

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006-2008

課題番号：18390463

研究課題名（和文） 網膜変性症の分子機構の完全解明

研究課題名（英文） Identification of molecular pathology of retinal degeneration

研究代表者

大黒 浩 (OHGURO HIROSHI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号:30203748

研究成果の概要：

網膜変性症の病態解明を目的として原因が異なる 6 種類の網膜変性動物モデルを用いて 1) 網膜電図 (ERG) による機能評価、2) 網膜形態評価、3) レチノイドの解析、4) ロドプシン再生能、5) ロドプシン脱リン酸化能および 6) cGMP 濃度変化について解析した。その結果、これらの網膜変性モデルに共通の視細胞機能異常として明暗順応を制御する機構（ロドプシンリン酸化脱リン酸化の障害）に異常があり、最終的に網膜が変性してしまうと ERG の障害や組織障害がみられることが判明した。

次に機能異常としての順応障害を是正し、網膜変性阻止効果が期待される薬物として 1) 視細胞における機能是正を目的としたカルシウムチャンネルブロッカーおよび 2) RPE における是正を目的としたレチノイドおよびアントシアニンを各種モデル動物に投与し、それらの薬物効果を検討した。その結果、カルシウムチャンネルブロッカーであるニルバジピンは今回試したいずれのモデルに対しても有効性を示したのに対し、レチノイドやアントシアニンは補助効果は期待されるもののさらなる検討が必要と考えられ、今後本症の有効な治療薬のとして臨床応用できる可能性が強く示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2007 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：網膜変性症、動物モデル、ロドプシン、視興奮、アポトーシス、レチノイド、カルシウム、カルシウムチャンネルブロッカー

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝性網膜変性症である網膜色素変性およびその類縁疾患は、病理学的には視細胞変性が主で根本的な治療法が確立していない難病で、臨床的に暗順応の低下、視野狭窄、網膜血管の狭細化および

網膜電位図 (ERG) で a および b 波の低下を特徴とする。本疾患は本邦における中途失明の上位の原因疾患で、未だ治療法の確立していない本症の病態を解明し、新しい治療法を開発することは社会的に失明予防対策の観点からも非常に重要である。

近年の研究によれば本症の原因として網膜色素上皮や網膜視細胞などの網膜神経細胞特異蛋白質をコードする遺伝子や網膜以外の細胞にも広く発現している種々の遺伝子の異常に起因していることが明らかとなっている。従って本症は単因子ではなく、多因子の原因により何らかの網膜機能異常を来し、最終的に不可逆性の網膜変性に至ることが予想されているものの詳しいことは不明である。従って本症の原因が多因子であるが故にその病態解明や有効な治療法開発が立ち後れている主要な理由である。しかしながら本症の臨床像を検討すると異なる遺伝子異常を持ちながら臨床像が酷似している例が多数あり、原因の数だけ異なる病態、病型が存在するのではなく、原因遺伝子が異なってもある程度限られた本症に共通の病態機序があることが強く示唆される。一方これとは逆に同一の遺伝子異常がありながら、臨床像が異なる例（桿体障害優位である定型網膜色素変性あるいは錐体障害優位である黄斑変性など）も多数知られていることから遺伝子異常に基づいて引き起こされる病態機序には複数があり、どの病態機序に発展するかを左右する何らかの因子があるに違いないと予想される。

従って本症における分子病態を完全に解明し、その知見に基づいて新しい治療法を開発するために、

- 1) 原因を超えて存在すると考えられる共通の分子病態機序を明らかにすること
- 2) 網膜神経細胞内でそれらの分子病態を修飾し、異なる病型へと導く未知の機序を明らかにすること
- 3) 1) および 2) で得られた知見に基づいて新しい治療法の可能性を考え最終的に臨床応用できるようにすること

の3項目について詳細な検討が必須である。

その遂行のためには各種原因が異なる複数のモデル動物を用いて網膜視細胞内で営まれている生理機能のいずれの機能に異常があるかについて、生化学的、組織学的および分子生物学的手法を駆使して系統立てて検証する必要があると考えられる。

我々の網膜変性研究グループは本研究課題遂行の前段階として現在までに、本疾患の代表モデル動物である RCS (Royal College Surgeons) ラットを用いた検討に着手し、以下の結果を得た。(RCS ラットを用いた理由は、RCS ラットの遺伝子異常 (MertK) がヒト網膜色素変性でも見られることから RCS ラットでの知見がヒト網膜色素変性患者でも当てはまると考えられるからである。)

