

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09434

研究課題名(和文) HDAC1/2特異的阻害剤K560の神経保護作用に基づく新規緑内障治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a HDAC1/2 inhibitor K560-mediated treatment for glaucoma

研究代表者

依山 寛司 (Tawarayama, Hiroshi)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20402414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障とは、網膜神経節細胞死を呈する眼科疾患であり、その一因として酸化ストレスが挙げられる。本研究では、酸化ストレス誘導性網膜神経節細胞死の動物モデルを用い、遺伝子発現制御に関わるヒストン脱アセチル化酵素の新規アイソタイプ阻害剤であるK560の細胞保護効果を検証した。単離網膜細胞を用いた解析から、K560が酸化ストレス誘導性細胞死を抑制することを見出した。K560投与眼の網膜では、ヒストン・アセチレーションが亢進していた。また、K560投与眼では、酸化ストレス誘導性網膜神経節細胞死が抑制された。以上の知見から、K560は緑内障治療薬として有用であり、今後、臨床レベルでの開発を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を迎えた我が国では、緑内障を含む加齢性眼疾患の罹患者数が増加しており、その対策が急務となっている。本研究の結果、新規のHDAC 1/2選択的阻害剤であるK560を眼内投与することで、酸化ストレス起因性の網膜神経節細胞死を抑制可能であることが示された。緑内障による視覚消失は、老後QOLを著しく低下させる恐れがあり、今後、臨床開発を進めることで、K560が緑内障治療薬の新たな選択肢となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Retinal ganglion cell (RGC) death is the symptom of glaucoma. It is thought that oxidative stress partially contributes the cell death. In this study, we investigated the effect of K560, an isozyme selective inhibitor of histone deacetylase (HDAC) 1/2, on oxidative stress-induced RGC death, and found that (1) K560 attenuated oxidative stress-induced death of dissociated retinal cells in mice, (2) K560 enhanced histone acetylation of retinal lysates prepared from mice administered with K560 intravitreally, (3) K560 inhibited oxidative stress-induced RGC death in mice. These findings suggested that K560 administration is a promising treatment for glaucoma.

研究分野：神経科学

キーワード：HDAC1/2阻害剤 網膜神経細胞死 酸化ストレス 緑内障

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた我が国では、緑内障を含む加齢性眼科疾患の罹患者数は増加の一途を辿っており、その対策が急務となっている。緑内障とは、網膜神経節細胞死を病態とする加齢性眼科疾患であり、適切な治療を施さず、病態が進行した場合には、失明のリスクが生じる。緑内障における網膜神経節細胞の細胞死の一因としては、加齢による抗酸化力の低下、それに伴う酸化ストレスの増加が挙げられる。それ故、酸化ストレス誘導性神経細胞死を抑制する薬剤候補の探索が重要である。

アセチル化、メチル化といったヒストン修飾は、クロマチン構造を変化させることで、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関係する。ヒストン修飾に関与する分子として、ヒストンの脱アセチル化を担うヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の存在が知られている。HDAC は複数の分子からなるファミリーを構成しており、中でもバルプロ酸はクラス I/II に属する分子群を選択的に阻害する。動物モデルを用いた先行研究の結果から、バルプロ酸が酸化ストレス誘導性神経細胞死を抑制することが報告されているが (Kanai et al., *Pharmacogenomics*, 2004; Kimura et al., *Neurosci Lett*, 2015; Nagańska et al., *Folia Neuropathol*, 2015) HDAC によるヒストン修飾が生命活動において重要な役割になっていることから推測されるように、バルプロ酸によるサイド・エフェクトの存在のため、神経保護用途での臨床応用には至っていない。そのため、より選択性の高い HDAC 阻害剤の探索と効果の実証が求められている。

K560 は我々の提携研究者である上里新一教授 (大阪薬科大学) が開発した新規 HDAC 阻害剤であり、クラス I ファミリーの HDAC1/2 選択的な活性阻害効果を示す (Hirata et al., *Bioorganic Med Chem Lett*, 2012; Uesato et al., *Curr Pharm Des*, 2017)。また、マウスを用いた虚血再灌流モデルにおいて、脳神経細胞の細胞死を抑制することが報告されている (Hirata et al., *Sci Rep*, 2018)。それ故、バルプロ酸に比べ、サイド・エフェクトを最小限に抑制した上、酸化ストレス誘導性の網膜神経節細胞死を抑制する効果が期待される。

2. 研究の目的

NMDA 傷害モデルマウスにおいて、HDAC1/2 選択的阻害剤である K560 が、酸化ストレス誘導性網膜神経節細胞死を抑制するかどうか検討する。

3. 研究の方法

本研究では、日本エスエルシー (Shizuoka, Japan) から購入した 8-10 週齢の野生型雄マウス (C57BL/6) を用いた。網膜単離細胞の調製は先行研究に従って実施した (Maekawa et al., *Sci Rep*, 2017)。つまり、眼球から網膜を採取し、MACS Tissue Dissociation Kits

