

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09822

研究課題名（和文）難治性網膜疾患の病態解明・新規治療薬開発に向けたカルパイン生体眼内イメージング

研究課題名（英文）In vivo imaging of intraocular Calpain in retinal diseases

研究代表者

國方 彦志（Kunikata, Hiroshi）

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40361092

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）：本研究ではカルパイン活性を検出可能な生体内イメージングを行い、カルパインを標的とした治療開発の可能性について、複数の網膜疾患動物モデルで評価を行った。網膜動脈閉塞症モデルでは、網膜虚血に伴い網膜内層のカルパイン活性化と網膜細胞死が生じることが明らかとなり、カルパインが網膜動脈閉塞症の治療ターゲットとして有望であることが示唆された。網膜動脈閉塞症は、カルパイン阻害薬による神経保護治療の治験が実施されており、その有用性を示唆する所見が得られた。また、ぶどう膜炎モデルでは、網膜内層で軽度であるがカルパイン活性化が生じていることが示唆され、TNF- $\alpha$  の誘導による網膜神経節細胞の障害が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜動脈閉塞症モデルでは、網膜内層のカルパイン活性化が生じることが明らかとなり、カルパインが網膜動脈閉塞症の治療ターゲットとして有望であることが示唆された。また、ぶどう膜炎モデルでも、網膜内層でカルパイン活性化が生じていることが示唆され、TNF- $\alpha$  の誘導による網膜神経節細胞の障害が示唆された。また、網膜血管内皮障害及び白血球浸潤の評価が可能となり、今後、カルパイン活性化との関連性を検討することが可能となった。これらの成果は、難治性網膜疾患の新たな治療開発に寄与することで、失明患者の減少やQOLの維持に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, to evaluate the potential of calpain-targeted therapeutic development, we investigated calpain activity using in vivo imaging in several animal models of retinal disease. In a retinal artery occlusion model, calpain activation in the inner retinal layers and retinal cell death were found to occur following retinal ischemia, suggesting that calpain is a promising therapeutic target for retinal artery occlusion. In a model of uveitis, calpain activation also occurred in the inner retinal layers, suggesting TNF- $\alpha$ -induced retinal ganglion cell damage.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜神経保護治療 カルパイン阻害薬 生体内イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

本邦や世界的にも有病率が高まっている加齢黄斑変性症・糖尿病網膜症・網膜静脈閉塞症等の網膜疾患は、失明に至り得る難治性疾患として緑内障と共に社会問題となっている。これらの網膜疾患に対する革新的治療法として網膜神経保護治療の開発が進められている。これまで動物モデルを用いた基礎研究において、虚血、酸化ストレス、高血糖、炎症等の生体反応が網膜疾患発症や進展の原因となり、網膜細胞死を生じ、不可逆的な視機能障害に至ることが明らかとなっている。これらの一連の網膜障害にシステインプロテアーゼの1種であるカルパインの活性化が関与し、網膜神経細胞障害を誘導することが、疾患動物モデル(Oka, et al. 2006)やヒト網膜培養細胞を用いた検討から明らかとなっている(Azuma and Shearer 2008)。そのため、カルパイン阻害薬 SJP-0008 が網膜神経保護治療薬として開発が進められているものの、ヒト網膜の生検が困難であるため、実際のヒト網膜疾患におけるカルパイン活性化についての詳細は解明されていない。

近年開発が進められている生体内イメージングは、特定の分子、細胞、生体反応等の生体内における観察を可能とし、病態解明及び治療開発のための有力なツールとなる。特に眼球は、角膜、水晶体、硝子体等の中間透光体が透明組織であり、眼底の血管・神経組織を透視出来ることから、網膜・脈絡膜は生体内イメージングに最適な臓器である。実際、酸化ストレス、炎症細胞、網膜細胞死などの生体内イメージングが報告され、病態解明及び治療開発における有用性が示されつつある。特に緑内障患者において、網膜死細胞の生体内イメージング法が実用化されつつあり、その網膜死細胞数と緑内障の視野異常の重症度に関連が認められることが明らかとなった(Cordeiro MF, et al. Brain 2017)。そのような背景に基づき、網膜神経保護治療の有力な標的分子である活性化カルパインのヒトの網膜疾患における関与を明らかにし、カルパイン阻害薬による網膜神経保護治療開発を促進するために、生体内イメージングにより活性化カルパインを検出可能な診断法を確立することが有用と考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、虚血、酸化ストレス及び炎症等が関連する網膜疾患に対する、ヒトに実用化可能な活性化カルパインの生体内イメージングシステムを確立し、活性化カルパインを標的とした診断・治療体系を確立することを目的とした。そこで、カルパイン活性検出蛍光プローブ Acetyl-Leu-Met-hydroxymethyl-rhoamine green (Ac-LM-HMRG) を用いて、複数の網膜疾患の動物モデルにおいて、カルパイン活性化の生体内イメージング法を行い、カルパインを標的とした網膜神経保護治療の可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 網膜動脈閉塞症モデル

