

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11455

研究課題名(和文) 網膜黄斑浮腫への硝子体中遊離ATPの関与とBBG投与による治療戦略

研究課題名(英文) Therapeutic strategy for free ATP in retinal macular edema

研究代表者

久富 智朗 (Hisatomi, Toshio)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：50404033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：黄斑浮腫は短期的には組織間液の貯留によると考えられるが、この過程で網膜神経細胞障害を生じて最終的に不可逆的な網膜変性を来し、大きな臨床的意義を持つと考えられる。マウス眼球に眼内ATPの眼内投与を行い、黄斑浮腫による黄斑変性の主要な原因と考えられる、網膜細胞死、網膜変性が観察された。マウス眼球にATPとBBGを投与したところ、網膜神経細胞死は抑制された。我々が手術補助剤として開発したBBGには内境界膜染色作用以外にも網膜浮腫に伴う神経細胞死を抑制した。培養細胞および動物モデルを用いて、細胞外ATPが黄斑の網膜細胞死、黄斑変性を引き起こし、治療標的となり得る可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黄斑浮腫にはATPを介した網膜神経細胞死が重要な役割を果たし、網膜変性から視力障害を起こすことが示された。我々が手術補助剤として開発したBrillinat Blue Gには内境界膜染色作用以外にも網膜浮腫に伴う神経細胞死を抑制しうることを証明された。BBGは米国FDAでも眼科手術時に内境界膜剥離に使用する剤として認可を受けた。このように培養細胞および動物モデルを用いて、細胞外ATPが黄斑の網膜細胞死、黄斑変性を引き起こし、今後治療標的となり得る可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Macular edema is caused by retinal fluid, and causes an retinal neuronal cell disorder, eventually causing irreversible retinal degeneration. Experiments were conducted to elucidate the mechanism of retinal cell degeneration after the macular edema. Immunohistochemistry confirmed the expression of the P2x7 receptor on the cultured cells. The adenosine three phosphate (ADENOSINE TRIPHOSPHATE; ATP) causes cell death. Serum and ATP were added to the culture to confirm cell death. ATP was injected into mouse eyes, and retinal cell death and retinal degeneration was observed. When ATP and BBG were simultaneously administered to the mouse eyes, it was found that retinal neuronal cell death could be suppressed compared to control. The BBG, which we developed as a surgical agent, could suppress neural cell death associated with retinal edema. These results showed that extracellular ATP can cause macula retinal cells, and cause macular degeneration, and become a potential treatment target.

研究分野：眼科学

キーワード：黄斑浮腫 糖尿病 透過性亢進 ATP VEGF 網膜 血管内皮 細胞死

1. 研究開始当初の背景

近年、神経細胞障害において細胞内から ATP が大量に遊離し、直接神経細胞死を引き起こしたり炎症細胞浸潤による 2 次的神経細胞死を惹起していることが報告された(Nature 2006)。この細胞外に遊離した ATP により、細胞膜に存在する ATP 選択的チャンネル型受容体 P2X7 が活性化し、チャンネルが開くことで、細胞外から細胞内への Ca イオンの流入がおきて神経細胞は死に至ることが解ってきた(Physiol Rev 2002)。黄斑浮腫では血管透過性の亢進に引き続き、血清中の高濃度の ATP に漏出が起こりうる。またストレスや細胞死に伴い細胞内からも ATP が放出され、2 次的細胞死も起こりうる。

黄斑浮腫は短期的には組織間液の貯留によると考えられるが、この過程で網膜神経細胞障害を生じて最終的に不可逆的な網膜変性を来し、大きな臨床的意義を持つと考えられる。黄斑浮腫に続いて網膜細胞変性萎縮が起きる機序を細胞外遊離 ATP を対象に解明する。我々が内境界膜染色用に開発し Chromo Vitrectomy の中心的な役割を担う BBG は、この受容体の選択的阻害剤という薬理作用を持つ。今回はこれら二つの分野を効果的に結びつけるトランスレーショナルリサーチを行い、黄斑浮腫の病態解明、治療法開拓を目指す。今回眼内 ATP の黄斑浮腫の病態への関与が明らかとなり、BBG の治療効果を示すことができれば、臨床応用の可能性が期待される。

