプチドでもわずかに網膜内しかも網膜内層と視細胞外節への送達を観察され、その分布は濃度依存性に濃く染色されることが明らかとなった。網膜内濃度については測定していないが、カルパイン阻害ペプチドのような分子量 2,000 程度の物質でもウサギのような中動物の眼球後極に点眼によって送達できることが明らかとなった。

2) カルパインペプチド徐放デバイスの RCS ラットへの効果 (安全性試験)

阿部俊明教授(東北大学)から新規のカルパイン阻害ペプチド徐放デバイスの供給を受けた。これを生後 18 日の RCS ラット野性型の結膜下に埋植した。右眼にペプチド、左眼には対照のスクランブルをそれぞれ徐放できるデバイスとした。28 日後に OCT と ERG を測定してその安全性を確認した。

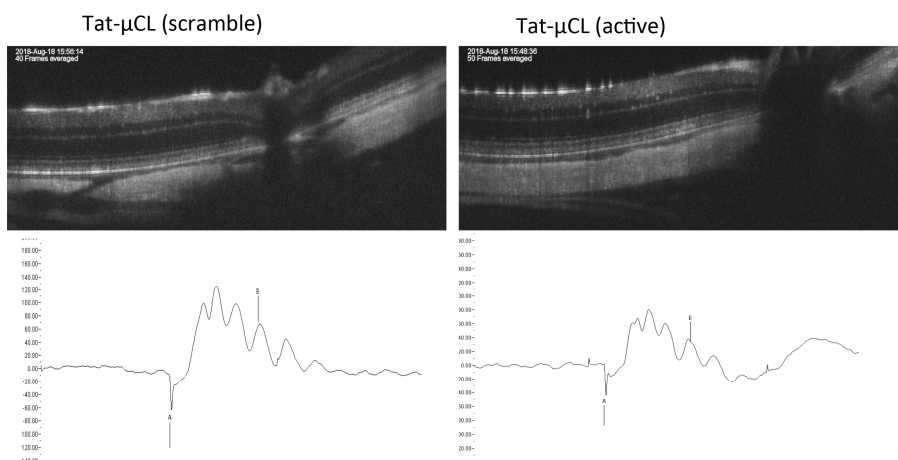


図 2 カルパイン阻害ペプチド徐放デバイスの安全性試験 (野性型 RCS ラット)。左上段は対照 (非活性) 群の OCT、右上段はペプチド(活性)群の代表的 OCT。下段はそれぞれに対応す

る ERG 所見。

結果を図 2 に示す。両群とも OCT による形態ではほぼ正常所見を示した。ERG では a 波振幅はペプチド群 48.64 ± 17.15 , 対照群 $39.80 \pm 9.50 \mu\text{V}$ であり、b 波振幅はそれぞれ 137.08 ± 47.80 , $118.20 \pm 46.36 \mu\text{V}$ であり両群間にはいずれも有意差はみられなかった ($P = 0.333$ および 0.544 , $n = 5$)。このことからデバイス埋植による安全性が確認された。このデバイスの効果に関しては以降の研究にて検討したいと考えている。

3) 培養ヒト網膜色素上皮細胞を用いたヒト型カルパインペプチドの効果

ラットでの視細胞保護効果がヒト細胞でも同様に認められるかどうかを検証した。ヒト網膜色素上皮細胞に過酸化水素を作用させ酸化ストレスに対するカルパイン阻害ペプチドの効果を検討したが、この条件ではペプチドには細胞死抑制効果はみられなかった。細胞死の条件設定などの検討が必要であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

