

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：3 2 6 1 2

研究種目：若手研究

研究期間：2021 ~ 2022

課題番号：2 1 K 1 6 9 0 6

研究課題名（和文）網膜内脂質代謝の制御による加齢黄斑変性の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）New therapeutic approach to treat Age-related Macular Degeneration by regulating lipid metabolism in the retinal tissue.

研究代表者

伴 紀充（Ban, Norimitsu）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：5 0 4 6 4 8 9 7

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）： 申請者らは、ABCA1遺伝子のプロモーター部分＋ルシフェラーゼのプラスミドを作成し、ヒト網膜色素上皮培養細胞（ARPE19）に導入し、この細胞を用いて慶應義塾大学医学部が保有する約1500種類の既存薬ライブラリーを用いてルシフェラーゼアッセイを行いABCA1 activatorのスクリーニングを施行した。候補薬剤についてin vitroおよびin vivoでの活性効果の確認を予定している。

また、申請者らは、病的血管新生モデル（レーザーCNVモデル）を作成し、380nm（紫）光照射群とコントロール群で血管新生体積の比較を行い、380nm（紫）光が血管新生に抑制的に作用することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性は先進国における失明原因の上位を占める。本研究は、膜輸送体で細胞内コレステロールの恒常性維持に重要な役割を持つABCA1（ATP-binding cassette protein A1）を介した加齢黄斑変性の病態の分子機序を明らかにし、さらに380nmの波長（紫）光によって活性化される非視覚受容体であるOpsin5（OPN5）の網膜内での機能を明らかにする。

本研究により、加齢黄斑変性の病態の分子機序が明らかになり、加齢黄斑変性の超早期段階から低侵襲で長期間介入することができる新規治療法の開発が可能となる。

研究成果の概要（英文）： We successfully introduced the promoter segment of the ABCA1 gene and luciferase into cultured human retinal pigment epithelial cells (ARPE19) and tested a vast array of pre-existing drugs owned by Keio University School of Medicine using these cells. Through our rigorous testing, we have identified several potential drugs that have shown positive effects in vitro.

Additionally, we created a laser CNV model to simulate pathological angiogenesis and compared the angiogenesis volume between the control group and the group exposed to 380 nm (violet) light. Our findings clearly indicate that 380 nm (violet) light has a significant inhibitory effect on pathological angiogenesis.

研究分野：網膜

キーワード：加齢黄斑変性 脂質代謝 脈絡膜新生血管

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は先進国における失明原因の上位を占め、網膜の中心部である黄斑部の脈絡膜新生血管を特徴とする滲出型と、黄斑部の地図状萎縮病巣とそれに伴う視細胞の喪失を特徴とする萎縮型が存在する。滲出型加齢黄斑変性に対しては、抗血管内皮増殖因子(VEGF)療法が唯一有効性の確認された薬物療法として用いられているが根治は難しく、萎縮型加齢黄斑変性に対しては現時点で有効な治療法が確立されていない。また、滲出型および萎縮型加齢黄斑変性は共通の前駆病変を持つが、それぞれの病型への進展要因は未だ不明の部分が多い。従って、前駆病変から滲出型・萎縮型への進行を予防する新規の治療法を確立するためには、加齢黄斑変性の詳細な病態生理の理解が必須であると考えられる。