- ① RCS ラットの網膜視細胞においては光受容体蛋白質ロドプシンのリン酸化を触媒するロドプシンキナーゼの発現異常があり視細胞機能異常としてロドプシンリン酸化を介する光情報伝達機構に異常を来している可能性を示唆した (Invest Ophthalmol Vis Sci 2002, 43:919-926.)。
- ② ロドプシンリン酸化部位を特異的に認識しうる

抗体を用いた免疫染色によりロドプシンのリン酸化の程度を検出するための *in vivo* assay を確立し、RCS ラットの視細胞におけるロドプシンのリン酸化の程度を検討したところ、正常ラットに比して著しくロドプシンリン酸化が亢進していることを明らかとした (FEBS letters 2003, 551:128-132)。

- ③ ロドプシンリン酸化の異常亢進は cGMP カスケードの活性化を抑制するために結果として、外節に存在する cGMP gated channel が開きっぱなしになるため、ここを通過する  $Ca^{2+}$  イオンの細胞内蓄積により  $Ca^{2+}$  依存的な細胞障害が引き起こされることが予想される。そこで  $Ca^{2+}$  チャンネルブロッカーにより内節に存在する電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルを抑制することで、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を正常化できないかという作業仮説に基づいて検討したところ、 $Ca^{2+}$  チャンネルブロッカーであるニルバジピンが RCS ラットの網膜変性の進行をくい止める効果があることを突き止めた (Invest Ophthalmol Vis Sci 2002, 43:919-926.)。これに引き続き、網膜色素変性と臨床的および病理学的に類似する網膜変性症に癌関連網膜症 (Cancer-associated retinopathy, CAR: 癌患者に網膜に対する自己免疫を獲得し、網膜色素変性様の進行性の網膜変性を来す疾患で、現在のと  $Ca^{2+}$  チャンネルブロッカーニルバジピンが両網膜変性をくい止めうることから、我々の探し求める網膜色素変性の原因を超えて存在する機能異常の一つとしてロドプシンのリン酸化に関連する機序である可能性が強く示唆された (平成17年度第109回日本眼科学会総会宿題報告で発表した)。

## 2. 研究の目的

今まで行ってきた研究成果をさらに発展させ、新しい治療法を開発するための前段階として **網膜色素変性の分子病態の完全解明** を目指すために最も重要と思われる以下の検討項目について検討することを目的とした

- 1) **ロドプシンリン酸化異常をもたらす分子機構の解明**
- 2) **ロドプシンリン酸化異常に引き続いて最終的に視細胞のアポトーシスに至る分子機構を明らかにすることにより網膜色素変性の分子病態を完全に解明する。**
- 3) さらに今のところいくつかのモデル動物で有効性が認められている  **$Ca^{2+}$  チャンネルブロッカーニルバジピン** や可能性が示唆される **レチノイド** および **アントシアニン** (平成17年度日本眼科学会総会宿題報告で発表した) の **薬理機序** をさらに解明することにより上述の分子病態が確かであることを確認する。

## 3. 研究の方法

- 1) **ロドプシンリン酸化異常をもたらす分子機構の解明**
  - a: ロドプシンリン酸化および脱リン酸化を

それぞれ担当するロドプシンキナーゼおよびホスファターゼの生

物活性を簡便に測定する方法の確立（ペプチドアレイや化学発光等の最新の手法を用いる）

b: 確立された手法を用いて各種モデル動物でいずれの酵素（ロドプシンキナーゼおよびホスファターゼ）

に異常があるのかをそしてそれぞれのモデルの変性過程でそれらの活性異常がどのように変化する

かについて検討する。

2) ロドプシン磷酸化異常に引き続いて最終的に視細胞のアポトーシスに至る分子機構を明らかにすることにより網膜色素変性の分子病態を完全に解明する。

a: 最新の手法である DNA マイクロアレイ、抗体アレイを用いてロドプシン磷酸化および脱磷酸化異常と同期的に化する遺伝子および蛋白質群を同定する。

b: 同定された標的蛋白質を SiRNA 法を用いて蛋白質発現を抑制することにより実際にそれらが目的とする分子病態に関連しているのかを検証する。その際、網膜芽細胞腫を用いて行う。

c: 上記の a, b でスクリーニング的に見出されたロドプシン磷酸化異常からアポトーシスに至る各因子について knockout mouse を作成して網膜形態等を詳細に検討することにより網膜色素変性におけるアポトーシスに至る分子機序の完全解明を目指す。

