

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09457

研究課題名(和文) 萎縮型加齢黄斑変性の新規治療法の開発に向けた網膜におけるAMPKの役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of AMPK in the retina for the development of a novel treatment for atrophic age-related macular degeneration

研究代表者

平沢 学 (Hirasawa, Manabu)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・訪問講師

研究者番号：80365345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性(AMD)は失明原因の上位を占め、現代の高齢化社会では患者は増加している。中でも、萎縮型AMDの発症には光暴露が発症リスク因子として着目されるが世界的に治療法がない。網膜は光を受容し視覚を形成するため、エネルギー代謝が非常に盛んであり、代謝異常が萎縮型AMDの病態の一因である可能性がある。そこで、エネルギー代謝の調節機構であるAMPKに着目し萎縮型AMDの発症メカニズムの一端を明らかにすることで、将来的に現在治療法のない萎縮型AMDの発症や進行に対する新規予防治療の開発につながった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

萎縮型加齢黄斑変性には、世界的に治療法が無く、そのメカニズムにも不明な点が多い。そこで本研究には、医学的な病態解明の一端を果たした点で学術的意義があり、さらに世界初の治療法開発の可能性を示した点で社会的意義があった。

研究成果の概要(英文)：Dry type of age-related macular degeneration is an untreatable blinding disease. There is no approved treatment worldwide. In the current study, we focused on energy metabolism in the retina and showed a proof of concept that sufficient energy supply may rescue the retina from degeneration.

研究分野：医学

キーワード：網膜 加齢黄斑変性 老化 代謝

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(age-related macular degeneration; AMD)は、先進国における主要な失明原因の1つであり(米国では第1位、日本では第4位)加齢とともに増加することから、現代の高齢化社会においては、社会的な問題である。眼底(網膜)の中心である黄斑部に新生血管を形成する滲出型AMDに対しては、治療薬として抗血管内皮増殖因子製剤(anti-vascular endothelial growth factor drugs; anti-VEGF drugs)が開発された。しかし、黄斑部に原因不明の進行性網膜変性をきたす萎縮型AMD(図1)に対しては、現時点では治療法がない。そこで、最近では発症・進行の予防への関心が高まっている。

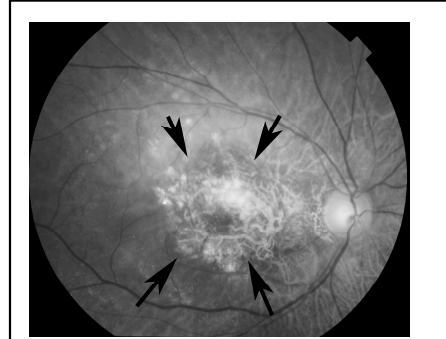


図1 萎縮型AMDの眼底写真
眼底中心である黄斑部に生じた萎縮(矢印)により重篤な視力障害をきたす。

萎縮型AMDの発症危険因子の一つに光暴露がある(Age-Related Eye Disease Study Research Group, Ophthalmology, 2000)。マウスでは過剰の光暴露により、過剰の活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)が発生して酸化ストレスが亢進し、光受容体である網膜視細胞の死を引き起こす(Narimatsu, Ozawa et al. Free Radic Biol Med 2014, Osada Ozawa et al. PLoS One 2017)(図2)が、過剰なROS発生のメカニズムは、知られていない。

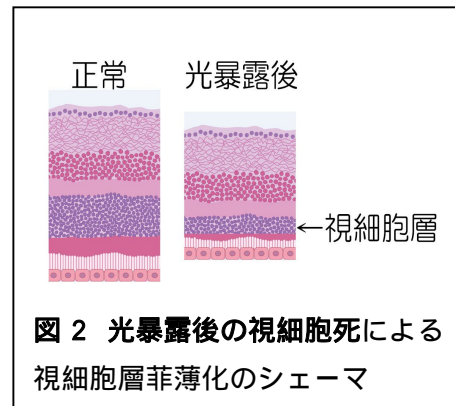


図2 光暴露後の視細胞死による視細胞層菲薄化のシエーマ

申請者の研究室では、これまでに抗酸化サプリメントが網膜内ROSの蓄積を抑制することを報告した(Narimatsu, Ozawa et al. Free Radic Biol Med 2014, Sasaki, Ozawa et al. J Nutr Biochem 2012)。実際にヒトでもAMD発症・進行予防のために、抗酸化サプリメント摂取が推奨される(Jegar et al. New Eng J Med, 2008)が、進行予防効果が得られない症例もいたことが、大規模臨床試験により示された(Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group. JAMA 2013)。抗酸化サプリメントの取り込み不良の体質がありうるとされ、他の介入方法の必要性は高い。