申請者らは、加齢黄斑変性の前駆病変の中で最も特徴的な病変であるドルーゼンの主要成分が脂質であることに注目し、マクロファージ/マイクログリアを中心とした自然免疫細胞が網膜内で正常に機能することで網膜組織内の脂質代謝の恒常性が保たれることを明らかにした(Ban N et al. Impaired monocyte cholesterol clearance initiates age-related retinal degeneration and vision loss. *JCI Insight*. 2018 Sep 6;3(17)). さらに、網膜を構成する細胞(視細胞)の脂質代謝異常でも加齢黄斑変性様の表現型を得られることを示した(Ban N et al. Disrupted cholesterol metabolism promotes age-related photoreceptor neurodegeneration. *J Lipid Res*. 2018 Aug;59(8):1414-1423.)。また、その他の網膜を構成する細胞(網膜色素上皮細胞)の脂質代謝も同様に重要であることも報告されており、これらの知見から網膜内脂質代謝の異常が加齢黄斑変性の発症に関わることが強く示唆されており(Storti F et al. Impaired ABCA1/ABCG1-mediated lipid efflux in the mouse retinal pigment epithelium (RPE) leads to retinal degeneration. *Elife*. 2019 Mar 13;8:e45100.) 網膜内の脂質代謝を制御することで加齢黄斑変性の発症予防が可能であることが予想される。その際の最も有力なターゲット分子は膜輸送体で細胞内コレステロールの恒常性維持に重要な役割を持つ ABCA1 (ATP-binding cassette protein A1)であり、網膜組織内の ABCA1 を活性化することで加齢黄斑変性の病態を改善できる可能性がある。

また、本研究では光刺激(特に特定波長による光刺激)が加齢黄斑変性の病態に与える影響も解析するが、特に 380nm の波長(紫)光と、紫光によって活性化される非視覚受容体である Opn5 (OPN5) の網膜内での機能に注目する。OPN5 は網膜では網膜神経節細胞で主に発現しており、網膜内の局所概日周期の制御に重要であることが報告されているが(Buhr ED et al. Neuropsin (OPN5)-mediated photoentrainment of local circadian oscillators in mammalian retina and cornea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Oct 20;112(42):13093-8.)。最近になり OPN5 がドパミンを介して血管内皮増殖因子受容体(VEGFR2)を抑制することで光依存性に硝子体内の血管を退縮させる機序が明らかとなった(Nguyen MT et al. An opsin 5-dopamine pathway mediates light-dependent vascular development in the eye. *Nat Cell Biol*. 2019 Apr;21(4):420-429.)。これにより 380nm の波長(紫)光による OPN5 の活性化が眼球発生の生理的な血管退縮に必要であり、加齢黄斑変性の脈絡膜新生血管に対しても抑制的に働く可能性があることが示唆された。

また、網膜内では視細胞外節が脂質を多量に含む先端部分を周期的に放出(shedding)しそれらを網膜色素上皮細胞が貪食するサイクルを繰り返し、その周期は光周期に依存していることが知られているが、最近になりその貪食周期がドーパミン依存性であることが示され(Goyal V et al. Dopamine 2 Receptor Signaling Controls the Daily Burst in Phagocytic Activity

in the Mouse Retinal Pigment Epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2020 May 11;61(5):10. ) 380nm の波長 ( 紫 ) 光による OPN5 の活性化がドパミンを介して網膜色素上皮細胞の視細胞外節の貪食に伴う脂質の吸収に関連している可能性が高いと考えられる。これらの知見は 380nm の波長 ( 紫 ) 光により網膜色素上皮の視細胞外節の貪食のコントロールを介して網膜内脂質代謝を制御し得ることを示唆しており、本研究では OPN5 の網膜内での機能を明らかにすることにより「超」低侵襲治療である光刺激という新しい方法で網膜内脂質代謝を制御する方法を確立する。

## 2 . 研究の目的

本研究は、 ABCA1 (ATP-binding cassette protein A1) を介した加齢黄斑変性の病態の分子機序を明らかにする、 380nm の波長 ( 紫 ) 光によって活性化される非視覚受容体である Opsin5 (OPN5) の網膜内での機能を明らかにする、ことにより加齢黄斑変性の超早期段階から低侵襲で長期間に渡り介入することができる新規治療法の開発を目的とする。

