

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18393

研究課題名（和文）低酸素応答に伴う細胞死制御による網膜変性治療の確立

研究課題名（英文）Controlling hypoxia-induced cell death for the treatment of retinal Degeneration

研究代表者

三輪 幸裕（Miwa, Yukihiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：30870430

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、種々の難治性網膜疾患モデルマウスの病態形成に低酸素誘導因子（Hypoxia-inducible Factor; HIF）が関与していること、また、それら疾患モデルマウスにおいて抗HIF療法が治療的効果を有していることを見出した。また、その分子機序としてHIF-1 /BNIP3軸などが関与している可能性を報告した。

天然物ライブラリーを用いたドラッグスクリーニングの結果、植物や魚類などの様々な食品由来抽出物にHIF阻害活性があることを見出し、得られた複数の新規HIF阻害剤が、難治性網膜疾患モデルマウスにおける網膜神経変性や網膜病的血管新生に対し、抑制効果を有している可能性を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性や萎縮型加齢黄斑変性などの網膜変性疾患は、網膜視細胞死を特徴とする難治性網膜疾患である。現在までに、確立された治療法や予防法は存在せず、我が国における中途失明原因の20%超を占める。その社会的コストは20兆円とされており、早急な治療法の確立が求められている。

本研究で得られた新規HIF阻害剤は、その多くが食品物に由来することからその安全性が担保されている。また、日常の食事に取り入れることが可能であると考えられることから、本研究で得られた新規HIF阻害剤は、より初期の網膜変性疾患に対し、より長期に渡って介入できる可能性を有している。

研究成果の概要（英文）：Our research focused on investigating the efficacy of novel treatment approaches for refractory retinal diseases. Specifically, we explored the involvement of hypoxia-inducible factor (HIF) in the pathogenesis of various mouse models of retinal degeneration. Through our investigations, we discovered that targeting HIF could yield therapeutic benefits in these disease models. Additionally, we shed light on the potential molecular mechanism involving the HIF-1 /BNIP3 axis. Furthermore, our study involved a screening of a natural product library to identify potential HIF inhibitors. Remarkably, we found that various food-derived extracts exhibited significant HIF inhibitory activity. We subsequently evaluated the effects of several novel HIF inhibitors obtained from this screening process in mouse models of refractory retinal diseases. Encouragingly, our findings demonstrated the inhibitory effects of these compounds on retinal neurodegeneration and pathological angiogenesis.

研究分野：網膜変性

キーワード：低酸素誘導因子 Hypoxia-inducible Factor HIF 網膜変性 網膜病的血管新生 HIF-1 低酸素応答 網膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性や萎縮型加齢黄斑変性などの網膜変性疾患は、網膜視細胞死を特徴とする難治性網膜疾患である。現在までに、確立された治療法や予防法は存在せず、我が国における中途失明原因の20%超を占め、その社会的コストは20兆円とされている。現在までに、難治性網膜変性疾患に対する治療法として、iPS細胞由来組織を用いた再生医療や人工網膜を用いた視覚再生、遺伝子治療など様々な研究が行われている。しかし、いずれの治療法も臨床応用には至っておらず、早急な新規治療法の確立が求められている。

網膜変性疾患において視細胞が失われ網膜変性へと至る原因は、遺伝性(網膜色素変性)や加齢(加齢黄斑変性)網膜剥離、炎症性疾患(ぶどう膜炎)など様々であるが、その中で近年、低酸素誘導因子(Hypoxia-inducible Factor; HIF)の発現が網膜変性疾患の発生から病態生理にいたるまで重要な役割を担っていること、抗HIF療法が網膜変性疾患に対し治療的効果を有している可能性があることが明らかとなりつつある。本研究では、HIF経路の上流および下流分子群の網膜変性疾患に対する生物学的役割を探索し、抗HIF療法の治療効果を動物モデルで検討することにより、網膜変性疾患の根本的な病態メカニズムを明らかにし、さらに、新規治療法を開発することを目指す。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、HIF阻害剤の網膜変性疾患に対する有効性を検証することである。しかし、既知のHIF阻害剤には大きな欠点が存在する。それは、既知HIF阻害剤の多くは、抗がん剤であり、その毒性から眼科疾患に対する臨床応用が難しいという点である。そこで、本研究では、天然物ライブラリー、低分子化合物ライブラリーを用いたドラッグスクリーニングを行い、安全な新規HIF阻害剤の探索を行うことを第二の目的とする。そして、得られたより安全な新規HIF阻害剤の疾患抑制効果を検証することも本研究の課題としている。また、網膜変性疾患の発症から神経変性に至る過程における、低酸素応答の生物学的意義の解明という学術的な問いの解決も、本研究の重要な検討項目と考えている。