一方、全身臓器・組織の中でも網膜はエネルギー代謝が盛んであることが知られる(Chertov et al. J Biol Chem 2011)。ATP産生には酸素が重要であり、ヒト網膜では10秒間の阻血でも視機能が失われることが知られる。また、ROSの発生源となる。エネルギー代謝調節の鍵分子には、5' AMP-activated protein kinase (AMPK)(図3)があり、その活性型が網膜炎症を抑制することを申請者らはすでに報告済み(Kamoshita, Ozawa et al. PLoS One 2014)

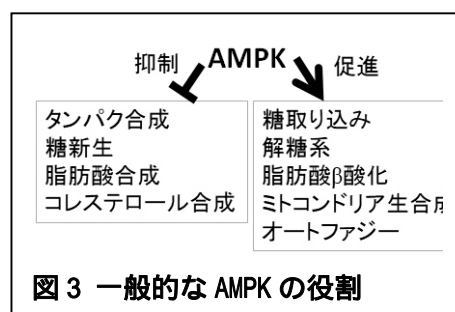


図3 一般的なAMPKの役割

で、網膜での AMPK の重要性は明らかであるが、光暴露との関連は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、光暴露により網膜内の酸素消費、エネルギー代謝、ROS 発生と網膜視細胞死の関連を、AMPK に着目して解明する。これを将来の萎縮型 AMD の発症メカニズムの解明および新規予防治療法の開発の礎とする。

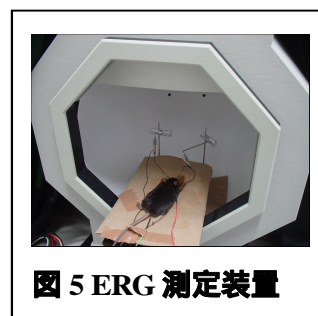
光暴露による過剰な ROS 産生と視細胞死についての報告は多くあるが、そのメカニズムには未知の点が多い。網膜では光を受容するために盛んなエネルギー代謝を必要とすることは知られるが、エネルギー代謝に着目した網膜治療法はこれまでに無く、これを明らかにする。本研究により AMPK による代謝調節が網膜細胞死を抑制しうるかを解析して、現行の抗酸化サプリメント以外の、新規 AMD 予防治療法の開発につなげる。

3. 研究の方法

本研究では、光暴露マウスモデルを用い、AMPK 活性化剤である 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR)により介入して、網膜変性を抑制する分子メカニズムをエネルギー代謝の変化に着目して解析した。光暴露が網膜内のどの呼吸代謝経路に影響するか、それを AMPK はいかに是正するかを解析し、AMPK による代謝調節が網膜細胞死を抑制しうるかを解析した。

【方法 1】 光暴露モデルマウスを作製し、網膜変性を抑制する AICAR 投与の条件を検討する

光暴露モデルマウスの作製とその基本的評価系については、申請者らの研究室で既に確立され論文発表も行った (Narimatsu, Ozawa et al. Free Radical Biol Med, 2014)方法を用いた。すなわち、アルビノである BALB/c マウスを 12 時間の暗順応直後に、研究室に確保されている専用光照射ケージ (図 4)に入れ、3000 ルクス光源に 1 時間暴露し、通常状態に戻して飼育した。光暴露後 4 日目に、研究室に常備される器械を用いて網膜電図 (Electroretinogram; ERG、図 5)により視機能を測定した。AICAR は PBS に溶解し、腹腔内投与とし、投与量は、申請者らが既に報告した、網膜炎モデルにおける神経保護効果を得られる量 (Kamoshita, Ozawa et al. PLoS One 2014)を中心にふって、ERG に示される視機能が、PBS のみを腹腔内投与して光暴露したマウスと比べて良好である条件を探した。



【方法 2】 光暴露モデルマウスにおける AICAR 投与の効果を組織学的に解析する

マウスを 3 群に分け、方法 1 で決めた量の AICAR、もしくは溶媒である PBS を投与し光暴露をした動物、および PBS を投与し光暴露なしの動物を作製し、網膜切片を解析した。本モデルでは、光暴露後 2 日目には、視細胞のアポトーシスが亢進し、4 日目には網膜視細胞層の菲薄化 (図 2) 及び視細胞外節の短縮が明らかであった (Osada Ozawa et al. PLoS One 2017)ことから、2 日目網膜切片で TUNEL assay を 4 日目の網膜切片でヘマトキシリンエオジン染色・ロドプシン免疫染色を行い解析した。

