

令和 5 年 5 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09834

研究課題名(和文) 強膜小胞体ストレスによる病的眼軸伸長の分子機序の解明

研究課題名(英文) Myopia development and scleral ER stress

研究代表者

池田 真一 (Ikeda, Shin-ichi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：50534898

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)：強膜小胞体ストレスは、PERKとATF6の両軸を活性化し、強膜コラーゲンのリモデリングを経て、近視発症に必須の制御因子であることを明らかにした。レンズ誘発近視(LIM)マウスでは、強膜にERストレスが認められた。ERストレスに対する薬理的介入は、近視の進行を誘発または抑制した。LIMはIRE1、PERK、ATF6を活性化し、PERKとATF6を薬理的に阻害すると近視進行が抑制された。LIMにおけるコラーゲン線維の薄膜化および制御不能なコラーゲンの発現は、4-PBA投与により改善された。強膜小胞体ストレスへの介入は近視抑制・治療薬として有望であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近視はアジア圏を中心に急増している。眼球が前後方向に伸長することが近視の本体であるがその伸長により後眼部に物理的な負荷が加わることで視覚障害につながるということが報告されてから眼軸伸長への介入の必要性が認識されるようになったが、効果的な方法は現存しない。本研究により見出された強膜小胞体ストレスへの介入は極めて効率的に眼軸伸長、近視進行を抑制したことから本研究を元とした薬剤開発は急増する近視に歯止めをかける可能性があり、社会的に非常に意義深い研究成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Here, we show that endoplasmic reticulum (ER) stress in sclera is an essential regulator of axial elongation in myopia development through activation of both PERK and ATF6 axis followed by scleral collagen remodelling. Mice with lens-induced myopia (LIM) showed ER stress in sclera. Pharmacological interventions for ER stress could induce or inhibit myopia progression. LIM activated all IRE1, PERK and ATF6 axis, and pharmacological inhibition of both PERK and ATF6 suppressed myopia progression, which was confirmed by knocking down above two genes via CRISPR/Cas9 system. LIM changed the expression of scleral collagen genes responsible for ER stress. Furthermore, collagen fibre thinning and expression of dysregulated collagens in LIM were ameliorated by 4-PBA administration. We demonstrate that scleral ER stress and PERK/ATF6 pathway controls axial elongation during the myopia development in vivo model and 4-PBA eye drop is promising drug for myopia suppression/treatment.

研究分野：眼科学 細胞生物学

キーワード：近視 強膜 小胞体ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

眼の前後方向の長さ、眼軸長は眼の健康状態を示す指標の1つである。長眼軸長は視覚障害に強く関与し眼軸長が30mmを超える70歳以上の8割以上が視覚障害であると報告されている(Willem et al, *JAMA Ophthalmol*, 2016)。成長に伴う生理学的眼軸伸長は眼球全体が均一に成長するのに対し、病的眼軸伸長は主に後眼部が後方に伸長することで生じ眼球が楕円体状に変形する(図1)。これにより後眼部は伸展による圧力・応力などの力に晒され後眼部に存在する黄斑(視細胞が密に集まる場)や視神経が障害され、それがある閾値を超えると視神経症、失明に至ることもある。病的眼軸伸長を主病変とするのが近視である。近視は眼球に侵入した光線が網膜よりも前方で焦点を結ぶためものがぼやけて見える状態である。ぼやけはメガネやコンタクトレンズで矯正できるが、病的眼軸伸長による視神経・黄斑への障害はそれでは緩和できない。近視は本邦における失明原因の第4位である(平成17年度厚労省網膜脈絡視神経萎縮症調査研究班)。また、近視は本邦などのアジア圏を中心に急増しており、我々や他のグループの疫学調査によると都内学童の60~80%が近視保有者であった(Yotsukura et al, *JAMA Ophthalmol*, 2019)。これらのことから今後病的眼軸伸長に起因する失明者が激増することが予想されているが(Holden et al, *Ophthalmology*, 2016) 病的眼軸伸長に対する効果的な予防・治療法は現存しない。それは「なぜ眼が伸びるのか?」というシンプルな問いに対する答えが全くわかっていないためである。

