

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592616

研究課題名(和文) 視細胞保護を目指した新たな分子標的療法の研究

研究課題名(英文) Research for new treatments for targeting photoreceptor protection

研究代表者

中澤 満 (Nakazawa, Mitsuru)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80180272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性に代表される遺伝性網膜変性疾患の多くは視細胞に特異的に発現する遺伝子の変異によって発症する。遺伝子変異によって最終的に視細胞が細胞死を起こすことが本疾患群の根本的な病態であるが、その視細胞死にはほぼ直接的に関わる酵素としてカルパインがあることを申請者は明らかにした。さらに各種カルパインのなかでもミトコンドリアに局在するカルパイン-1がアポトーシス誘導因子を活性化させることも判明した。本研究ではこのカルパイン-1を特異的に阻害するペプチドを合成し、網膜色素変性モデルラットへ点眼することにより変性進行を抑制させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Retinitis pigmentosa is a group of hereditary retinal degenerations that are primarily caused by mutations of retina-specific genes. Mutations of retina-specific genes eventually cause photoreceptor death, in which calpains play important roles. Among calpain family, I have clarified that mitochondria-specific calpain-1 activates apoptosis inducing factor and leads to apoptosis. In this study, I synthesized a peptide (10 amino acid fragment) that specifically inhibit mitochondrial calpain-1 and clarified that the peptide effectively suppressed the progression of photoreceptor apoptosis by instillation to retinitis pigments model rats as eye drop.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素変性 カルパイン 視細胞死 点眼療法 RCSラット ロドプシン

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は遺伝性の視細胞変性を主体とする網膜変性疾患であり、これまでのところ有効な治療法は開発されていない。視細胞変性は多くの場合、視細胞に特異的に発現する遺伝子の変異によって、視細胞に変調をきたし、最終的に視細胞死機構が働くことにより網膜全体の変性へとつながることが判明している。視細胞死機構には様々な反応経路が存在することが分かかってきており、申請者らもこれまでに視細胞内ミトコンドリアに存在するカルパイン-1 がアポトーシス誘導因子 (AIF) を活性化することによって細胞死の反応を促進させていることを明らかにしてきた。また、連携研究者の尾崎らはミトコンドリアカルパイン-1 を特異的に競合阻害する 10 アミノ酸ペプチドを合成したことを受け、このペプチド (カルパイン阻害ペプチド) が網膜色素変性の新たな分子標的療法として応用可能ではないかとの発想から本研究を着想することとなった。

2. 研究の目的

(1) カルパイン阻害ペプチドの RCS ラット網膜変性への効果

網膜色素変性の原因遺伝子変異は実際には 80 種類以上発見されているが、その 1 つをヒトと共有しているラットでのモデルに RCS (Royal College of Surgeons)ラットがある。この RCS ラットを用いて、ペプチドを点眼することにより、RCS ラットでの網膜変性の進行を阻害できるか否かを組織学および電気生理学的に検討する。

(2) カルパイン阻害ペプチドのロドプシントランスジェニックラット網膜変性への効果

前述のように網膜色素変性の原因遺伝子は少なくとも 80 種類あり、したがって視細胞変性過程にも多様性があることが予測される。RCS ラット網膜変性モデルだけでは必ずしもヒト臨床でみる網膜色素変性の分子機構の全てを網羅することはできない、との発想からロドプシン遺伝子のトランスジェニックラットについてもカルパイン阻害ペプチドの効果が同様に点眼投与によっても認められるかどうかをロドプシン遺伝子 P23H よび S334ter という 2 つの異なるトランスジェニックラットによって、(1) 同様電気生理学および形態学的に検討する。

(3) カルパイン阻害ペプチドの点眼によるラット網膜への送達

カルパイン阻害ペプチドをラットに点眼した場合どのような送達経路をとり、眼内での薬物動態がどのようになっているのかを知ることは将来のヒトへの点眼投与が実現した場合にも大変重要な情報となる。本研究ではこの点を明らかにすることを目的として、Sprague-Downy (SD) ラットを用いて

