

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09758

研究課題名（和文）網膜色素上皮細胞における新規細胞死シグナルの検証

研究課題名（英文）Investigating a novel cell death signaling in retinal pigment epithelium

研究代表者

上田 高志（Ueta, Takashi）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90631573

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）：Glutathione peroxidase 4（GPx4）は生体膜中の過酸化リン脂質を直接還元できるユニークな酵素である。GPx4を網膜色素上皮（RPE）特異的に欠損させたマウス（GPx4 cKOマウス）をfloxマウスとAAV-Creベクターを用いて作成したところ、過酸化脂質の代謝産物の蓄積、急速なRPE変性を認め、光干渉断層計、免疫組織学的検証、電子顕微鏡等による検討で萎縮型加齢黄斑変性（dry AMD）の病理像と近似していた。RPEにおける過酸化脂質の蓄積により、後期AMDに観察されるような重篤なRPE変性が起こりうることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素上皮は視機能の維持に重要であるため、その異常は加齢黄斑変性を含む種々の網膜変性疾患につながり、重篤な視機能低下を来す可能性がある。これらの疾患の治療開発研究を行う上での問題点の1つとして、有用な動物モデルが少ない点が挙げられる。本研究ではGPx4という細胞膜にできた過酸化脂質を解毒する酵素に着目し、GPx4を網膜色素上皮特異的に欠損させたマウスを作製したところ、加齢黄斑変性によく似た眼症状を呈した。今後の治療開発研究を行う上で有用なマウスモデルと考えられるとともに、過酸化脂質の蓄積により重篤な網膜色素上皮変性を来たしうることが示された。

研究成果の概要（英文）：Glutathione peroxidase 4（GPx4）is a unique enzyme that can directly detoxify phospholipid peroxides in cell membranes. When mice in which GPx4 was specifically deleted in the retinal pigment epithelium（RPE）（GPx4 cKO mice）were created using flox mice and AAV-Cre vectors, they exhibited accumulation of lipid peroxide metabolites and rapid RPE degeneration. Examination using optical coherence tomography, immunohistochemistry, and electron microscopy showed that the pathological image resembled that of dry age-related macular degeneration（AMD）. It has become clear that lipid peroxide accumulation in the RPE can lead to severe RPE degeneration, as observed in late-stage AMD.

研究分野：眼科

キーワード：網膜色素上皮 過酸化脂質 抗酸化酵素 glutathione peroxidase 4

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

網膜色素上皮 (RPE) 細胞は視機能に重要な役割を果たし、その細胞死は萎縮型加齢黄斑変性 (dry age-related macular degeneration: dry AMD) をはじめとする網膜変性疾患に関与している。近年、補体活性阻害剤の臨床研究が行われ、進行抑制効果が報告されている一方で、治療開発研究のための動物疾患モデルが未確立であることが課題として存在する。例えば、NaIO<sub>3</sub> 投与モデルは、dry AMD を念頭に現時点で最も用いられる RPE 細胞死モデルであり、病態理解のための一助となっているが、薬物投与による急激な細胞死モデルがどこまで実際の病態を反映しているかには疑問の余地があり、他の選択肢の登場が待たれている。以上のような状況の中、最近、我々を含む国内外からの3つの研究報告によって、RPE 細胞死にフェロトーシスと呼ばれる新規細胞死機構が関わっていることが *in vitro* 実験によって明らかになった (PMID: 29988039, 31672277, 30171859)。

フェロトーシスは2012年に提唱された概念で、鉄と酸化脂質依存性の細胞死であり、他の細胞死機構とは独立した分子メカニズムを有することが明らかとなっている。フェロトーシスの分子メカニズム解明は現在も進行中であるが、glutathione peroxidase (GPx4) が主要な制御因子であることは初期より明らかになっていた。GPx4 はセレノプロテインの1つで、ユニークな点として、生体膜 (リン脂質2重膜) 内に形成された酸化脂質を還元できる、唯一の抗酸化酵素である。GPx4 は癌や虚血臓器障害をはじめとする多くの病態で注目され、ハイインパクトな医学研究報告が続いている。