眼軸伸長という眼球の形態変化に関して、申請者は眼球の形態を維持している強膜に着目し組織学的な検証を行ったところ、近視強膜の線維芽細胞の粗面小胞体の膨潤が観察された。この際、unfold protein response (UPR) 関連遺伝子の発現増加も観察されたことから、小胞体ストレスが生じていることが示唆された。そこで、ケミカルシャペロンである4-phenylbutic acid (4-PBA)を近視誘導期間中に腹腔内投与または点眼投与すると近視化がほとんどキャンセルされた。このことは近視進行において強膜小胞体ストレスが中心的な機序であることを示唆しており、また点眼により近視を抑制・治療できる可能性を示していた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は強膜小胞体ストレスが近視進行にどのように関与しているのかを明らかにすることと、小胞体ストレス下流のUPR経路のうち、どの経路が近視進行に関与しているのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

マウスにマイナスレンズを装用することで近視を実験的に誘導するモデル(Lens-induced myopia: LIM)を近視モデルとして用い、近視誘導期間中にUPR経路の阻害剤(STF083010: IRE1阻害剤、GSK2656157: PERK阻害剤、Nelfinavir: ATF6阻害剤)を単独もしくは混合で点眼投与した。また、CRISPRおよびPERK, ATF6を標的としたguide RNAを含むAAVをマウスのテノン嚢下注射により投与し、強膜におけるPERK, ATF6の発現を低下させ、LIMによる近視誘導に与える影響を検討した。また、PERK, ATF6の活性化剤であるCCT020312およびAA147の点眼投与を行い、近視進行に与える影響を検討した。IRE1, PERK, ATF6経路の活性化はWestern blottingにより検討した。またマウスにおいて発現が知られている全43遺伝子の発現変化をqPCRで、透過型電子顕微鏡でコラーゲン線維の観察も行った。

#### 4 . 研究成果

IRE1 阻害剤の投与は近視進行に影響を与えなかったが、PERK 及び ATF6 阻害剤は非近視誘導眼において眼軸伸長 ( $p=0.04$ ,  $p=0.021$ ) 及び屈折値の低下 ( $p<0.01$ ,  $p<0.01$ ) を引き起こした。PERK, ATF6 阻害剤の混合投与を行うと、非近視誘導眼には影響を与えずマイナスレンズ装用眼の眼軸伸長 ( $p<0.01$ ) および近視化が有意に抑制された ( $p<0.01$ )。また、ATF6, PERK の点眼投与はそれぞれ近視化を誘導し ( $p=0.03$ ,  $p=0.045$ )、それらの混合投与は相加的に作用した ( $p<0.01$ )。IRE1 阻害剤の投与は近視進行に影響を与えなかったが、PERK 及び ATF6 阻害剤は非近視誘導眼において眼軸伸長 ( $p=0.04$ ,  $p=0.021$ ) 及び屈折値の低下 ( $p<0.01$ ,  $p<0.01$ ) を引き起こした。PERK, ATF6 阻害剤の混合投与を行うと、非近視誘導眼には影響を与えずマイナスレンズ装用眼の眼軸伸長 ( $p<0.01$ ) および近視化が有意に抑制された ( $p<0.01$ )。また、ATF6, PERK の点眼投与はそれぞれ近視化を誘導し ( $p=0.03$ ,  $p=0.045$ )、それらの混合投与は相加的に作用した ( $p<0.01$ )。CCT020312 および AA147 の点眼投与はそれぞれ PERK 経路、ATF6 経路のみを活性化し、その結果眼軸伸長および屈折の低下という近視の表現系が生じ、その混合投与はより強い近視を誘導した。近視誘導によりマウスに発現する 43 のコラーゲン遺伝子のうち 11 の遺伝子が近視早期で発現が増加し、Collagen1A1 は近視進行後期でその発現が低下した。また近視誘導により細かいコラーゲン線維の割合が増加した。これらの変化は全てケミカルシャペロンである 4-PBA の点眼投与によって全てキャンセルされた。