カルパイン阻害ペプチドを点眼投与し、点眼後の眼組織内での分布を免疫組織化学的手法と定量的測定によって明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) カルパイン阻害ペプチドの RCS ラット網膜変性への効果

生後 14 日目から 27 日目までの間、RCS ラット片眼に 40mM カルパイン阻害ペプチドを 1 日 2 回点眼した。非点眼眼を対照眼とした。生後 28 日目に両眼の網膜電図を測定した後、安楽死させ両眼眼球摘出を行った。摘出した眼球を組織標本として作製し、視細胞層や外顆粒層の厚さを計測するとともに TUNEL 染色を施し視細胞死の程度を比較検討した。

(2) カルパイン阻害ペプチドのロドプシン P23H トランスジェニックラット網膜変性への効果

カルパイン阻害ペプチドをロドプシン P23H トランスジェニックラットの片眼に生後 14 日目から 39 日目まで、同じく 49 日目まで、同じく 89 日目まで点眼し、それぞれ免疫組織化学 (39 日目)、TUNEL 染色 (49 日目)、および網膜電図と光学顕微鏡所見によりカルパイン阻害ペプチド点眼によるラット視細胞死への抑制効果を評価した。

(3) カルパイン阻害ペプチドのロドプシン S334ter トランスジェニックラット網膜変性への効果

カルパイン阻害ペプチドをロドプシン S334ter トランスジェニックラットの片眼に生後 13 日目から 17 日目まで点眼し、TUNEL 染色および網膜電図所見によりカルパイン阻害ペプチド点眼によるラット視細胞死への抑制効果を評価した。

(4) カルパイン阻害ペプチドのラットへの点眼による網膜への送達経路および薬物動態の検討

成熟 SD ラットの両眼に 1mM カルパイン阻害ペプチドを 1 日 2 回 1 週間連日点眼後安楽死させ、両眼とも眼球摘出とし、片眼を免疫組織化学、もう片眼を ELISA 用として形態学および生化学的にカルパイン阻害ペプチドの眼内移行経路と網膜内での濃度変化を観察した。

4. 研究成果

(1) カルパイン阻害ペプチドの RCS ラット網膜変性への効果

カルパイン阻害ペプチドの RCS ラットへの点眼投与により網膜電図の a 波振幅は 10000lux 光刺激で点眼群 $34 \pm 6 \mu\text{V}$ であったのに対し、対照群では $14 \pm 6 \mu\text{V}$ であり、両者の間には統計学的に有意な差がみられた。また b 波においても点眼群 $260 \pm 20 \mu\text{V}$

に対して対照群では $160 \pm 20 \mu\text{V}$ であり両者には統計学的に有意な差を認めた (図 1)。
 TUNEL 染色後の外顆粒層における TUNEL 陽性細胞数においてもカルパイン阻害ペプチド点眼群では $75 \pm 15 \text{ cells/field}$ であったのに対して、対照群では $155 \pm 20 \text{ cells/field}$ であり、点眼群にて統計学的に有意に細胞死が抑制されていた (図 2)。

図 1 カルパイン阻害ペプチド (HIV-N μ) 点眼の網膜電図への効果

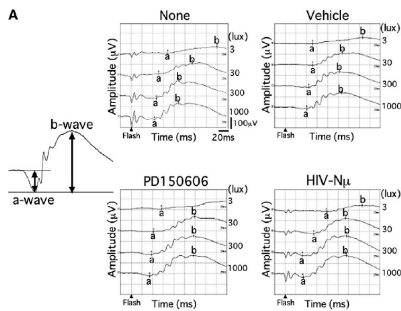
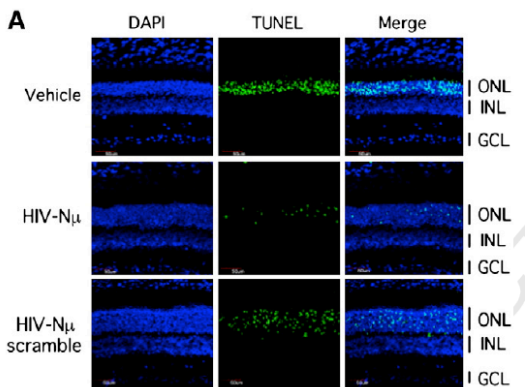