- ① Sugano E, Tabata K, Takezawa T, Shiraiwa R, Muraoka H, Metoki T, Kudo A, Nakazawa M, Tomita H, Iwama Y. N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor degeneration is inhibited by nicotinamide via the blockade of upstream events before the phosphorylation of signaling proteins. *BioMed Res Int*, 査読有, 2019, 2019, Article ID 3238719, DOI: org/10.1155/2019/3238719
- ② Tanabu R, Sato K, Monai N, Yamauchi K, Gonome T, Xie Y, Takahashi S, Ishiguro S, Nakazawa M. The findings of optical coherence tomography of retinal degeneration in relation to the morphological and electroretinographic features in RPE65^{-/-} mice. *PLOS ONE*, 査読有, 14(1), 2018, e0210439, DOI: org/10.1371/journal.pone.0210439
- ③ Yamauchi K, Tanabu R, Monai N, Gonome T, Xie Y, Takahashi S, Ishiguro S, Nakazawa M. The spectral domain optical coherence tomography findings associated with morphological and electrophysiological changes in a rat model of retinal degeneration, rhodopsin S334twr-4 rats. *BioMed Res Int*, 査読有, 2018, 2018, Article ID 5174986 DOI: org/10.1155/2018/5174986
- ④ Suzuki Y, Adachi K, Jinnai Yoshihiro, Suzuki K, Nakazawa M Intraocular lens intracapsular fixation with unilateral loop suture for 180 degree Zinn's zonule dialysis. *Clinical Ophthalmology*, 査読有, 12, 2018, 2087-2093, eCollection, DOI: 10.2147/OPHTH.S176823
- ⑤ Yamauchi K, Nakazawa M, Kato C, Takahashi D. Transient macular damage during smartphone usage. *Current Trends in Ophthalmology*, 査読有, 1(1), 2018, 71-74
- ⑥ Kudo A, Kudo T, Takahashi D, Metoki T, Suzuki Y, Nakazawa M. Macular edema associated with intraocular ointment after cataract surgery. *American Journal of Ophthalmology Case Reports*, 査読有, 10, 2018, 152-156, DOI: org/10.1016/j.ajoc.2018.02.027
- ⑦ Monai N, Yamauchi K, Tanabu R, Gonome, Ishiguro S, Nakazawa M. Characterization of photoreceptor degeneration in the rhodopsin P23H transgenic rat line 2 using optical coherence tomography. *PLOS ONE*, 査読有, 13(3), 2018, e0193778. DOI: org/10.1016/j.ajoc.2018.02.027
- ⑧ Monai N, Tanabu R, Gonome T, Yokoi K, Urushidate S, Morohashi S, Hirai H, Kurose A, Nakazawa M. Intraoperative adjunctive mitomycin C and cryotherapy for recurrent conjunctival papillary sebaceous carcinoma. *Case Reports in Ophthalmology*, 査読有, 9, 2018, 221-226 DOI.org/10.1159/000487704.
- ⑨ Tanabu R, Suzuki Y, Suzuki K, Takahashi S, Nakazawa M, Mizutani H. Macular hole caused by retained subfoveal perfluorocarbon that subsequently closed after spontaneous resolution: A case report. *Ophthalmology and Therapy*, 査読有, 6, 2017, 381-384, DOI 10.1007/s40123-0107-5.
- ⑩ Suzuki Y, Adachi K, Takahashi S, Maeno A, Nakazawa M. Oxidative stress in the vitreous fluid with rhegmatogenous retinal detachment. *J Clin Exp Ophthalmol*, 査読有, 6, 2017, 682-686

DOI:10.4172/2155-9570.1000682

Hayashi T, Sasano H, Katagiri S, Tsunoda K, Kameya S, Nakazawa M, Iwata T, Tsuneoka H. Heterozygous deletion of the OPA1 gene in patients with dominant optic atrophy. *Jpn J Ophthalmol*, 査読有, 61(5), 2017, 395-401, DOI: 10.1007/s10364-017-0522-0.

Takahashi S, Adachi K, Suzuki Y, Maeno A, Nakazawa M. Profiles of inflammatory cytokines in the vitreous fluid from patients with rhegmatogenous retinal detachment and their correlations with clinical features. *BioMed Res Int*, 査読有, 2016, article ID 4256183, DOI:10.1155/2016/4256183

Suzuki Y, Suzuki K, Kudo T, Metoki T, Nakazawa M. Level of vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of proliferative diabetic retinopathy patients and postoperative complications of vitrectomy. *Ophthalmologica*, 査読有, 236, 2016, 133-138, DOI: 10.1159/000449261

Adachi K, Takahashi S, Yamauchi K, Mounai N, Tanabu R, Nakazawa M. Optical coherence tomography of retinal degeneration in Royal College of Surgeons rats and its correlation with morphology and electroretinography. *PLOS ONE*, 査読有, 11(9), 2016, e0162835 DOI:10.1371/journal.pone.0162835.