一方我々は、これまで網膜神経細胞の細胞死および神経保護について研究を行ってきた。網膜の神経細胞は、通常状態では分裂・増殖せず、網膜細胞の脱落は不可逆的な減少であり、細胞死のメカニズムは大変重要な意義を持つ。我々は網膜疾患で神経細胞がアポトーシスを起こして脱落することを示し、このシグナル経路を解析した(Am J Pathol 2001, 2003, 2012)。しかしアポトーシスの細胞内シグナル伝達には不可逆のプロセスも多く、アポトーシスを初期段階で抑制する必要がある。ATP による選択的チャンネル型受容体 P2X7 の活性化を抑制できれば、アポトーシスの初期段階での抑制に大変有効である可能性がある。

黄斑浮腫は短期的には組織間液の貯留によると考えられるが、この過程で網膜神経細胞障害を生じて最終的に不可逆的な網膜変性を来し、大きな臨床的意義を持つと考えられる。黄斑浮腫に続いて網膜細胞変性萎縮が起きる機序を細胞外遊離 ATP を対象に解明する。我々が内境界膜染色用に開発し Chromo Vitrectomy の中心的な役割を担う BBG は、この受容体の選択的阻害剤という薬理作用を持つ。今回はこれら二つの分野を効果的に結びつけるトランスレーショナルリサーチを行い、黄斑浮腫の病態解明、治療法開拓を目指す。今回眼内 ATP の黄斑浮腫の病態への関与が明らかとなり、BBG の治療効果を示すことができれば、臨床応用の可能性が期待される。

2. 研究の目的

糖尿病網膜症等の網膜疾患では、しばしば黄斑部に嚢胞様の空胞からなる黄斑浮腫を生じる。黄斑浮腫では近傍の既存血管および新生血管の透過性亢進が起こり、血液から血漿成分を中心に漏出が起こり網膜に様々な沈着物が蓄積し、神経細胞の変性を生じ網膜組織の萎縮・変性に至る。黄斑浮腫には短期的な可逆的な変化と長期間の不可逆的な変化が観察されるが、その分子機序は不明である。抗 VEGF 薬の登場により短期的には浮腫の改善が得られるようになったが、依然長期間の変性萎縮は予防や改善は困難である。我々は細胞外のアデノシン 3 リン酸(ATP)や細胞表面の P2X7 受容体が網膜細胞死に重要であることを明らかにした。今回血管内から漏出した細胞外の ATP が受容体に結合することで細胞死を生じ空胞様変化を来して黄斑浮腫を生じると仮定し、動物モデルを用いてこれらの分子機序を明らかにし、将来の予防的治療の可能性を探る。今までは我々は基礎的実験から網膜細胞においても P2X7 受容体が発現し、ATP によって細胞死が誘発出来ることを見いだした(Am J Pathol 2011, PLoS ONE 2013)。また予備実験においてもヒト硝子体サンプル中に測定可能な濃度の遊離 ATP が存在し、疾患によって変化しうることを見いだしている。今回は実験系での ATP 濃度の変化が網膜に与える影響を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

今までの知見より、血糖糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症など管透過性が亢進する疾患では、血中に豊富に存在する ATP が血管外に漏出し濃度が増加すると予想される。また網膜細胞ではストレ

スや細胞死に伴い細胞内からも ATP が放出され、2 次的細胞死も起こりうる。遊離 ATP による選択的チャンネル型受容体 P2X7 の活性化を抑制できれば、神経細胞死の抑制、しいては黄斑浮腫の抑制に大変有効であり、将来有効な臨床上的治療薬の候補となり得る。

血管透過性亢進、黄斑浮腫の病態を明らかにするために、ATP の網膜神経細胞死への関与および BBG の治療効果を探るために、動物モデルを用いて *in vitro*、*in vivo* の実験系を確立する。

in vitro 実験系

我々はマウス網膜由来神経細胞初代培養を用いたアポトーシスの観察系を樹立した (PNAS 2007, JCI 2008)。この系では動物より採取した網膜から、視細胞、双極細胞、神経節細胞等の神経細胞およびミュラー細胞やアストロサイト等のグリア細胞を含む混合培養系を確立する。先に挙げた様々な眼疾患で血管透過性亢進により黄斑浮腫を生じるが、この過程で血清中の蛋白が血管から網膜細胞間に漏出する。血清中にはアルブミンなど構成蛋白とともに VEGF などの血管透過性因子や ATP などの生理活性物質が漏出される。この病態を再現するために、初代培養系に血清を添加し細胞死を評価するとともに BBG 添加により細胞死の抑制を評価する。また黄斑浮腫への関与が示唆されている VEGF による細胞死への影響をあわせて評価する。血清のみ、血清と ATP、血清と VEGF、血清と VEGF、ATP を加えることで、細胞死に対して相互作用、相乗作用が観察できる可能性があり、血管透過性亢進および黄斑浮腫への病態理解が深まると考えられる。ATP や細胞膜に存在する ATP 選択的チャンネル型受容体 P2X7 の関与が確認できれば、その選択的阻害剤 BBG の抑制効果についても更に検討を進める。