3. 研究の方法

本研究では、はじめに、種々の網膜疾患モデルマウス(具体的には、網膜色素変性症のモデル動物であるマウス網膜光障害モデル、緑内障のモデル動物であるマウス網膜虚血再灌流モデル、糖尿病網膜症や未熟児網膜症のモデル動物であるマウス酸素誘導網膜症モデル、加齢黄斑変性のモデル動物であるマウスレーザー誘発性脈絡膜新生血管モデル)における網膜神経変性や網膜病的血管新生に対する、既存のHIF阻害剤による疾患抑制効果を検証する。また、それらモデルマウスの病態形成におけるHIFの役割を検証するために、病態形成期やHIF阻害剤投与後など様々な病期のモデルマウスを用いて、ウエスタンブロッティングやPCRなどの分子生物学的な手法、光干渉断層計や病理組織学的検査などの手法、視覚誘発電位や網膜電図などの電気生理学的手法、明暗選択箱試験などの行動学的な手法を用いた解析を行う。さらに、神経網膜特異的にHIFをロックアウトした野生型マウス・網膜変性モデルマウスを用いて、網膜変性疾患病態形成におけるHIFの生物学的意義を検証する。

新規HIF阻害剤の探索のため、細胞ベースのHIF活性スクリーニング系(具体的には、HIF依存性-ホタル-Luciferaseと内在性コントロールCMV-ウミシイタケ-Luciferaseを共に遺伝子導入したマウス網膜錐体細胞株・マウス線維芽細胞株・ヒト網膜色素上皮細胞株を使用し、ホタルの発光物質であるルシフェリンを用いたレポーターアッセイ)を確立し、天然物ライブラリー・低分子化合物ライブラリーに対するドラッグスクリーニングを実施する。ここで得られた新規HIF阻害剤候補物質を、前述した種々の網膜疾患モデルマウスに投与し、疾患抑制効果や分子機序、有効な投与方法、投与量を検討する。

4. 研究成果

本研究では、これまでに、種々の難治性網膜疾患モデルマウス(レーザー誘発性脈絡膜新生血管モデルマウス、酸素誘導網膜症モデルマウス、網膜光障害モデルマウス、網膜虚血再灌流障害モデルマウス)の病態形成にHIFが関与している可能性があること、また、それら疾患モデルマウスにおいて抗HIF療法が治療的効果を有していることを報告している。また、治療的効果の分子機序としてHIF-1/BNIP3軸の関与、炎症の関与、PPAR/FGF21系の関与の可能性を報告した。また、新たな網膜疾患モデルマウスとして、片側総頸動脈閉塞(Unilateral common carotid artery occlusion: UCCA0)により、マウスにおいて簡便に慢性網膜低灌流モデルが作製できることを見出し、報告した。

天然物ライブラリーを用いたドラッグスクリーニングの結果、植物や魚類などの様々な食品由来抽出物にHIF阻害活性があることを見出し、特許申請を行った。また、あじさい抽出物に由来