全身麻酔下で Brown Norway ラットの網膜動脈にレーザーを照射して網膜動脈閉塞を作成した。8 時間後にカルパイン活性検出蛍光プローブ (Ac-LM-HMRG) 0.02mM 3 $\mu$ l を硝子体内注射で投与し、カルパインが活性化した網膜細胞で生じる HMRG の蛍光を共焦点走査型ダイオードレーザー検眼鏡 (cSLO) で生体内イメージングを行った。カルパイン活性を評価した後に、死細胞蛍光プローブ (SYTOX orange) 25 $\mu$ M 2 $\mu$ l を硝子体内に投与し、網膜動脈閉塞による網膜細胞死を生体内イメージングにて評価した。

### (2) ぶどう膜炎モデル

心臓、腎臓、肝臓などの多臓器で、カルパインを介した炎症性サイトカインによる細胞障害が報告されており、眼科領域では、視神経炎、糖尿病網膜症などでカルパイン活性化によって惹起された炎症性サイトカインによる組織障害について報告がある。眼科領域ではマウスぶどう膜炎モデルの一つである EIU (Endotoxin-induced uveitis) が LPS で惹起される。他科領域では LPS によるカルパイン活性化について報告があることから、EIU でカルパインを介した網膜障害が確認について検討した。

まず、Brown Norway ラットの腹腔内に E. Coli LPS 200mg を投与し、EIU モデルを作成した。LPS 投与 3 日後に Ac-LM-HMRG の改変プローブを硝子体内投与し、cSLO で生体内イメージングを行い、網膜内層のカルパイン活性化を評価した。

次に、EIU モデルにおけるカルパインの関与を詳細に検討するために、カルパインの活性化を

抑制的に制御する Calpastatin のノックアウトマウスを導入し、カルパイン活性の違いが EIU モデルの網膜でどのような変化をもたらすか検討した。

Calpastatin ノックアウトマウスまたは C57BL/6J マウスに E. Coli LPS の腹腔内投与によって EIU モデルを作成した。LPS は 125mg を投与した。LPS 投与後、1 日後、6 日後にマウスを安楽死させ、網膜を摘出し、qPCR で炎症マーカー及び網膜神経節細胞マーカーを評価した。また、Calpastatin ノックアウトマウスに EIU を誘導し、1 週間後に安楽死後に摘出した網膜の進展標本を作製し、Rbpm5 免疫染色を行い、網膜神経節細胞数を評価した。

次に、EIU モデルにおける網膜血管内皮障害及び白血球浸潤を評価するために、野生型マウスに LPS 250µg を腹腔内投与し、24 時間後にフルオレセイン色素及び acridine orange による造影検査を cSLO で行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 網膜動脈閉塞症モデル

レーザーを照射して網膜動脈閉塞を作成したラットの硝子体内に Ac-LM-HMRG を投与し、cSLO で眼底を生体内イメージングしたところ、Ac-LM-HMRG 投与 20 分後に閉塞した動脈の灌流域で網膜内層にカルパイン活性化を反映する HMRG 陽性細胞を認めた。次に、SYTOX orange を硝子体内に投与し、cSLO で眼底を生体内イメージングしたところ、SYTOX orange 投与 10 分後に網膜細胞の死細胞を閉塞動脈の灌流域で網膜内層に多数認めた(図 1)。以上の結果より、動脈閉塞により虚血となった網膜では、網膜細胞でカルパインの活性化と細胞死が生じていることが明らかとなった。カルパイン活性化と細胞死が網膜の虚血領域で生じていることから、網膜の虚血に伴いカルパインの活性化が生じ、その結果、網膜細胞死が生じていることが示唆された。網膜動脈閉塞症における網膜内層障害にカルパイン活性化が関与していることから、カルパインが網膜動脈閉塞症の治療標的分子となる可能性が示唆された。