in vivo 実験系

黄斑浮腫の原因となる血管透過性を再現するため、マウス眼球に眼内 VEGF 投与および、その結果である血清成分、更には ATP の眼内投与を行い、黄斑浮腫の再現性を評価する。黄斑浮腫の病理学的特徴および細胞死を病理学的に評価し、臨床的に観察される所見と比較検討する。またこの過程で起こる網膜神経細胞死を評価し ATP およびその選択的受容体 P2X7 の関与を明らかにする。ATP と P2X7 受容体の関与が証明できれば、BBG を用いて抑制し、投与条件、至適濃度を探る。同様に P2X7 knock out マウスおよび control wild type マウスを用いて実験の選択性および再現性を確認する。

これらの実験系から得られた治験と臨床での観察から黄斑浮腫の病態理解を深め、血管透過性および黄斑浮腫への ATP の関与を確認し、BBG での治療可能性を探る。

4. 研究成果

黄斑浮腫は短期的には組織間液の貯留によると考えられるが、この過程で網膜神経細胞障害を生じて最終的に不可逆的な網膜変性を来し、大きな臨床的意義を持つと考えられる。

網膜初代培養細胞で網膜神経細胞を一定期間維持することができ、免疫染色では P2X7 レセプターの発現を確認した。網膜の神経細胞には細胞表面レセプターである P2X7 受容体が発現しており、アデノシン 3 リン酸 (Adenosine triphosphate; ATP) が結合することで細胞死を引き起こすことがわかった。

次に初代培養系の培養上清を回収し、ATP 濃度を測定した。培養上清中に血清および ATP を添加し細胞死を確認することができた。この細胞外に遊離した ATP の受容体への結合を阻害する目的で、P2X7 受容体の選択的阻害剤である硝子体染色剤 Brilliant blue G を添加すると、細胞死を抑制することができた。

更に黄斑浮腫の原因となる血管透過性を再現するため、マウス眼球に眼内 ATP の眼内投与を行い、黄斑浮腫による黄斑変性の主要な原因と考えられる網膜細胞死を評価した。網膜細胞死により網膜の浮腫を伴う、網膜細胞死、網膜変性が観察された。病理学的に評価し、臨床的に観察される所見と比較し臨床像をよく反映したモデルと考えられた。

また我々が内境界膜染色用に関与し ChromoVitreotomy の中心的な役割を担う BBG は、ATP の受容体である P2X7 受容体の選択的阻害剤という薬理作用を持つことがわかった。

マウス眼球に ATP と BBG を同時投与したところ、網膜神経細胞死はコントロールと比較し抑制されることがわかった。BBG には内境界膜染色作用以外にも網膜浮腫に伴う神経細胞死を抑制する作用が期待された。

このようにマウス眼球に眼内 ATP の眼内投与を行い、黄斑浮腫による黄斑変性の主要な原因と考えられる、網膜細胞死、網膜変性が観察された。マウス眼球に ATP と BBG を投与したところ、網膜神経細胞死は抑制された。我々が手術補助剤として開発した BBG には内境界膜染色作用以外にも網膜浮腫に伴う神経細胞死を抑制した。以上より培養細胞および動物モデルを用いて、細胞外 ATP が黄斑の網膜細胞死、黄斑変性を引き起こし、透過性亢進により ATP は不可逆的な網膜変性をおこし得ることがわかり、治療標的となり得る可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 久富 智朗, 森 賢一郎, 立花 崇, 納富 昭司, 石川 桂二郎, 武田 篤信, 大島 裕司, 金本 尚志, 江内田 寛, 吉田 茂生, 平形 明人, 西田 幸二, 大路 正人, 木村 和博, 久保田 敏昭, 緒方 奈保子, 松井 孝明, 吉富 文昭, 内尾 英一, 石橋 達朗, 園田 康平	4. 巻 125
2. 論文標題 眼疾患とバイオマーカー バイオマーカーの視覚化による疾患病態理解と治療法開発への挑戦	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本眼科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 266-284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久富智朗
2. 発表標題 バイオマーカーの視覚化による疾患病態理解と治療法開発への挑戦
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会(招待講演)
4. 発表年 2020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
研究分担者	園田 康平 (Sonoda Koh-Hei) (10294943)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	池田 康博 (Ikeda Yasuhiro) (20380389)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	吉田 茂生 (Yoshida Shigeo) (50363370)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関