Gonome T, Suzuki Y, Metoki T, Takahashi S, Nakazawa M. Acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy and granulomatous uveitis following influenza vaccination. *Am J Ophthalmol Case Reports*, 査読有, 6, 2016, 60-63, DOI: 10.1016/j.ajoc.2016.08.008

© Maeno A, Suzuki Y, Adachi K, Takahashi S, Yokoi Y, Nakazawa M. Characterization of biological antioxidant potential in the vitreous fluid from patients with rhegmatogenous retinal detachment. *Acta Ophthalmol* 査読有, 94 (6), 2016, e515-516, DOI: 10.1111/aos.13002.

〔学会発表〕(計 12 件)

鈴木幸彦、安達功武、毛内奈津姫、田名部玲子、鈴木 香、工藤孝志、中澤 満。硝子体手術用ポートを利用した眼内レンズ強膜内固定法。第 123 回日本眼科学会、2019。

中澤 満、安達功武、高橋 静、毛内奈津姫、山内宏大、田名部玲子、江目孝幸、謝 玉婷、石黒誠一、佐藤孝太。各種網膜変性モデルでの OCT 所見、網膜電図および視細胞形態の関連性。第 123 回日本眼科学会、2019。

高橋 静、工藤朝香、中澤 満。色素性静脈周囲網脈絡膜萎縮症 4 症例の臨床像。第 123 回日本眼科学会、2019。

江目孝幸、山内宏大、田名部玲子、毛内奈津姫、謝 玉婷、中澤 満。GLAST ノックアウトマウスの網膜各層厚の経時変化。第 123 回日本眼科学会、2019。

謝 玉婷、中澤 満、山内宏大、毛内奈津姫、田名部玲子、江目孝幸。Optical coherence tomographic analysis of RDH5 knockout mice。第 123 回日本眼科学会、2019。

田名部玲子、毛内奈津姫、工藤孝志、鈴木 香、目時友美、中澤 満。RPE65 ノックアウトマウス視細胞変性過程の OCT を用いた定性的および定量的解析。第 122 回日本眼科学会、2018。

鈴木幸彦、安達功武、工藤孝志、鈴木 香、目時友美、中澤 満。術前網膜光凝固の有無による糖尿病網膜症の硝子体サイトカインと術後炎症。第 122 回日本眼科学会、2018。

山内宏大、田名部玲子、毛内奈津姫、高橋 静、安達功武、中澤 満。ロドプシン S334ter 変異ラットの網膜変性の OCT による解析。第 121 回日本眼科学会、2017。

毛内奈津姫、田名部玲子、山内宏大、高橋 静、安達功武、中澤 満。ロドプシン P23H 変異ラットの網膜変性過程の OCT による解析。第 121 回日本眼科学会、2017。

鈴木幸彦、安達功武、工藤孝志、鈴木 香、目時友美、中澤 満。増殖糖尿病網膜症に対する汎網膜光凝固既往の有無による硝子体サイトカイン濃度の差。第 121 回日本眼科学会、2017。

⑩ 安達功武、高橋 静、中澤 満。RCS ラット網膜変性自然経過の OCT 所見。第 20 回眼科分

子生物研究会、2016.

◎ 安達功武、高橋 静、中澤 満 . RCS ラットにおける自然経過での OCT 変化 . 第 120 回日本眼科学会、2016

〔図書〕(計 3 件)

中澤 満、村上 晶、園田康平、編 . 医学書院、標準眼科学 第 14 版、2019, 406 ページ

中澤 満、村上 晶、編 . 医学書院、標準眼科学 第 13 版、2016, 306 ページ

中澤 満 . 医学書院、眼科臨床エキスパート、網膜変性疾患診療のすべて、2016, 390 ページ中の 5 ページ

〔その他〕

ホームページ等：弘前大学大学院医学研究科眼科学教室ホームページ

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~ophthal/consult.html>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者
該当なし

(2) 研究協力者
該当なし