以上の結果から、強膜小胞体ストレスは PERK, ATF6 の両経路を介してコラーゲンのリモデリングを制御することで近視進行に関与していることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12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 Xiaoyan Jiang, Machelie T Pardue, Kiwako Mori, Shin-Ichi Ikeda, Hidemasa Torii, Shane D'Souza, Richard A Lang, Toshihide Kurihara, Kazuo Tsubota	4. 巻 118(22)
2. 論文標題 Violet light suppresses lens-induced myopia via neuropsin (OPN5) in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci	6. 最初と最後の頁 e2018840118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2018840118	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 Saori Kakehi, Yoshifumi Tamura, Shin-Ichi Ikeda, Naoko Kaga, Hikari Taka, Noriko Ueno, Tetsuya Shiuchi, Atsushi Kubota, Keishoku Sakuraba, Ryuzo Kawamori, Hirotaka Watada	4. 巻 321(6)
2. 論文標題 Short-term physical inactivity induces diacylglycerol accumulation and insulin resistance in muscle via lipin1 activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Physiol Endocrinol Metab	6. 最初と最後の頁 E766-E781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpendo.00254.2020	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 Ikeda Shin-Ichi, Kurihara Toshihide, Toda Masataro, Jiang Xiaoyan, Torii Hidemasa, Tsubota Kazuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Oral Bovine Milk Lactoferrin Administration Suppressed Myopia Development through Matrix Metalloproteinase 2 in a Mouse Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3744 ~ 3744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12123744	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 Lee Deokho, Miwa Yukihiko, Jeong Heonuk, Ikeda Shin-ichi, Katada Yusaku, Tsubota Kazuo, Kurihara Toshihide	4. 巻 Nov 12
2. 論文標題 A Murine Model of Ischemic Retinal Injury Induced by Transient Bilateral Common Carotid Artery Occlusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	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) 10.3791/61865	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 Mori Kiwako, Kurihara Toshihide, Jiang Xiaoyan, Ikeda Shin-ichi, Yotsukura Erisa, Torii Hidemasa, Tsubota Kazuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Estimation of the Minimum Effective Dose of Dietary Supplement Crocetin for Prevention of Myopia Progression in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 180 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12010180	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 Kakehi Saori, Tamura Yoshifumi, Takeno Kageumi, Ikeda Shin-ichi, Ogura Yuji, Saga Norio, Miyatsuka Takeshi, Naito Hisashi, Kawamori Ryuzo, Watada Hiroataka	4. 巻 9
2. 論文標題 Endurance Runners with Intramyocellular Lipid Accumulation and High Insulin Sensitivity Have Enhanced Expression of Genes Related to Lipid Metabolism in Muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 3951 ~ 3951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9123951	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 Mori Kiwako, Kuroha Sayoko, Hou Jing, Jeong Heonuk, Ogawa Mamoru, Ikeda Shin ichi, Kang Jing X., Negishi Kazuno, Torii Hidemasa, Arita Makoto, Kurihara Toshihide, Tsubota Kazuo	4. 巻 36
2. 論文標題 Lipidomic analysis revealed n 3 polyunsaturated fatty acids suppressed choroidal thinning and myopia progression in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101947R	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 Ikeda Shin-ichi, Kurihara Toshihide, Jiang Xiaoyan, Miwa Yukihiro, Lee Deokho, Serizawa Naho, Jeong Heonuk, Mori Kiwako, Katada Yusaku, Kunimi Hiromitsu, Ozawa Nobuhiro, Shoda Chiho, Ibuki Mari, Negishi Kazuno, Torii Hidemasa, Tsubota Kazuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Scleral PERK and ATF6 as targets of myopic axial elongation of mouse eyes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-33605-1	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 Zhang Yan, Jeong Heonuk, Mori Kiwako, Ikeda Shin-Ichi, Shoda Chiho, Miwa Yukihiko, Nakai Ayaka, Chen Junhan, Ma Ziyang, Jiang Xiaoyan, Torii Hidemasa, Kubota Yoshiaki, Negishi Kazuno, Kurihara Toshihide, Tsubota Kazuo	4. 巻 1