(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて 1 細胞レベルにまで単離した。単離細胞は B-27 supplements plus or minus A0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を添加した Neurobasal-A (Thermo Fisher Scientific) 培地中で培養した。K560 は先行研究に従って合成し (Hirata et al., Bioorganic Med Chem Lett, 2012) ポリビニルピロリドン K-30 を用いて分散化処理を施した (K560 製剤)。細胞生存解析は、AlamarBlue cell viability reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。ウェスタン・ブロット及び組織免疫染色は常法に従って行った。酸化ストレス誘導性網膜神経節細胞死を誘発するため、眼内に N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) (2nmol; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を投与した。また、NMDA 投与前日及び当日に K560 製剤 (50nmol) をあらかじめ眼内に注入した。NMDA 投与 7 日後に組織固定し、網膜神経節細胞のマーカーである RNA-binding protein with multiple splicing (RBPMS) 抗体で免疫染色したのち、蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) にて写真撮影を行った。統計解析には JMP Pro 15 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いた。

4 . 研究成果

酸化ストレス誘導性網膜細胞死に対する K560 の保護効果を検証するため、抗酸化剤添加あるいは無添加の培地中で単離したマウス網膜細胞を培養した。さらに K560 を培地中に添加したところ、K560 は濃度依存的に酸化ストレス誘導性細胞死を抑制した。次に網膜組織における K560 の HDAC 阻害効果を調べた。2 日間連続でマウス眼内に K560 を注入したのち、網膜ライセートにおけるヒストン H3 及び H4 のアセチレーションの程度をウェスタン・ブロッティングにより解析した。その結果、投与量依存的に網膜ライセートにおけるヒストンのアセチレーションが亢進された。さらに K560 注入眼に NMDA を投与したところ、コントロール眼に比べ、網膜神経節細胞死が有意に抑制された。以上の結果から、HDAC1/2 選択的阻害剤 K560 による、酸化ストレス誘導性網膜神経節細胞死に対する保護効果が示された。緑内障治療薬の新たなオプションとして、今後、K560 の臨床開発が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tawarayama Hiroshi, Suzuki Noriyuki, Inoue-Yanagimachi Maki, Himori Noriko, Tsuda Satoru, Sato Kota, Ida Tomoaki, Akaike Takaaki, Kunikata Hiroshi, Nakazawa Toru	4. 巻 20
2. 論文標題 Glutathione Trisulfide Prevents Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Gene Expression in Retinal Pigment Epithelial Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ocular Immunology and Inflammation	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09273948.2020.1833224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tawarayama Hiroshi, Feng Qiwei, Murayama Namie, Suzuki Noriyuki, Nakazawa Toru	4. 巻 60
2. 論文標題 Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2b Mediates Excitotoxicity-Induced Death of Retinal Ganglion Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 4479~4479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.19-27396	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 -

1. 著者名 Tawarayama Hiroshi, Yamada Hirohisa, Amin Ruhul, Morita-Fujimura Yuiko, Cooper Helen M, Shinmyo Yohei, Tanaka Hideaki, Ikawa Shuntaro	4. 巻 431
2. 論文標題 Draxin-mediated Regulation of Granule Cell Progenitor Differentiation in the Postnatal Hippocampal Dentate Gyrus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 184~192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2020.02.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Kota, Shiga Yukihiko, Nakagawa Yurika, Fujita Kosuke, Nishiguchi Koji M., Tawarayama Hiroshi, Murayama Namie, Maekawa Shigeto, Yabana Takeshi, Omodaka Kazuko, Katayama Shota, Feng Qiwei, Tsuda Satoru, Nakazawa Toru	4. 巻 59
2. 論文標題 Ece11 Knockdown With an AAV2-Mediated CRISPR/Cas9 System Promotes Optic Nerve Damage-Induced RGC Death in the Mouse Retina	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 3943~3943
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.18-23784	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tawarayama Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Novel function of the chemorepellent draxin as a regulator for hippocampal neurogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 799 ~ 799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.232465	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 -

1. 著者名 Tawarayama Hiroshi, Yamada Hirohisa, Shinmyo Yohei, Tanaka Hideaki, Ikawa Shuntaro	4. 巻 500
2. 論文標題 The chemorepellent draxin is involved in hippocampal mossy fiber projection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 217 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	中澤 徹 (Nakazawa Toru) (30361075)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	

	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
連携研究者	上里 新一 (Uesato Shinnichi) (50111969)	大阪薬科大学・薬学部・研究員 (34413)	

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
連携研究者	平田 佳之 (Hirata Yoshiyuki) (00745854)	大阪薬科大学・薬学部・助教 (34413)	

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