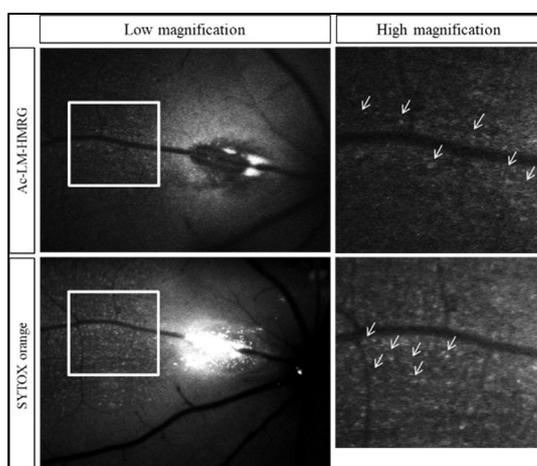


図 1 網膜動脈閉塞症モデルの生体内イメージング  
上段は Ac-LM-HMRG でカルパイン活性化を、下段は SYTOXorange で細胞死を検出している。

##### (2) ぶどう膜炎モデル

LPS の腹腔内投与によるラット EIU モデルに Ac-LM-HMRG 改変プローブを投与し、cSLO で眼底を生体内イメージングしたところ、Ac-LM-HMRG 改変プローブ投与 20 分後に視神経乳頭周辺の網膜内層にカルパイン活性化を反映する HMRG 陽性細胞を少数認めた(図 2)。以上より LPS による EIU モデルにカルパイン活性化が関与することが示唆されたが、反応性が軽微であることから、十分な眼炎症を誘導し、適切なレベルの網膜障害を誘導することが必要と考えられた。

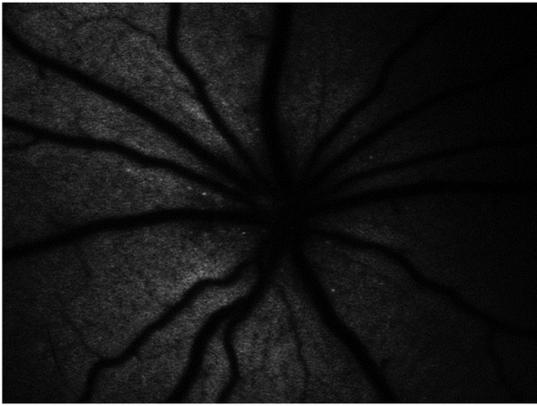


図2 ぶどう膜炎モデルの生体内イメージング  
LPSによるラットEIUモデル。Ac-LM-HMRG 改変プローブでカルパイン活性化細胞を検出した。

Calpastatin ノックアウトマウスと野生型マウスに LPS の腹腔内投与により EIU を誘導し、提出網膜の炎症マーカー、網膜神経節細胞マーカーに関して qPCR は図 3 の通りであった。MCP-1 は day1 で野生型で発現上昇が認められたが、TNF- $\alpha$  は day1 で Calpastatin ノックアウトマウスで発現上昇が認められた。Rbpms は day1 および day6 で Calpastatin ノックアウトマウスで発現減少が認められた。以上より、Calpastatin ノックアウトマウスでは、EIU の導入により、網膜で TNF- $\alpha$  が誘導され、網膜神経節細胞の障害が生じている可能性が示唆された。

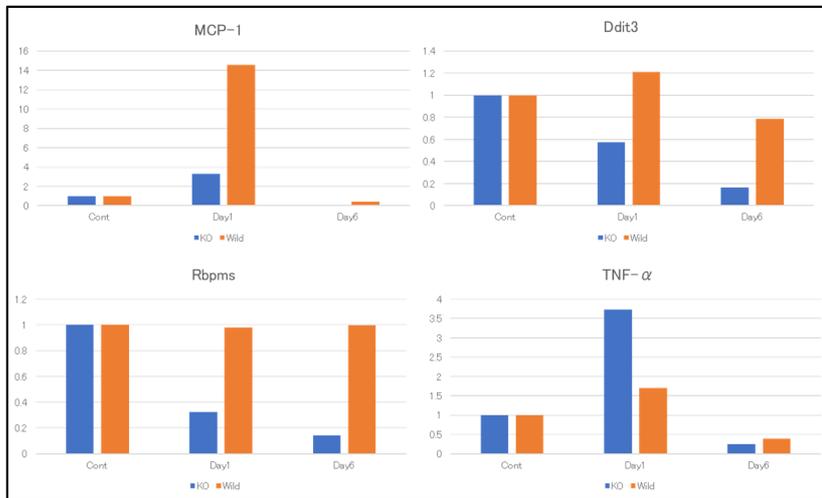


図3 マウス EIU モデル網膜の qPCR  
Calpastatin ノックアウトマウス (KO) と野生型マウス(Wild)の比較。

Calpastatin ノックアウトマウスの EIU モデルでは、網膜神経節細胞障害が誘導されることが示唆されたため、網膜進展標本を作製し、Rbpms 免疫染色を行い、EIU モデルにおける網膜神経節細胞数を評価した。その結果、図 4 のように EIU モデルで網膜神経節細胞数が減少する傾向が示唆されたが、有意差は認められなかった。