図 2 カルパイン阻害ペプチド (HIV-N μ) 点眼の視細胞死 (TUNEL 染色) への抑制効果



(2) カルパイン阻害ペプチドのロドプシン P23H トランスジェニックラット網膜変性への効果

P23H トランスジェニックラットにおいてもカルパイン阻害ペプチド点眼群と対照群との比較で、点眼群は TUNEL 染色 (図 3)、網膜電図 (図 4) および光学顕微鏡所見 (図 5) いずれにおいても対照群に比べて視細胞死を抑制している結果が得られた。

図 3-1 対照群での外顆粒層 TUNEL 染色像

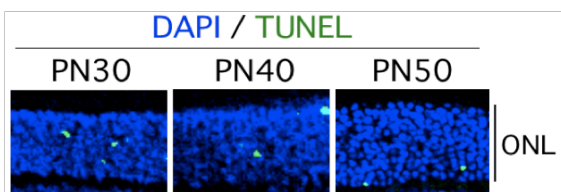


図 3-2 図 3-1 の続き: 点眼群での外顆粒層 TUNEL 染色像 (殆ど陰性となっている)

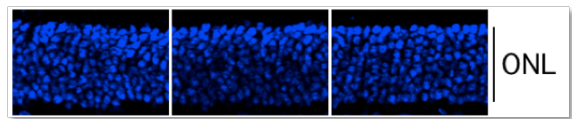


図 4 カルパイン阻害ペプチド点眼群 (太線) の網膜電図 a 波振幅 (細線は対照群)

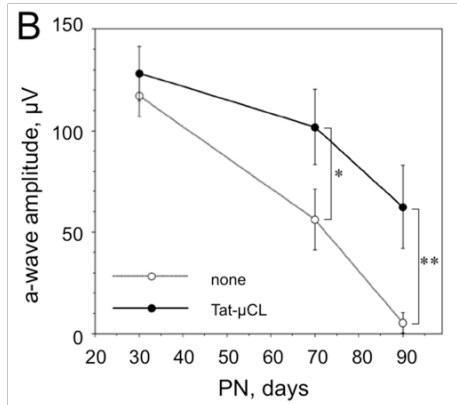
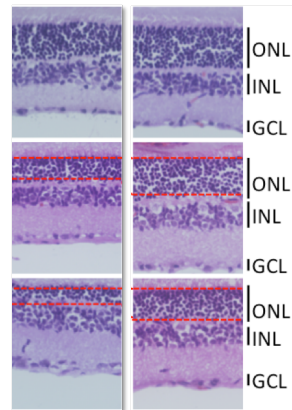


図 5 カルパイン阻害ペプチド点眼群網膜 (右) の光学顕微鏡所見。左は対照群。上段: 生後 30 日、中段: 生後 70 日、下段: 生後 90 日の所見



(3) カルパイン阻害ペプチドのロドプシン S334ter トランスジェニックラット網膜変性への効果

S334ter トランスジェニックラットにおいてもカルパイン阻害ペプチド点眼群と対照群との比較で、点眼群は TUNEL 染色 (図 6)、および網膜電図 (図 7) において対照群に比べて視細胞死を抑制している結果が得られた。

図6 点眼群（黒丸）は対照群（白丸）に比べて有意に網膜電図 a 波振幅が大きかった。

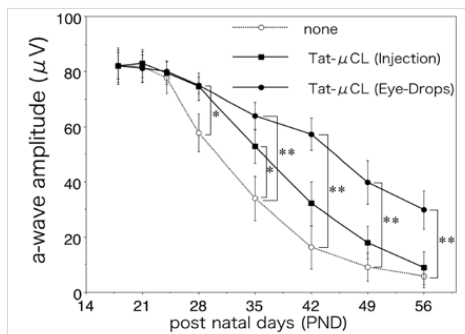
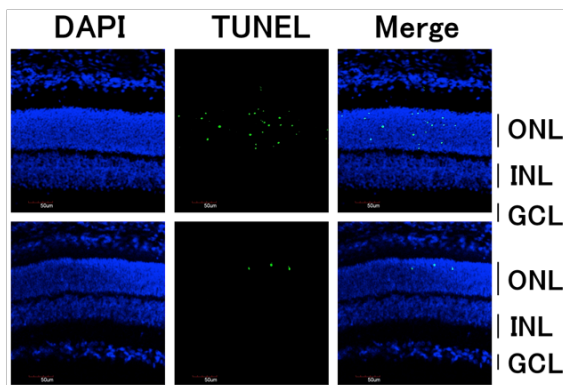