### 2. 研究の目的

本研究ではマウス *in vivo* で RPE 特異的に GPx4 をノックアウトすることにより、新たな dry AMD モデルを確立することを目的としている。現状では汎用性のある dry AMD モデルが限られており、本研究成果によって dry AMD 治療開発の発展に寄与できる可能性がある。

### 3. 研究の方法

生後8週齢の GPx4<sup>flox/flox</sup> マウスに対して、AAV-Cre ベクターの網膜下注射を行う。RPE 特異的に Cre を発現させるために、Best1 プロモーターを有するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター (AAV-Best1-Cre) を用いる。Best1-Cre マウスとの交配を行うという方法も一般的によく用いられるが、Cre 発現細胞率にばらつきが大きいことと、本研究では特にアダルトマウスにおいて GPx4 を欠失させたかったため、Cre マウスではなく、AAV-Cre ベクターを用いた。Control として AAV-Best1-mCherry を用いた。

### 4. 研究成果

図1はRPEフラットマウントであるが、RPEでGPx4を欠失させたマウス (GPx4 cKO マウス) ではRPEの変性が観察された。control (GPx4<sup>flox/flox</sup> マウスに AAV-mCherry 投与) マウスや Cre control (wild-type マウスに AAV-Best1-Cre 投与) では変性を認めない。

図1

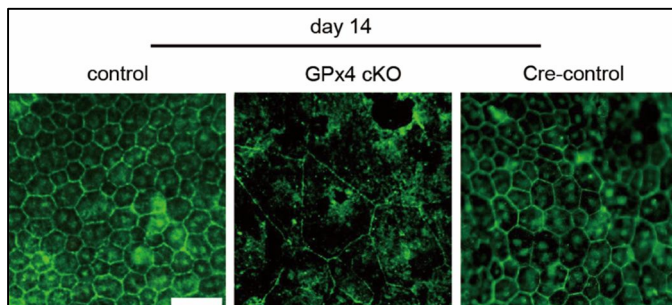


図2は光干渉断層計による網膜構造を示しているが、hyper reflective foci (赤矢印)、elipsoid zone (EZ) の消失、RPE 層や choriocapillaris (CC) の菲薄化を認め、進行過程の dry AMD

と共通する所見が得られた。

図 2

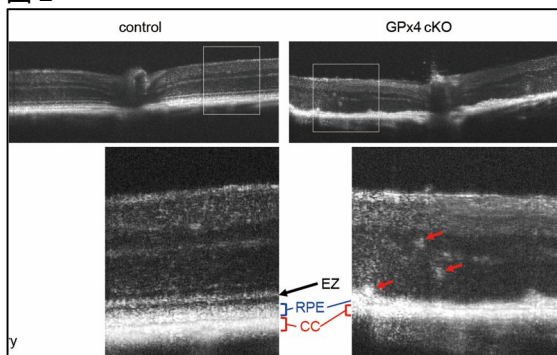
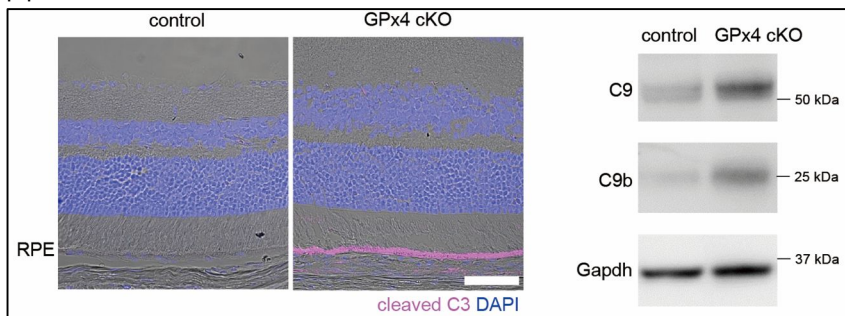