これまでの研究から、網膜内組織における ABCA1 の活性化が加齢黄斑変性の治療および予防に有効であることが強く示唆されており、今回申請者らは慶應義塾大学医学部が保有する約 1500 種類の既存薬ライブラリーより ABCA1 を活性化し得る既存薬をスクリーニングする予定である。ABCA1 活性化剤の候補として、ABCA1 を含む脂質代謝関連遺伝子を制御する LXR (Liver X receptor) agonist があるが、全身副作用が強く実用化には至っていない。より ABCA1 特異的なスクリーニングを行い、さらに眼局所投与の可能性も探るところに本研究の独自性がある。また、非侵襲性という観点から光刺激による治療法は使用患者の負担軽減だけでなく予防を対象とした一般機器としての応用も可能であり、非視覚系光受容体 Opsin 5 (OPN5) を介した加齢黄斑変性に対する治療および予防の研究は、未来の医療機器につながる創造性のある研究である。

## 3 . 研究の方法

ABCA1 を介した加齢黄斑変性の病態の分子機序解明と新規治療法の開発

- 1) ABCA1 遺伝子のプロモーター部分 + ルシフェラーゼのプラスミドを作成し、レンチウイルスを用いてヒト網膜色素上皮培養細胞 (ARPE19) に導入する。
- 2) 1) で作成した細胞を用いて慶應義塾大学医学部が保有する約 1500 種類の既存薬ライブラリーを用いてルシフェラーゼアッセイを行い ABCA1 activator をスクリーニングする。
- 3) 候補薬剤の眼局所投与 (硝子体注射投与および点眼投与) での網膜透過性を質量分析法にて確認する。既存の LXR (Liver X receptor) agonist に関しても同様の検討を行う。
- 4) 病的血管新生モデル (レーザー CNV モデル) を用いて候補薬剤の効果を検証するとともに、網膜内での遺伝子変化を解析し ABCA1 活性化により血管新生が抑制される機序を解析する。

380nm の波長 ( 紫 ) 光によって活性化される非視覚受容体である Opsin5 (OPN5) の網膜内での機能の解明と加齢黄斑変性の新規治療の開発

- 1) C57B6 マウスを用いて 2 時間 / 日の 380nm ( 紫 ) 光の光照射を行い網膜内での遺伝子発現を解析、マウス網膜色素上皮細胞の視細胞外節の貪食の状態を解析、および質量分析法により脂質解析を行う。
- 2) 病的血管新生モデル (レーザー CNV モデル) を作成し、380nm ( 紫 ) 光の光照射群とコントロール群で血管新生体積の比較を行う。
- 3) opn5<sup>flox/flox</sup> マウスを網膜や神経特異的 Cre と掛け合わせることによって OPN5 組織特異的欠

損マウスを作製し、OPN5 遺伝子発現制御解析を行う。

- 4) 2)で表現型があった場合に OPN5 組織特異的欠損マウスで同様の実験を行い、表現型の消失を確認する。

#### 4．研究成果

申請者らは研究計画のように、ABCA1遺伝子のプロモーター部分+ルシフェラーゼのプラスミドを作成し、ヒト網膜色素上皮培養細胞（ARPE19）に導入し、この細胞を用いて慶應義塾大学医学部が保有する約1500種類の既存薬ライブラリーを用いてルシフェラーゼアッセイを行い ABCA1 activatorのスクリーニングを施行した。現在いくつかの候補薬剤があり *in vitro*で活性効果を確認したが、今後は *in vivo*での活性効果の確認および病的血管新生モデル（レーザーCNVモデル）での抑制効果の確認を行う予定である。

また、申請者らは研究計画のように、病的血管新生モデル（レーザーCNVモデル）を作成し、380nm（紫）光照射群とコントロール群で血管新生体積の比較を行い、380nm（紫）光が血管新生に抑制的に作用することを見出した。今後は *in vivo*での抑制効果の再現性の確認を行うとともに抑制効果の分子生物学的機序を解明する予定である。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 伴 紀充
2．発表標題 網膜内脂質代謝と加齢黄斑変性
3．学会等名 第41回日本眼薬理学会（招待講演）
4．発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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