【方法 3】 光暴露モデルマウスにおける AICAR 投与時の ROS を測定する

網膜における ROS 測定については、申請者の研究室で確立した、ホモジェナイズした網膜に 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)を反応させてその蛍光をプレートリーダーで測定する方法(Osada Ozawa et al. PLoS One 2017)を用いた。これらにより光暴露後の網膜内 ROS レベルを解析した。

【方法 4】 光暴露モデルマウスにおける AICAR 投与時の酸素消費度を解析する

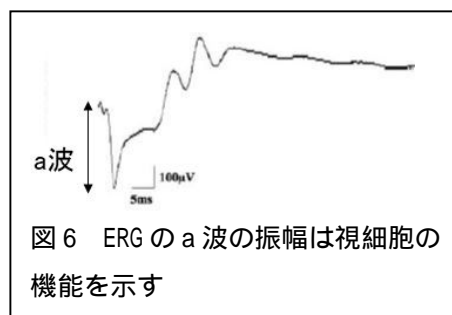
酸素消費度は慶應義塾大学医学部の共通機器管理室にあるプライムテック社の細胞外フラックスアナライザーを用いて行った。生体から採取した網膜組織サンプルを摘出・測定する条件は報告されており(Kooragayala, Swaroop et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2015)、申請者の研究室では研究分担者の小沢洋子講師が既に自ら実験系を立ち上げていた。方法 2 で作製した 3 群のマウスから経時的に網膜サンプルを採取し、測定した。

【方法 5】 光暴露モデルマウスにおける AICAR 投与時の細胞内呼吸関連酵素および ATP を解析する

細胞内呼吸には解糖系、TCA 回路、電子伝達系があり、いずれの経路が光暴露の影響を受けているかを比較するために、各経路に関連する酵素の発現をリアルタイム PCR、ウエスタンブロットにより測定するとともに、酵素活性キット・ATP 測定キットを用いた解析も行った。

4. 研究成果

【結果 1】 AICAR の投与プロトコールは、光暴露マウスの ERG 低下を抑制した結果から、光暴露の直前とその 12 時間前の 2 回投与で、一回投与分は 125 もしくは 250 mg/kg body weight (BW)と決められた。すなわち、この投与プロトコールにより、光暴露後の ERG の a 波の振幅、すなわち視細胞の機能(図 6)の低下が抑制された。そこで、以後の研究はすべてこの投与プロトコールを用いて行われた。



【結果 2】 光暴露 2 日目の網膜における TUNEL 陽性細胞の比較を行ったところ、光暴露後には増加していたが、AICAR 投与群では増加が有意に抑制される結果が得られた。また、4 日目の網膜におけるヘマトキシリンエオジン染色・ロドプシン免疫染色において、生存している視細胞層の厚みが AICAR 投与群では有意に厚いことが示された。これにより、AICAR の光暴露後の視細胞保護効果が組織学的に明らかになった。

【結果 3】 光暴露後の各時点における ROS は上述の方法で測定された。しかし、予測に反して、AICAR 投与による明らかな抑制は見られなかった。後述する結果のとおり、AICAR 投与によりエネルギー産生は増加しており、その分 ROS の発生は投与群でも増加していた可能性があるが、それは有意な増加ではなく、結果的に視細胞障害の原因にはならなかったと結論された。

【結果 4】 光暴露後の酸素消費量は、一時的に上がるが、その後低下した。しかし AICAR 投与によりその後の低下が抑制された。

【結果 5】 結果 4 に合致して、網膜内では電子伝達系関連分子の発現が、光暴露直後から低下し、AICAR 投与はこれを維持する結果を得た。さらに、網膜内 ATP レベルもこの変化に合致しており、光暴露群では低下したが、AICAR 投与群では維持する結果を得た。

これらの結果により、AICAR による網膜内エネルギー産生の継続的維持が、網膜光暴露後の網膜視細胞死・変性を抑制し、視機能低下の抑制につながることを示した。

今後はこの結果をさらに発展させれば、光暴露が進行の危険因子の一つである萎縮型 AMD の治療法として応用できる可能性があった。このように網膜に病態ストレスがかかった際の網膜細胞の生存や機能維持のためにエネルギー産生に着目した治療が可能となる可能性が示され、今後の世界的研究の方向性に影響する報告となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	小澤 洋子 (Ozawa Yoko) (90265885)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任准教授 (32612)	

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