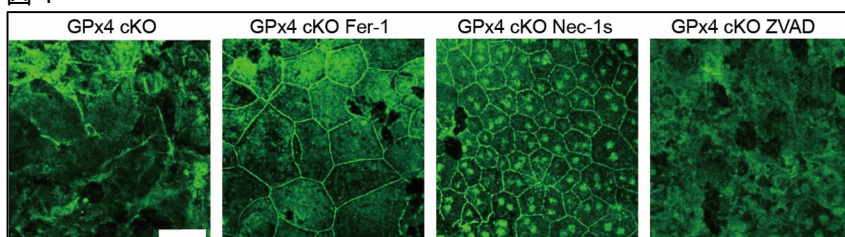
図 3 では、補体活性を検討するために cleaved C3 の免疫染色 (左) と C9 の western blot (RPE-choroid サンプル) を示しているが、いずれも補体の活性化を示しており、これも dry AMD との共通した所見と考えられた。

図 3



最後に、図 4 では、GPx4 cKO マウスにおける RPE 変性が、各種細胞死機構の阻害剤によって抑制されるかを検討したものであるが、フェロトーシスの阻害剤である ferrostatin-1 (Fer-1) やネクロプトーシスの阻害剤である necrostatin-1s (Nec-1s) によって抑制された一方で、caspase 阻害剤 (ZVAD) では抑制されなかった。

図 4



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Toyama Taku, Kawai Hisashi, Hashimoto Yohei, Azuma Kunihiro, Shiraya Tomoyasu, Numaga Jiro, Obuchi Shuichi, Ueta Takashi, OTASSHA Study Group	4. 巻 未定
2. 論文標題 Macular and peripapillary retinal nerve fiber layer thinning in eyes with prediabetes in the elderly population: OTASSHA study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00417-022-05925-x	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 Hayamizu Ryosuke, Totsuka Kiyohito, Azuma Kunihiro, Sugimoto Koichiro, Toyama Taku, Araki Fumiyuki, Shiraya Tomoyasu, Ueta Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Optical coherence tomography findings after surgery for sub-inner limiting membrane hemorrhage due to ruptured retinal arterial macroaneurysm	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-20949-3	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 Wang You, Toyama Taku, Hashimoto Yohei, Kawai Hisashi, Azuma Kunihiro, Shiraya Tomoyasu, Kato Satoshi, Watanabe Yutaka, Hirano Hirohiko, Fujiwara Yoshinori, Ihara Kazushige, Kim Hunkyung, Numaga Jiro, Obuchi Shuichi, Ueta Takashi	4. 巻 42
2. 論文標題 ASSOCIATION OF PREDIABETES WITH RETINAL MICROVASCULATURE ON SWEEP-SOURCE OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY ANGIOGRAPHY IN THE ELDERLY	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Retina	6. 最初と最後の頁 1130 ~ 1136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/IAE.0000000000003416	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 Hosoya Hironori, Ueta Takashi, Hirasawa Kazunori, Toyama Taku, Shiraya Tomoyasu	4. 巻 未定
2. 論文標題 Subthreshold micropulse laser combined with anti-vascular endothelial growth factor therapy for diabetic macular edema: a systematic review and meta-analysis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00417-024-06460-7	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東 邦洋、上田 高志、白矢 智靖、相原 一
2. 発表標題 網膜色素上皮特異的GPx4ノックアウトマウスの検証
3. 学会等名 第127回日本眼科学会総会
4. 発表年 2023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
研究協力者	東 邦洋  (Azuma Kunihiro)		
研究協力者	小林 憲太  (Kobayashi Kenta)  (70315662)		
研究協力者	相原 一  (Aihara Makoto)  (80222462)		

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