

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20298

研究課題名(和文)新規機能ペプチドによる網膜神経節細胞保護療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel peptides for protecting retinal ganglion cells.

研究代表者

尾崎 拓(Ozaki, Taku)

岩手大学・理工学部・准教授

研究者番号：70621069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、緑内障に対する新たな点眼薬を開発することを目的として実施した。申請者らは近年、網膜の細胞死と密接に関わっているミトコンドリアカルパイン-1を特異的に阻害するペプチドの開発に成功した。本ペプチドは、点眼によって網膜や視神経乳頭まで送達され、視細胞変性モデルに対して視細胞保護効果が認められた。眼圧・虚血モデルでの神経節細胞死に対しても保護効果が認められた。本研究では、培養細胞、器官培養網膜および緑内障モデルマウスを用いて神経節細胞死に対するペプチドの効果を総合的に評価したところ、ペプチドの有効性が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の緑内障治療は眼圧下降を目的として行われているが、眼圧が正常または眼圧を十分に下降させてもなお視野障害が進行する症例が本邦の約7割を占めるため、神経節細胞の保護を目的とした治療薬の開発が強く望まれている。申請者らは以前、緑内障性神経節細胞死においてミトコンドリアカルパインとAIFが関与していることを世界に先駆けて証明した。さらに、本研究により、新規緑内障治療薬の候補薬剤を新たに生み出したことで、非臨床試験へと展開できる可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a novel eye drops for glaucoma. We have recently succeeded in developing a peptide that specifically inhibits mitochondrial calpain-1, which is related to cell death in the retina. The peptide was delivered to the retina and optic disc by eye drops, and a protective effect on photoreceptor cells was observed in an animal model of retinitis pigmentosa. A protective effect was also observed against ganglion cell death in the ocular hypertension / ischemia. In the present study, the efficacy of the peptide was confirmed by comprehensively evaluating the effect of the peptide on ganglion cell death using cultured cells, organ culture retina, and glaucoma model mouse.

研究分野：細胞生化学

キーワード：ペプチド 点眼薬 緑内障 網膜神経節細胞 ミトコンドリア カルパイン モデルマウス 神経保護

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

1. 研究開始当初の背景

申請者らは2007年に新規タンパク質分解酵素であるミトコンドリア μ -カルパインを発見した(研究業績26)。その後、生体内特に網膜における生理機能を調べたところ、アポトーシス誘導因子(AIF)依存的な細胞死を誘導する重要な酵素であることが分かった。そこで、ミトコンドリア μ -カルパインを特異的に阻害することで細胞死を抑制することを目標に掲げ、ペプチド医薬の開発に着手した。その結果、ミトコンドリア μ -カルパインと分子シャペロン ERp57との結合を競合的に阻害することによって細胞死を抑制するペプチドを発見した。本ペプチドは、点眼によって網膜まで送達されることも証明され、さらに種々の視細胞変性モデルに対して視細胞保護効果と視機能保護効果を認めた。従って、本ペプチドは視細胞が変性していく網膜疾患である「網膜色素変性」の新規治療薬として期待されている。

緑内障は我が国における失明原因の第1位であり、失明対策上最も重要な疾患である。眼圧値が正常もしくは眼圧値を十分に低下させてもなお視野障害が進行する「正常眼圧緑内障」で本邦の約7割を占めることから、網膜の神経節細胞を保護する治療薬の開発が世界レベルで求められている。

そこで前回採択された若手研究(B)により、本ペプチドの新規緑内障治療薬としての可能性を一部評価した。評価方法としては、高眼圧・虚血モデルに対して本ペプチドの点眼を行い、神経節細胞死と視機能を調べた。その結果、本ペプチドは神経節細胞死を有意に阻害して、視機能低下に対しても抑制効果を示した。さらに、網膜色素変性モデルの視細胞死にて観察されたように、虚血性の神経節細胞死においてもAIF依存性細胞死が起こっていることが明らかとなり、本ペプチドの神経保護効果を裏付ける結果が得られた。そこで本研究では、新規緑内障治療薬としての本ペプチドの潜在性と信憑性をさらに深めるため、マウス神経節細胞由来 RGC-5 や器官培養網膜、3種の緑内障モデルマウスを用いて、神経節細胞保護効果を検証した。