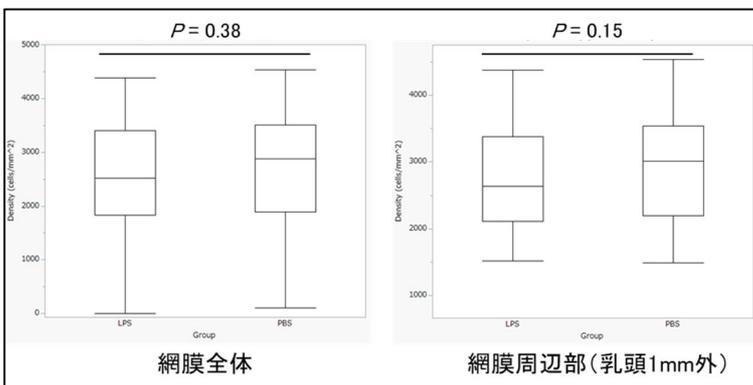


図4 Rbpms 免疫染色による網膜神経節細胞数評価  
Calpastatin ノックアウトマウスに LPS で EIU を導入した群と PBS を投与した対照群での比較。

EIU モデルマウスにフルオレセイン及び acridine orange による造影検査を行い、血管内皮障害及び白血球浸潤をした。図 5, 6 のように EIU モデルマウスでは、網膜血管の拡張とが認められた。また acridine orange 陽性白血球のローリング及び血管への接着が認められた。

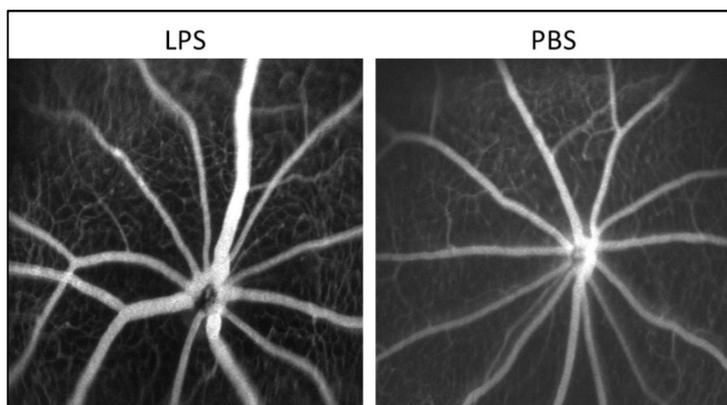


図 5 フルオレセイン造影  
LPS は EIU モデル。PBS は対照群。EIU モデルでは血管拡張を認めた。

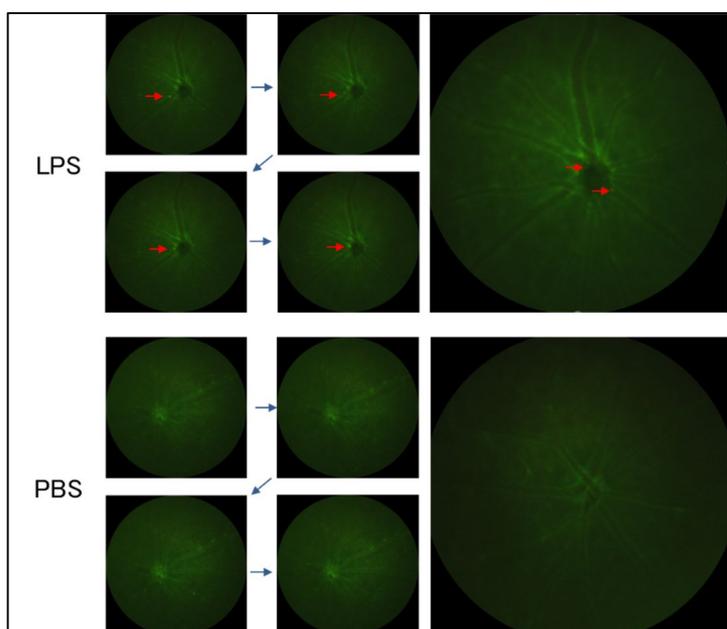


図 6 acridine orange 造影  
LPS は EIU モデル。PBS は対照群。  
EIU モデルでは赤矢印の白血球のローリングや接着を認めた。