図7 上段は対照群、下段が点眼群。点眼群において TUNEL 陽性細胞が有意に少なかった。



(4) カルパイン阻害ペプチドのラットへの点眼による網膜への送達経路および薬物動態の検討

カルパイン阻害ペプチドの SD ラットへの点眼により、点眼後 1 時間にて網膜外層および視神経乳頭へのペプチド送達認められた。なお免疫反応は強膜外組織にても強陽性であり、網膜への送達は眼外から経強膜的に網膜や視神経に送達されることが示された。また、網膜内での免疫反応の強さや ELISA による定量実験の結果、点眼後 1 時間後にペプチドの網膜内濃度はピークとなり、以後 6 時間後までに急速に低下することが明らかになった。点眼 6 時間後での網膜内濃度は 290nM であり、これはこのペプチドのカルパイン活性に対する IC50 である 197nM よりも高い濃度であり、点眼 6 時間後においてもカルパイン活性を抑制できることを示している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Sato K, Ozaki T, Ishiguro S, Nakazawa M. M-opsin protein degradation is inhibited by

MG-132 in *RPE65*^{-/-} retinal explant. *Mol Vis* 18:1516-1525, 2012. 査読有り

2. Yamamoto S, Sugawara T, Murakami A, Nakazawa M, Nao-I N, Machida S, Wada Y, Mashima Y, Miyake Y.

Topical isopropyl unoprostone for retinitis pigmentosa: Microperimetric results of the Phase 2 clinical study. *Ophthalmology and Therapy* 1:5, 16 pages, 2012. DOI

10.1007/s40123-012-0005-9. 査読有り

3. Ozaki T, Nakazawa M, Yamashita T, Sorimachi H, Hata S, Tomita H, Baba A, Ishiguro S.

Intravitreal injection or topical eye-drop application of a μ -calpain C2L domain peptide protects against photoreceptor cell death in Royal College of Surgeons rats, a model of retinitis pigmentosa. *Biochim Biophys Acta – Molecular Basis of Disease* 1822, 1783-1795, 2012. 査読有り

4. Kudo T, Takeuchi K, Ebina Y, Nakazawa M.

Inhibitory effects of trehalose on malignant melanoma cell growth: implications for a novel topical anti-cancer agent on the ocular surface. *ISRN Ophthalmology* 2012 (2012), Article ID 968493, 9 pages,

doi:10.5402/2012/968493. 査読有り

5. Ozaki T, Nakazawa M, Yamashita T, Tomita H, Ebina Y, Ishiguro S.

Decrease of ATP by mitochondrial m-calpain inhibiting peptide. *Cell Structure and Function* 38(2), 205-231, 2013. Doi:10.1247/csf.13008. Epub 2013 Aug 20. 査読有り

6. Ozaki T, Ishiguro S, Itoh H, Nakazawa M, Yamashita T.

Cisplatin binding and inactivation of mitochondrial glutamate oxaloacetate transaminase in cisplatin-induced rat nephrotoxicity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2013, Aug 23;77(8):1645-9. Epub 2013 Aug 7. 査読有り

7. Ozaki T, Ishiguro S, Hirano S, Baba A, Yamashita T, Tomita H, Nakazawa M.

Inhibitory peptide of mitochondrial μ -calpain protects photoreceptor degeneration in rhodopsin transgenic S334ter and P23H rats. *PLoS One* 2013; (8): e71650. Doi:

10.1371/journal.pone.0071650. 査読有り

8. Nakazawa M, Suzuki Y, Ito T, Metoki T, Kudo T, Ohguro H.

Long-term effects of nilvadipine against progression of the central visual field defect in retinitis pigmentosa: An extended study. *Biomed Res Int* 2013; 2013:585729. Doi:

10.1155/585729. Epub 2013 Nov 12. 査読有り

9. Masahara H, Nakazawa M, Eguchi S.

Exclusion of influences of ARMS2 polymorphisms on the central visual field in

retinitis pigmentosa. *Ophthalmologica* 231 (1), 51-57, 2014. Doi: 10.1159/000355093. Epub2013 Nov 9. 査読有り

10. Suzuki Y, Suzuki K, Yokoi Y, Miyagawa Y, Metoki T, Nakazawa M. Effects of intravitreal injection of bevacizumab on inflammatory cytokines in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy. *Retina* 2014, 34(1), 165-171. 査読有り

11. Ozaki T, Nakazawa M, Kudo T, Hirano S, Suzuki K, Ishiguro S. Protection of cone photoreceptor M-opsin degeneration with 9-cis- β -carotene rich alga *Dunaliella bardawil* in Rpe65 $^{-/-}$ mouse retinal explant culture. *Curr Eye Res*, 39 (12), 1221-1231, 2014. DOI: 10.3109/02713683.2014.907430. 査読有り

12. Takeuchi K, Yanai R, Kumase F, Morizane Y, Suzuki J, Kayama M, Brodowska K, Nakazawa M, Miller JW, Connor KM, Vavvas DG. EGF-like-domain-7 is required for VEGF-induced Akt/ERK activation and vascular tube formation in an ex vivo angiogenesis assay. *PLoS ONE* 9(3): e91849, 2014. Doi:10.1371/journal.pone.0091849. 査読有り

13. Kudo T, Suzuki Y, Metoki T, Nakazawa M. A case of childhood vitrectomy to a dense vitreous hemorrhage secondary to leukemia therapy and tumor lysis syndrome. *Case Reports in Ophthalmology* 2015;6:34-38. DOI: 10.1159/000374088. 査読有り

14. Nakazawa M. Therapy options for retinitis pigmentosa. *Exp Opin Orphan Drug* 2(1):37-52, 2014. 11/2013. DOI:10.1517/21678707.2014.858596. 査読有り

15. Nakazawa M. New era for molecular diagnosis of retinitis pigmentosa: From research to therapy. Editorial. *Austin J Clin Ophthalmol* 1(4); 1019-1020, 2014. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

1. 中澤 満、尾崎 拓、川村英治、石黒誠一、山下哲郎 網膜色素変性モデルラットの視細胞変性に対するカルパイン阻害ペプチドの保護効果. 第 117 回日本眼科学会総会. 第 117 回日本眼科学会総会. 東京国際フォーラム. 2013. 4.4.-4.7.

2. Nakazawa M, Ozaki T, Ueno T, Ishiguro S, Yamashita T. Delivery of topically applied mitochondrial μ -calpain inhibitory peptide to retina. The 8th Congress of Asia-Pasific Vitreoretina Society & The 52th Annual Meeting of Japan Vitreoretina Society. December 5, Nagoya, Japan 2013

3. Nakazawa M, Ozaki T, Yamashita T, Ishiguro S. Delivery of topically applied mitochondrial μ -calpain inhibitory peptide to the rodent retina. WOC (World Congress of Ophthalmology) 2014, April 5, Tokyo, Japan 2014.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：新規ペプチドおよびその医薬用途
発明者：石黒誠一、尾崎 拓、中澤 満、山下哲郎
権利者：弘前大学、石黒誠一、尾崎 拓、中澤 満、岩手大学、山下哲郎
種類：特許
番号：特願 2012-191205
出願年月日：平成 24 年 8 月 31 日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等：弘前大学大学院医学研究科
眼科学教室ホームページ
<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~ophthal/consult.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中澤 満 (NAKAZAWA, Mitsuru)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80180272

(2) 連携研究者

尾崎 拓 (OZAKI, Taku)
弘前大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号：70621069