2. 論文標題 Vascular endothelial growth factor from retinal pigment epithelium is essential in choriocapillaris and axial length maintenance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgac166	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 Lee Deokho, Nakai Ayaka, Miwa Yukihiko, Tomita Yohei, Kunimi Hiromitsu, Chen Junhan, Ikeda Shin-Ichi, Tsubota Kazuo, Negishi Kazuno, Kurihara Toshihide	4. 巻 36
2. 論文標題 Retinal degeneration induced in a mouse model of ischemia?reperfusion injury and its management by pemaifibrate treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 22497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202200455RRR	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 Liang Yifan, Ikeda Shin-ichi, Chen Junhan, Zhang Yan, Negishi Kazuno, Tsubota Kazuo, Kurihara Toshihide	4. 巻 24
2. 論文標題 Myopia Is Suppressed by Digested Lactoferrin or Holo-Lactoferrin Administration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5815 ~ 5815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24065815	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 Jeong Heonuk, Kurihara Toshihide, Jiang Xiaoyan, Kondo Shinichiro, Ueno Yusuke, Hayashi Yuki, Lee Deokho, Ikeda Shin-Ichi, Mori Kiwako, Torii Hidemasa, Negishi Kazuno, Tsubota Kazuo	4. 巻 228
2. 論文標題 Suppressive effects of violet light transmission on myopia progression in a mouse model of lens-induced myopia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 109414 ~ 109414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2023.109414	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7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池田真一、栗原俊英、姜効炎、森紀和子、堅田侑作、國見洋光、三輪幸裕、小沢信博、伊吹麻里、正田千穂、鳥居秀成、坪田一男
2. 発表標題 UPR(Unfolded Protein Response)による病的眼軸伸張制御機構
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田 真一，栗原 俊英，姜 効炎，森 紀和子，ジョン ホヌク，リー ドコ，堅田 侑作，國見 洋光，三輪 幸裕，小沢 信博，伊吹 麻里，正田 千穂，鳥居 秀成，坪田 一男
2. 発表標題 強膜小胞体ストレスによる近視進行制御
3. 学会等名 第3回日本近視学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田真一
2. 発表標題 強膜小胞体ストレスへの介入による近視進行制御の可能性
3. 学会等名 第7回近視研究会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田真一、栗原俊英、根岸一乃、坪田一男
2. 発表標題 近視進行に伴う強膜コラーゲン線維の変性
3. 学会等名 第4回日本近視学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田真一、栗原俊英、根岸一乃、坪田 一男
2. 発表標題 AAVテノン嚢下注射による強膜への遺伝子発現法を用いた近視発症メカニズムの検証
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田真一
2. 発表標題 強膜小胞体ストレスは近視進行の中心的機序である
3. 学会等名 第25回眼科分子生物学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shin-ichi Ikeda, Toshihide Kurihara, Xiaoyan Jiang, Kiwako Mori, Hidemasa Torii, Kazuo Tsubota
2. 発表標題 Myopia can be controlled by intervention in scleral endoplasmic reticulum stress
3. 学会等名 International Myopia Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 薬剤点眼による近視誘導モデル	発明者 池田真一、栗原俊英、坪田一男	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-009338	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 近視進行抑制剤および抑制法としてのM2マクロファージ誘導剤	発明者 1. 坪田一男、栗原俊英、池田真一、コサイ	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-72596	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 強膜菲薄化治療用点眼剤及び強膜菲薄化治療剤のスクリーニング方法	発明者 2. 坪田一男、栗原俊英、池田真一、森紀和子、姜效炎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-205490	出願年 2020年	国内・外国の別 国内



産業財産権の名称 小児の近視進行抑制用点眼剤及び小児の近視進行抑制剤のスクリーニング方法	発明者 3. 坪田一男、栗原俊英、池田真一、森紀和子、姜效炎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-205489	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------