以上のように、本研究ではカルパイン活性を検出可能な生体内イメージングを行い、カルパインを標的とした治療開発の可能性について、複数の網膜疾患動物モデルで評価を行った。網膜動脈閉塞症モデルでは、網膜虚血に伴い網膜内層のカルパイン活性化と網膜細胞死が生じることが明らかとなり、カルパインが網膜動脈閉塞症の治療ターゲットとして有望であることが示唆された。網膜動脈閉塞症は、カルパイン阻害薬による神経保護治療の治験が実施されており、その有用性を示唆する所見が得られた。またぶどう膜炎モデルでは、網膜内層で軽度であるがカルパイン活性化が生じていることが示唆され、TNF- $\alpha$  の誘導による網膜神経節細胞の障害が示唆された。また網膜血管内皮障害及び白血球浸潤の評価が可能となり、今後、カルパイン活性化との関連性を検討することが可能となった。これらの成果は、難治性網膜疾患の新たな治療開発に寄与することで、失明患者の減少や QOL の維持に貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10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 Kunikata Hiroshi, Tawarayama Hiroshi, Tsuda Satoru, Akaike Takaaki, Nakazawa Toru	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of an anti-oxidative intraocular irrigating solution based on reactive persulfides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-21677-4	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 Yamaguchi Chiaki, Kunikata Hiroshi, Hashimoto Kazuki, Yoshida Masaaki, Ninomiya Takahiro, Hariya Takehiro, Abe Toshiaki, Nakazawa Toru	4. 巻 27
2. 論文標題 De novo Vogt-Koyanagi-Harada disease after vaccination for COVID-19, successfully treated with systemic steroid therapy and monitored with laser speckle flowgraphy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology Case Reports	6. 最初と最後の頁 101616 ~ 101616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2022.101616	査読の有無 無
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 Ninomiya Takahiro, Kunikata Hiroshi, Ishikawa Makoto, Nakazawa Toru	4. 巻 -
2. 論文標題 Association between myopia and complications of glaucoma with retinal diseases: investigation of a large medical insurance database	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-023-06031-2	査読の有無 無
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 Kunikata, MD, PhD Hiroshi, Nishiguchi, MD, PhD Koji M., Watanabe, MD, PhD Mika, Nakazawa, MD, PhD Toru	4. 巻 28
2. 論文標題 Surgical outcome and pathological findings in macular epiretinal membrane caused by neurofibromatosis type 2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digital Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 12 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5693/djo.02.2021.06.001	査読の有無 無
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 Kunikata Hiroshi, Osada Urara, Abe Toshiaki, Nakazawa Toru	4. 巻 259
2. 論文標題 Efficacy of early microincision vitrectomy surgery in traumatic macular hole	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 2451 ~ 2454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-021-05139-7	査読の有無 無
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 Asano Toshifumi, Kunikata Hiroshi, Yasuda Masayuki, Nishiguchi Koji M., Abe Toshiaki, Nakazawa Toru	4. 巻 41
2. 論文標題 Ocular microcirculation changes, measured with laser speckle flowgraphy and optical coherence tomography angiography, in branch retinal vein occlusion with macular edema treated by ranibizumab	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 151 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10792-020-01562-7	査読の有無 無
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 Kunikata Hiroshi, Aizawa Naoko, Sato Risa, Nishiguchi Koji M., Abe Toshiaki, Nakazawa Toru	4. 巻 64
2. 論文標題 Successful surgical outcomes after 23-, 25- and 27-gauge vitrectomy without scleral encircling for giant retinal tear	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 506 ~ 515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-020-00755-y	査読の有無 無
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 Kunikata Hiroshi, Yasuda Masayuki, Aizawa Naoko, Osada Urara, Nishiguchi Koji M., Abe Toshiaki, Nakazawa Toru	4. 巻 41
2. 論文標題 RETINAL SENSITIVITY AND VESSEL DENSITY AFTER MACULAR HOLE SURGERY WITH THE SUPERIOR INVERTED INTERNAL LIMITING MEMBRANE FLAP TECHNIQUE	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Retina	6. 最初と最後の頁 45 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IAE.0000000000002839	査読の有無 無
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 Osada Urara, Kunikata Hiroshi, Yasuda Masayuki, Hashimoto Kazuki, Nishiguchi Koji M., Nakazawa Toru	4. 巻 258
2. 論文標題 Association of retinal vessel density with retinal sensitivity in surgery for idiopathic epiretinal membrane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1911 ~ 1920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-020-04754-0	査読の有無 無
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 Kunikata Hiroshi, Sato Risa, Nishiguchi Koji M., Nakazawa Toru	4. 巻 258
2. 論文標題 Systemic oxidative stress level in patients with central serous chorioretinopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1575 ~ 1577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-020-04664-1	査読の有無 無
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
---------------------------	-----------------------	----

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