する新規 HIF 阻害剤ハロフジノンについては、マウス網膜光障害モデルとマウス網膜虚血再灌流障害モデルにおける網膜神経変性の抑制効果を見出し報告した。さらに、数種のアジ科の魚類が HIF 阻害活性を有していることを見出し、魚類のもつ HIF 阻害活性に着目し検証を行った。静岡県水産技術研究所、静岡大学生物化学研究室（河岸洋和教授）と共同で研究を行い、魚類に含まれる HIF 阻害活性を有する有効成分の同定、活性物質の分画・精製を目指し、検討を行った結果、HIF 阻害活性を有する可能性のある候補物質を得ることができた。本研究で得られた食品由来新規 HIF 阻害物質は、その安全性の高さから日常的に摂取可能な機能性食品やサプリメントとしての可能性があり、またフードファクターとして日常の食事として摂取を行うことが可能であると考えられる。

本研究の成果は、機能性食品やサプリメントの開発、さらに長期的・最終的には医薬の開発も視野に入れることができると考えている。また、既存薬の低分子化合物ライブラリーを用いたドラッグスクリーニングからも、いくつかの新規 HIF 阻害剤候補物質を得ており、ドラッグリポジショニングによる早期の臨床応用の可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Lee Deokho, Nakai Ayaka, Miwa Yukihiro, Tomita Yohei, Serizawa Naho, Katada Yusaku, Hatanaka Yusuke, Tsubota Kazuo, Negishi Kazuno, Kurihara Toshihide	4. 巻 2021
2. 論文標題 Retinal Degeneration in a Murine Model of Retinal Ischemia by Unilateral Common Carotid Artery Occlusion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1~17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/7727648	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 Lee Deokho, Tomita Yohei, Jeong Heonuk, Miwa Yukihiro, Tsubota Kazuo, Negishi Kazuno, Kurihara Toshihide	4. 巻 22
2. 論文標題 Pemafibrate Prevents Retinal Dysfunction in a Mouse Model of Unilateral Common Carotid Artery Occlusion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9408~9408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22179408	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 Lee Deokho, Jeong Heonuk, Miwa Yukihiro, Shinojima Ari, Katada Yusaku, Tsubota Kazuo, Kurihara Toshihide	4. 巻 9
2. 論文標題 Retinal dysfunction induced in a mouse model of unilateral common carotid artery occlusion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e11665~e11665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.11665	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 Lee Deokho, Miwa Yukihiro, Kunimi Hiromitsu, Ibuki Mari, Shoda Chiho, Nakai Ayaka, Kurihara Toshihide	4. 巻 71
2. 論文標題 HIF Inhibition Therapy in Ocular Diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Keio Journal of Medicine	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） 10.2302/kjm.2021-0004-IR	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 Lee Deokho, Miwa Yukihiro, Jeong Heonuk, Ikeda Shin-ichi, Katada Yusaku, Tsubota Kazuo, Kurihara Toshihide	4. 巻 1
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 1-19
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lee Deokho, Miwa Yukihiro, Wu Jing, Shoda Chiho, Jeong Heonuk, Kawagishi Hirokazu, Tsubota Kazuo, Kurihara Toshihide	4. 巻 10
2. 論文標題 A Fairy Chemical Suppresses Retinal Angiogenesis as a HIF Inhibitor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1405 ~ 1405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10101405	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 Shoda Chiho, Miwa Yukihiro, Nimura Kazumi, Okamoto Kazutoshi, Yamagami Satoru, Tsubota Kazuo, Kurihara Toshihide	4. 巻 12
2. 論文標題 Hypoxia-Inducible Factor Inhibitors Derived from Marine Products Suppress a Murine Model of Neovascular Retinopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1055 ~ 1055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12041055	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 三輪 幸裕
2. 発表標題 HIF阻害剤ハロフジノンによるマウス網膜光障害モデルに対する治療的效果
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 三輪 幸裕
2. 発表標題 Protective effects of a HIF Inhibitor halofuginone on light-induced retinal damage via suppression of HIF/BNIP3 axis
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三輪 幸裕
2. 発表標題 魚類由来HIF阻害物質による網膜病的血管新生・神経変性に対する治療的效果
3. 学会等名 第41回比較眼科学会年次大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 低酸素誘導因子阻害剤	発明者 河岸洋和、呉静、栗原俊英、三輪幸裕、正田千穂、イドク	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、195345	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------