2. 研究の目的

申請者らは近年、網膜の細胞死と密接に関わっているミトコンドリア μ -カルパインを特異的に阻害するペプチド(Tat- μ CL)の開発に成功した。本ペプチドは、点眼によって網膜や視神経乳頭まで送達され、視細胞変性モデルに対して視細胞保護効果が認められた。さらに、前回採択された科研費【若手研究(B), H25-27】により、高眼圧・虚血モデルにおける神経節細胞死に対しても保護効果を認めた。そこで本研究では、培養細胞、器官培養網膜および緑内障モデルマウスを用いて神経節細胞死に対する本ペプチドの効果を総合的に評価することを目的とする。

3. 研究の方法

具体的には以下の3項目を実施した。

- 1) マウス神経節細胞由来 RGC-5 において本ペプチドの効果を評価 (in vitro 解析)
- 2) 低酸素培養したマウス網膜の神経節細胞において本ペプチドの効果を評価 (ex vivo 解析)
- 3) 緑内障モデルである NMDA 硝子体注入マウス、視神経軸索障害マウス、およびグルタミン酸輸送体欠損マウスを用いて、本ペプチドの神経保護効果を評価 (in vivo 解析)

(1) マウス神経節細胞由来 RGC-5 に対する本ペプチドの保護効果を評価

マウス神経節細胞由来 RGC-5 細胞においては、グルタミン酸、NMDA、過酸化水素などの添加により、細胞死が誘導されることが既に知られている。そこで RGC-5 細胞に対して予め本ペプチドを作用させておく。その上で上記の薬剤を添加して細胞死の程度を調べた。細胞死は、TUNEL 試験およびフローサイトメトリーにより評価した。また、本ペプチドによる細胞毒性の有無は MTS 試験にて既に評価しているため、その既知の至適濃度の範囲で実験を行った。さらに生化学的解析によりミトコンドリア μ -カルパインや AIF の活性化の程度を調べた。

(2) 低酸素培養したマウス網膜の神経節細胞に対する本ペプチドの保護効果を評価

申請者らは最近、網膜の新規器官培養法を確立した。透析膜を用いた微小環境による方法で24時間後でも網膜の各細胞が保持されている。本培養法では、酸素/窒素/二酸化炭素の混合ガスを用いているが、酸素濃度を低く設定すると双極細胞層と神経節細胞層が変性することが分かった。そこで本ペプチドを培地に加え、低酸素条件下で培養を行うことにより、神経節細胞死に対する保護効果を調べた。細胞死は TUNEL 試験により評価し、ミトコンドリア μ -カルパインや AIF の変化は免疫組織化学および生化学的解析にて評価した。新規器官培養法における本ペプチドの細胞毒性は、MTS 試験により評価した。

(3) 3種の緑内障モデルマウスに対する本ペプチドの神経節細胞保護効果を評価

申請者らは最近、虚血性の神経節細胞死においてミトコンドリア μ -カルパインと AIF が関与していることを見出した。この経路は、以下の3種の緑内障モデルマウスにおいても誘導されていると示唆される (Namekata et al. *Cell Death Differ* 2013; Ryu et al. *J Neurosci Res* 2012; Furuya

et al. *Curr Eye Res* 2012; Harada et al. *J Clin Invest* 2007)。そこで本研究では、これら緑内障モデルマウスに本ペプチドを連日点眼し、網膜神経節細胞に対する保護効果を継続的に評価した。

3-1. NMDA 硝子体注入マウスに対する本ペプチドの効果

野生型 C57BL/6 マウスに N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) を注射することにより網膜傷害を誘導した。本ペプチドは、NMDA 投与前 1 週間と投与後 3 週間に渡って 1 日 3 回、1mM の濃度で点眼した。対照群として、非点眼群、基剤点眼群およびランダムペプチド点眼群を用いる。NMDA 注射 3 日後、1 週間、2 週間、3 週間後に眼球を摘出し、TUNEL 試験にて網膜神経節細胞死を、フルオロゴールドラベリングした網膜のフラットマウントイメージングにて網膜神経節細胞の数を評価した。

3-2. 視神経軸索障害マウスに対する本ペプチドの効果

野生型 C57BL/6 マウスの片眼に視神経の物理的な挫滅とピンプラスチックの微小管傷害作用を利用して視神経の軸索流を障害するモデルを作製した。この障害により網膜神経節細胞の細胞死が起こることが知られている (Ryu et al. *J Neurosci Res* 2012)。本ペプチドは、モデル作製前 1 週間と作製後 1 週間に渡って 1 日 3 回、1mM の濃度で点眼した。対照実験ならびに解析は、上記 NMDA 硝子体注入マウスの実験方法に従って行った。