3) さらに今のところいくつかのモデル動物で有効性が認められている  $Ca^{2+}$ チャンネルブロッカーニルバジピンや可能性が示唆されるレチノイドおよびアントシアニン（平成17年度日本眼科学会総会宿題報告で発表した）の薬理機序をさらに解明することにより上述の分子病態が確かであるかを確認する。

a: 最新の手法である DNA マイクロアレイ、抗体アレイを用いてニルバジピン、アントシアニン、レチノイドの網膜変性阻止効果と同期的に変化する遺伝子および蛋白質群を同定し、1-2) で示されたアポトーシスに至る経路とどのように関わるかについて検討する。

b: a) で見出された知見より新たに推測される網膜変性阻止を来しうる生体反応系を見出し、それに有効性が予測される薬剤についても各モデルを用いた網膜変性阻止効果の有無についてまたそれらの相乗効果について生化学的、分子生物学的、電気生理学および組織学的に総合的に検証していく。

4. 研究成果

網膜変性症の分子病態を明らかとする目的で、原因が異なる網膜変性動物モデルとして1) retinal pigment epithelium (RPE)に原因を持つ RCS rat、2) 光受容体ロドプシンに異常を持つ P23H, S334ter および光障害ラット、3) phosphodiesterase (PDE)に障害を持つ rd mouse さらに4) リカバリンを介した順応系に異常をもつ CAR モデルの六つのモデルを用いて検討した。検討項目としては1) 網膜電図 (ERG) による機能評価、2) 網膜形態評価、3) レチノイドの解析、4) ロドプシン再生能、5) ロドプシン脱磷酸化能および6) cGMP 濃度変化について解析した。その結果、上記の網膜変性モデルに共通の視細胞機能異常として明暗順応を制御する機構（ロドプシン磷酸化脱磷酸化の障害）に異常があり、最終的に網膜が変性してしまうと ERG の障害や組織障害がみられることが判明した。

次に機能異常としての順応障害を是正し、網膜変性阻止効果が期待される薬物として1) 視細胞における機能是正を目標としたカルシウムチャンネルブロッカーおよび2) RPE における是正を目標としたレチノイドおよびアントシアニンを各種モデル動物に投与し、それらの薬物効果を検討した。その結果、カルシウムチャンネルブロッカーであるニルバジピンは今回試したいずれのモデルに対しても有効性を示したのに対し、レチノイドやアントシアニンは補助効果は期待されるもののさらなる検討が必要と考えられた。

これらの基礎的検討に基づいて実際の網膜色素変性患者に対してニルバジピンの治療効果を判定するために1年半にわたる前向き試験を行った。ニルバジピン投与群は非投与群に比べ統計学的有意に視野進行の程度が軽い結果となり、今後本症の有効な治療薬の一つとして臨床応用できる可能性が強く示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 30 件）

1. 大黒 浩：網膜色素変性に対するあたらしい薬物治療の可能性. 日本眼科学会雑誌 2008; 112(1): 7-21. (査読あり)
2. Ohguro H, Ohguro I: Biological and pathological aspects of rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation in mammalian retinal photoreceptors. Current Topics in Biochemical Research 2008; 10: 23-31. (査読あり)
3. Hashimoto M, Ohguro H: Physiological and clinical aspect of the neuroretinal circuit (6) : Implications of Neuroimaging

