

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：33304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08965

研究課題名(和文) 網膜オルガノイドを用いた急性網膜壊死の発症機序解明

研究課題名(英文) Analysis of pathogenesis of acute retinal necrosis using retinal organoids

研究代表者

武本 眞清 (Takemoto, Masaya)

北陸大学・薬学部・准教授

研究者番号：60379237

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)：急性網膜壊死(acute retinal necrosis; ARN)の発症機序と治療法の検討を、網膜オルガノイド(RO)や網膜色素上皮細胞(RPE)を用いて行った。水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の感染実験では、ROおよびRPE基底膜からの感染は認められず、RPE頂端膜からの感染のみ認められたことから、網膜への感染経路は脈絡叢以外からである可能性が示唆された。また、ARPE-19由来RPEにおいて、VZVおよび単純ヘルペスウイルス1型に対してアシクロビルよりも高い抗ウイルス作用を示したアメナメビルの方が、治療薬としてより効果的である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ARNの発症頻度は高くはないが、2007年にはぶどう膜炎全体の約1%であったのが2016年には1.7%と上昇傾向を示しており、今後も高齢化の進行に伴い上昇が続くことが危惧される。それに備えて本研究では、発症機序と治療法の検討を行ったが、発症機序の解明には至らなかった。しかし治療薬の選択肢としてアメナメビルの可能性を示せたことで、今後の治療成績の向上に本研究結果が寄与できるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis and treatment of acute retinal necrosis (ARN) were investigated using retinal organoids (RO) and retinal pigment epithelial cells (RPE). Only RPE from apical layer was infected with varicella-zoster virus (VZV), but RPE from basal layer and RO were not, suggesting that the route of infection to the retina may be from a source other than the choroid plexus. In ARPE-19-derived RPE, amenamevir showed higher antiviral activity against both VZV and herpes simplex virus type 1 than acyclovir, suggesting that amenamevir may be more effective as a therapeutic agent.

研究分野：ウイルス学

キーワード：急性網膜壊死 網膜オルガノイド iPS細胞 網膜色素上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

急性網膜壊死 (acute retinal necrosis; ARN) は、網膜・脈絡膜・視神経乳頭における広範な炎症と壊死を主徴とするヘルペスウイルス感染症である。原因ウイルスである水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1)・2 型 (HSV-2)、Epstein-Barr ウイルス (EBV)、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は、いずれも多くのヒトにすでに潜伏感染しており、これらが再活性化し眼内局所に感染することにより発症する。発症頻度はぶどう膜炎全体の約 1% と高くはないが、いざ発症すれば過半数の患者で網膜剥離を合併し、最終的な矯正視力が 0.1 未満となる極めて視力予後不良の疾患である。30~80% の患者は、時期をずらして両眼性に発症する。

ウイルスは潜伏感染部位である神経節で再活性化した後、遠心性に神経をたどって伝播し、VZV は神経に沿って、HSV は神経終末で病巣を作るが、ARN における網膜への感染経路は不明である。両ウイルスの疫学的な感染率の高さと ARN の発症頻度の低さにはギャップがあり、何らかの障壁を突破あるいは回避したウイルスが ARN を発症させていると予想される。障壁の一つと考えられるのは、網膜の内外 2 種類の血液網膜関門 (blood-retinal barrier; BRB) inner BRB と outer BRB であり、これによって通常網膜は感染や炎症から守られている。したがって、ARN の発症機序としては、感染部位への炎症性細胞の遊走はもとより、その前段階として BRB の破壊が起きている可能性が高い。ARN の原因ウイルスとして最も頻度が高く、なおかつ最も予後不良の因子とされているのは VZV である。これまで ARN の病態解析がほとんどなされてこなかった背景には、VZV がヒトにしか感染しないウイルスであるため、動物実験による疾患モデルが得られないことや、網膜が眼底部の緻密な層構造組織であることから、*in vitro* で培養や感染を行えないことが要因として存在する。しかし近年、臓器モデルとしての *in vitro* 培養系「オルガノイド」の作成技術が進歩し、網膜オルガノイド (RO) も作成が可能となってきた。