4. 研究成果

(1) RGC-5 細胞へグルタミン酸を作用させることで細胞死が誘導されていることを、位相差顕微鏡による形態学的観察や AnnexinV 染色、Pripidium Iodide 染色、TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 試験により評価した。その結果、グルタミン酸は RGC-5 に対して、ネクローシス様細胞死とアポトーシス様細胞死の双方を誘導することが示された。次に、RGC-5 細胞に対して本ペプチドが毒性を示すのか否かを形態学的観察、MTS 試験、TUNEL 試験により評価した。その結果、いずれの評価項目においても、本ペプチドは RGC-5 細胞に対して細胞毒性を示さないことが分かった。続いて、グルタミン酸誘導性 RGC-5 細胞死に対して、本ペプチドが保護効果を示すのかを検証した。評価方法として、形態学的観察、AnnexinV 染色、Pripidium Iodide 染色、TUNEL 試験を用いた。その結果、本ペプチドはグルタミン酸誘導性 RGC-5 細胞死を有意に阻害することが明らかとなった。以上の結果より、本ペプチドは RGC-5 細胞に対して毒性を示さないこと、グルタミン酸誘導性 RGC-5 細胞死を有意に阻害することが見出された。

(2) 網膜を用いた器官培養法の条件検討を行った。培地に網膜を入れ、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養を行った。培養後はパラホルムアルデヒド固定、エクセルシア処理、パラフィン包埋を行い、ミクロトームを用いて 3 μm の網膜切片を作製した。網膜構造の評価には HE 染色、アポトーシスの検出のため TUNEL 染色を行った。また網膜細胞の障害を評価するために免疫組織染色を行い、ロドプシン (桿体視細胞)、オプシン (錐体視細胞)、網膜神経節細胞、ミューラー細胞、活性型ミューラー細胞、双極細胞ならびにアストロサイトの変化を観察した。次に培地中に N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA; 100 μM, 200 μM) を添加し、網膜内層 (双極細胞ならびに網膜神経節細胞) にアポトーシスを誘導しようと試みた。培養 24 時間まではアポトーシスが検出されず網膜層も大きな乱れはなかったが、タンパク質の局在異常や細胞の減少、GFAP の発現が見受けられた。NMDA を添加したところ、培養 12 時間では網膜内層に特異的にアポトーシスを誘導することが確認された。さらに、本ペプチドは NMDA 誘導性細胞死に対して保護効果を示した。

(3) 野生型 C57BL/6 マウスに N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) を硝子体注射することにより網膜傷害を誘導した。特に網膜内層にあるアマクリン細胞や網膜神経節細胞において、細胞死が観察された。細胞死は TUNEL 試験および一本鎖 DNA 抗体による免疫染色により評価した。次に、NMDA 投与前 1 週間と投与後 3 週間に渡って 1 日 3 回、1 mM の濃度で点眼し、NMDA による網膜傷害に対する保護効果を評価した。対照群として、非点眼群、生理食塩水点眼群およびコントロールペプチド点眼群を用いた。NMDA 注射 3 日後、1 週間、2 週間、3 週間後に眼球を摘出し、TUNEL 試験にて網膜神経節細胞死を、フルオロゴールドラベリングした網膜のフラットマウントイメージングにて網膜神経節細胞の数を評価した。その結果、ペプチド点眼群の網膜では、NMDA 誘導性の網膜神経節細胞死が抑制されることが示された。また、フラットマウントイメージングにおいても網膜神経節細胞の数が、他群と比較して有意に多いことが明らかとなった。以上の結果から、NMDA 誘導性の網膜神経節細胞死に対して、本ペプチドは保護効果を有することが示唆された。同様に視神経軸索障害マウスの網膜神経節細胞に対しても保護効果が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeshi Iwamoto, Eri Ishiyama, Kinji Ishida, Tetsuro Yamashita, Hiroshi Tomita, Taku Ozaki	4. 巻 504
2. 論文標題 Presence of calpain-5 in mitochondria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 454-459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.08.144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Taku Ozaki, Tetsuro Yamashita, Hiroshi Tomita, Eriko Sugano, Sei-ichi Ishiguro	4. 巻 478
2. 論文標題 The protection of rat retinal ganglion cells from ischemia/reperfusion injury by the inhibitory peptide of mitochondrial μ -calpain	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1700-1705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2016.09.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤 翼, 山下 哲郎, 尾崎 拓
2. 発表標題 ブタ網膜を用いたex vivo緑内障モデルの作製
3. 学会等名 日本生化学会 東北支部 第84回例会・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Nagashima and Taku Ozaki
2. 発表標題 Mitochondrial Calpains and Apoptotic Cell Death.
3. 学会等名 Joint International Symposium on Science and Technology（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----