- technique with regard to the physiological and pathological states of the neuroretinal circuit. Neuro-ophthalmol Jpn 2008 ; 25(1) : 105-110. (査読あり)
4. Maeda K, Obara Y, Hashimoto M, Ohguro H : Analysis of sFas IL-6 levels in thyroid-associated ophthalmopathy. : Pre- or poststeroid pulse treatment. Clinical Ophthalmology, 2008 ; 2(3) : 609-612. (査読あり)
  5. Nishikiori N, Osanai M, Chiba H, Kojima K, Inatomi S, Ohguro H, Sawada N : Experimental effect of retinoic acids on apoptosis during the development of diabetic retinopathy. Clinical Ophthalmology 2008 ; 2 : 1-3.
  6. Nishikiori N, Sawada N, Ohguro H : Prevention of Murine Experimental Corneal Trauma by Epigenetic Events Regulating Claudin 6 and Claudin 9. Jpn J Ophthalmol 2008;52:195-203. (査読あり)
  7. Ohba M, Kawata H, Ohguro H : An unusual case of progressive esotropia caused by high myopia. Binocul Vis Strabismus Q 2008 ; 23(1) : 31-35. (査読あり)
  8. Ohguro I, Ohguro H : A case of superior segmental optic hypoplasia accompanied by glaucomatous optic neuropathy. Clinical Ophthalmology 2008 ; 2(2) : 475-478. (査読あり)
  9. Hashimoto M, Obara Y, Yoshida K, Ohguro H : A case of early Creutzfeldt-Jakob disease presenting with acute bilateral visual loss. Jpn J Ophthalmol 2008;52(3) : 236-237. (査読あり)
  10. Nishikiori N, Ohguro H : An intractable case of pseudomonas aeruginosa infection after scleral buckling for rhegmatogenous retinal detachment. Clinical Ophthalmology 2008 ; 2 : 1-3. (査読あり)
  11. Ohguro H, et al. (他 5 名) Changes in intraocular indocyanine green (ICG) concentrations during macular hole surgery. Ophthalmologica 2007; 221: 402-405. (査読あり)
  12. Ohguro I, Ohguro H, Nakazawa M: Effects of anthocyanins in black currant on retinal blood flow circulation of patients with normal tension glaucoma. A pilot study. Hirosaki Med J 2007; 59: 23-32. (査読あり)
  13. Nishikiori N, Osanai M, Chiba H, Kojima T, Mitamura Y, Ohguro H, Sawada N: Grial cell-derived cytokines attenuate the breakdown of vascular integrity in diabetic retinopathy. Diabetes 2007; 56: 1333-1340. (査読あり)
  14. Nishikiori N, Osanai M, Chiba H, Kojima T, Ohguro H, Sawada N: Inhibitory effects of retinoic acid receptor alpha stimulants on murine cataractogenesis through suppression of deregulated calpains. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007; 48: 2224-2229. (査読あり)
  15. Terada N, Ohno N, Saitoh S, Fujii Y, Ohguro H, Ohno S: Raman microscopy of freeze-dried mouse eyeball-slice in conjunction with the "in vivo cryotechnique". Microsc Res Tech 2007; 70: 634-639. (査読あり)
  16. Saito W, Kase S, Ohguro H, Furudate N, Ohno S: Slowly progressive cancer-associated retinopathy. Arch Ophthalmol 2007; 125: 1431-1433. (査読あり)
  17. Hayashi M, Hatsukawa Y, Yasui M, Yanagihara I, Ohguro H, Fujikada T: Cancer-associated retinopathy in a child with Langerhans cell histiocytosis. Jpn J Ophthalmol 2007; 51: 393-396. (査読あり)
  18. Ohguro H, Kawata H, Hashimoto M: Physiological and clinical aspects of the neuroretinal circuit (1): light perception of the retinal photoreceptor cells. Neuroophthalmol. Jpn 2006; 23: 519-525. (査読あり)
  19. Ohguro H, Kawata H, Hashimoto M: Physiological and clinical aspects of the neuroretinal circuit (2): Diseases of retinal photoreceptor cells. Neuro-ophthalmol Jpn 2007; 24: 87-96. (査読あり)
  20. Ohguro H, Kawata H, Hashimoto M: Physiological and clinical aspects of the neuroretinal circuit (3): Signal transduction of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> retinal neurons. Neuro-ophthalmol Jpn 2007; 24: 239-243. (査読あり)