## 2. 研究の目的

ARN の発症機序を解明するとともに、より効果的な治療法を模索することが本研究の目的である。そのために、RO や正常網膜色素上皮細胞 (RPE) を用いて、VZV および HSV が outer BRB から網膜内に感染できるかを検討した。さらに新旧の抗ヘルペスウイルス薬 (アメナメビルとアシクロビル) の抗ウイルス効果を比較した。

## 3. 研究の方法

### 1) iPS 細胞培養方法および RO 作成方法の検討

iPS 細胞用培地の開発と RO 分化誘導方法の改良は日進月歩であり、研究期間中に材料および方法の検討・変更に迫られながら、最終的に以下の通りとした。

- ・iPS 細胞用培地: StemFit AK02N (味の素ヘルシーサプライ株式会社)
- ・RO 作成方法: 文献 (Berber et al. J Transl Genet Genom 2021;5:292-303) に基づいて作成

### 2) RO および RPE へのウイルス感染性の検討

RO に対してはウイルス液 (VZV pOka 株、HSV-1 McKrae 株) 中で、RPE に対しては頂端側あるいは基底側へのウイルス液の添加により、室温 1 時間吸着させた後、ウイルスの感染成立と感染標的細胞を蛍光抗体法により解析した。

### 3) 抗ヘルペスウイルス薬の比較

ヒト RPE 細胞株 (ARPE-19) を用い、Transwell 上で分化させた ARPE-19 由来 RPE に、頂端側からウイルス感染させた後、チャンバー下層の培地にアシクロビル (ACV) またはアメナメビル (AMNV) を添加し、抗ウイルス作用を蛍光抗体法により比較した。

## 4. 研究成果

### 1) RO および RPE におけるウイルス感染性

当初参考にしていた文献では、作成した RO においていくつかの網膜細胞種の分化が不十分であったため、参考文献から見直し分化誘導方法を再検討した。その結果、前項で挙げた文献の方法への変更により改善がみられたので、RO へのウイルス感染を実施した。その結果、HSV-1 のみ高力価 ( $10^7$  PFU/ml) で感染を認めることができたが、VZV では力価の上限 ( $10^4$  PFU/ml) の関係か感染は認められなかった。

一方、Transwell 上で培養した RPE に対して VZV の感染性を検討した結果、頂端側へのウイルス吸着では感染が認められたものの、基底側へのウイルス吸着では感染が認められなかった。このことは、VZV は outer BRB である RPE への感染経路として、脈絡膜側から垂直にではなく、毛様体側から水平に感染する可能性を示唆する結果となった。

## 2) 抗ヘルペスウイルス薬の比較

生体における網膜色素上皮細胞の極性を考慮して、Transwell 上で ARPE-19 を上皮組織様に分化誘導した後、頂端側からウイルス感染および下層に薬剤添加を行い、蛍光抗体法による抗ウイルス効果の比較を行った。その結果、HSV-1 および VZV の感染に対して、アシクロビル (ACV) が  $100 \mu\text{M}$  でも両ウイルスの増殖を抑えきれなかったのに対し、アメンメビル (AMNV) は  $1 \mu\text{M}$  で両ウイルスの増殖を完全に抑制した。以上の結果から、特に RPE で ACV の効果は限定的であり、AMNV への切り替えが ARN 治療成績の向上につながる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木はる奈、田中ひなの、嶺井華、大黒徹、武本眞清
2. 発表標題 ヒト網膜細胞株におけるHSV-1およびVZVに対する抗ヘルペスウイルス薬の効果比較
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 武本眞清、堀場千尋、伊藤真子、増田雪花、定成秀貴、村山次哉、大黒徹
2. 発表標題 ヒトサイトメガロウイルス91-7S株によるケモカイン産生誘導と遺伝子解析
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 武本眞清、定成秀貴、松原京子、村山次哉、大黒徹
2. 発表標題 ヒト網膜由来細胞株における抗水痘帯状疱疹ウイルス薬の比較検討
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会
4. 発表年 2019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	周尾 卓也  (Shuo Takuya)  (90399006)	北陸大学・医療保健学部・講師    (33304)	

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
---------	---------