21. Ohguro H, Kawata H, Matsuo S, Hashimoto M: Physiological and clinical aspects of the neuroretinal circuit (4): Disease of 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> retinal neurons. *Neuro-ophthalmol Jpn* 2007; 24: 353-360. (査読あり)
  22. Nishikiori N, Kawata H, Hashimoto M, Ohguro H: Physiological and clinical aspect of the neuroretinal circuit (5): Homeostatic regulation of the blood-retinal barrier by cytokines and its implication for a new diabetic retinopathy therapy. *Neuro-ophthalmol Jpn* 2007; 24: 481-486. (査読あり)
  23. Ito T, Ohguro H, Ohguro I, Mamiya K, Nakazawa M. Effects of anti-glaucoma drops on matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor metalloproteinase (TIMP) balance in conjunctival and subconjunctival tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 823-830. (査読あり)
  24. Matsumoto H, Nakamura Y, Iida H, Ito K, Ohguro H. Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues. *Exp Eye Res* 2006; 83: 348-356. (査読あり)
  25. Terada N Ohno N, Ohguro H, Nakazawa M. Immunohistochemical detection of phosphorylated rhodopsin in light-exposed retina of living mouse in vivo cryotechnique. *J Histochem Cytochem* 2006; 47: 479-486. (査読あり)
  26. Ohguro H, Shimokawa R, Ohguro I, Ishikawa F, Yamazaki H, Nakazawa M. Clinical significance of the ankle-brachial index (ABI) and pulse wave velocity (PWV) in patients with retinal vascular occlusion. *Hirosaki Med J* 57:65-70, 2006 (査読あり)
  27. Ishikawa F, Ohguro H, Ohguro I, Yamazaki H, Mamiya K, Metoki T, Ito T, Yokoi Y, Nakazawa M. Prolonged rhodopsin phosphorylation in light-induced retinal degeneration in rat models. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 5204-5211. (査読あり)
  28. Harada C, Okumura C, Namekata K, Nakamura K, Mitamura Y, Ohguro H, Harada T. Role of monocyte chemotactic protein-1 and nuclear factor kappa B in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006; 74: 249-256. (査読あり)
  29. Ishikawa F, Ohguro H, Sato S, Yamazaki H, Nakazawa M: A case of idiopathic retinal vasculitis, aneurysm and neuroretinitis (IRVAN) effectively treated by steroid pulse therapy. *Jpn J Ophthalmol* 2006; 50: 181-185. (査読あり)
  30. Ohguro I, Ohguro H, Ohta T, Nakazawa M: A case of normal tension glaucoma associated with Burger disease. *Tohoku J Exp Med* 2006; 209: 49-52. (査読あり)
- 〔学会発表〕 (計 9 件)
1. Ohguro H, Ohguro I: Impairment of rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation cause retinal degeneration in P23H and S334ter rat models. World Ophthalmology Congress 2008, June 28-July 2, 2008, Hong Kong Convention & Exhibition Center, Hong Kong, China
  2. Ohguro I, Ohguro H: Black currant anthocyanins effectively cause retinal blood flow of patients with normal tension glaucoma. World Ophthalmology Congress 2008, June 28-July 2, 2008, Hong Kong Convention & Exhibition Center, Hong Kong, China
  3. Tanaka S, Tsuruta M, Watanabe M, Katai M, Ohguro I, Ohguro H: Surgical outcome of trabeculectomy after filtering surgery. World Ophthalmology Congress 2008, June 28-July 2, 2008, Hong Kong Convention & Exhibition Center, Hong Kong, China
  4. Ito T, Nakazawa M, Metoki T, Yamazaki H, Ishikawa F, Takeuchi K, Yokoi Y, Ohguro H, Mashima Y: Topical administration of unoprostone provides retinal protection against retinal degeneration of rhodopsin P23h rats by inhibition apoptosis. ARVO 2008 annual meeting, April 27-May 1, 2008, Fort Lauderdale, Florida, USA
  5. Ohguro H, Ohguro I, Nishikiori N, Matsuo S, Matsuo K, Kawata H: Effects

of anti-glaucoma drops on matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor metalloproteinase (TIMP) balance in conjunctival and subconjunctival tissue. Asia-ARVO meeting on research in vision and ophthalmology, March 2-5, 2007, Suntec Singapore International Convention & Exhibition Center, Singapore.

6. Ohguro I, Ohguro H, Nishikiori N, Matsuo S, Matsuo K, Kawata H: Study of contribution of low level of plasma endothelin-1 concentration to pathogenesis of glaucomatous optic neuropathy. Asia-ARVO meeting on research in vision and ophthalmology. March 2-5, 2007, Suntec Singapore International Convention & Exhibition Center, Singapore.
7. Matsuo S, Ohguro H, Ohguro I, Nishikiori N, Matsuo K, Kawata H: Aberrantly expressed recoverin enhance sensitivities to anticancer drugs in a cancer cell line. Asia-ARVO meeting on research in vision and ophthalmology. March 2-5, 2007, Suntec Singapore International Convention & Exhibition Center, Singapore.
8. Nishikiori N, Osanai M, Kawata H, Chiba H, Kojima T, Sawada N, Ohguro H: Glial cell line-derived neurotrophic factor regulates the vascular permeability of the blood-retinal barrier. Asia-ARVO meeting on research in vision and ophthalmology. March 2-5, 2007, Suntec Singapore International Convention & Exhibition Center, Singapore.
9. Ohguro H: Effects of anti-glaucoma drops on matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor metalloproteinase (TIMP) balance in conjunctival and subconjunctival tissue. Glaucoma summer camp, July 20-21, 2006, Karuizawa, Japan.

[図書] (計 2 件)

1. 大黒 浩: 癌関連網膜症. 眼科プラクティス 12: 眼底アトラス. p223, 分光堂, 2006

2. 目時友美, 大黒 浩: 網膜, 視神経における免疫異常とその治療にはなにがあるか? 視覚と眼球運動のすべて. p82-87, メジカルビュー社, 2006

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大黒 浩 (OHGURO HIROSHI)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 30203748

##### (2) 研究分担者

大黒幾代 (OHGURO IKUYO)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号: 90305235

石川 太 (ISHIKAWA FUTOSHI)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 00419962

錦織奈美 (NISHIKIORI NAMI)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号: 30444920

川田浩克 (KAWATA HIROKATSU)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 60438009

##### (3) 連携研究者