

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791850

研究課題名(和文) VCP 阻害剤による網膜色素変性症に対する治療法の開発

研究課題名(英文) Study for a new treatment for retinitis pigmentosa

研究代表者

池田 華子 (IKEDA, Hanako)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20372162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：神経保護作用の明らかになったVCP ATPase阻害剤が、網膜色素変性の新たな治療法となるか検討した。網膜色素変性モデルであるrd10マウス、および変異ロドプシントランスジェニックウサギにおいて、薬剤投与群では、網膜厚が有意に大きく、網膜電図の振幅も大きかった。遅発性の網膜色素変性モデルマウスであるrd12において、発症後である12カ月齢から薬剤投与を行っても、同様に網膜厚が厚く、網膜電図振幅も大きかった。以上より、新規VCP ATPase阻害剤は、網膜色素変性モデル動物において、形態・機能の両面から、視細胞保護作用があることが明らかになった。新たな神経保護治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We tried if VCP ATPase inhibitors would be a new treatment for retinitis pigmentosa. a. rd10, a model mouse for retinitis pigmentosa and rabbits having the mutated rhodopsin gene were used to try the neuroprotective effect of the inhibitors. In these animals, thickness of the retina was larger in the treated animals than in the non-treated ones. b-wave amplitudes of electroretinogram in the treated animals were larger than those in the non-treated animals. In rd12 mice, VCP ATPase inhibitors were administered after the age of 12 months, when the disease had progressed. In the elder rd12 mice, the thickness of the retina and the amplitudes of the b-wave were larger in the treated than in the non-treated mice. The newly synthesized VCP ATPase inhibitors would be a new neuroprotective treatment for retinitis pigmentosa.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：神経保護 網膜色素変性

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は、網膜の視細胞が変性脱落することにより視野欠損・視力障害をきたす疾患で、5000人に一人が罹患しているとされ、中途失明の主な原因の一つとなっている。視細胞や網膜色素上皮内で働きをもつ、種々の遺伝子変異によってひきおこされることが明らかになっている。近年、網膜色素変性の治療薬として、いくつかの薬剤が注目されつつあるが、未だ、著明な効果をしめすものはない。また、変性の進行した患者を対象とした再生医療の試みがなされているが、治癒には程遠く、また、進行予防こそが大切である。したがって、視細胞の変性・脱落を予防すべく、新しい観点からの治療法・治療薬の開発が切望されるところである。

網膜色素変性の病態としては、原因遺伝子の変異によってさまざまであるが、最終的に視細胞の機能不全および、細胞死をもたらされると考えられている。したがって、視細胞の機能不全・細胞死を抑制できれば、網膜色素変性進行を予防することができるはずである。

一方、京大生命科学研究所高次生体統御学講座で、長年研究対象としているVCP(valocin-containing protein) (*J. Biol. Chem.*, 285: 21736-21749, 2010) は、AAA (ATPase associated with various cellular activities) classのATPaseであり、細胞がストレスに反応して小胞体ストレス応答等を引き起こす過程で重要な働きをすると推測されている。当該研究室では、このVCPに対する阻害剤の合成・開発に成功しており、その中に、神経細胞に対して強い細胞死保護効果をもつものがいくつか見つかってきている。

近年、京都大学眼科学教室では、人での網膜・視神経の画像解析に力を入れており、光干渉断層計などにて、網膜各層の状況、厚さの経時変化がとらえられるようになっている。また、視細胞の外節・内節の接合部の描出の状態により、画像から、視機能を推測することも可能となっている。この手法を実験動物に応用することで、今まで組織切片を作成しないと分からなかった網膜の形態変化を、生体の状態で同一個体での経時変化として追うことが可能になる。また、網膜電図などの視機能検査もマウス・ウサギにおいて施行できることから、形態・機能の両面から神経保護効果を解析することが可能となっている。

2. 研究の目的

新規合成VCP ATPase阻害剤の中から視細胞障害を抑制する薬剤を決定し、網膜色素変性の進行予防効果があるかを明らかにすることを本研究の目的とした。具体的には、1) 動物用の光干渉断層計を用いて、網膜色素変性モデル動物において、薬剤効果判

定のできるイメージング法を確立する。網膜視細胞に保護作用をもつ薬剤を、マウス・ウサギモデルに投与するにあたって、同一個体での、視細胞の経時変化を見ることは、大変重要である。網膜色素変性モデルマウス・モデルウサギなどで、実際に視細胞層(外顆粒層や内節・外節接合部)の経時変化をとらえられるか検討する。

2) 網膜細胞・組織で保護効果が証明された薬物を、網膜色素変性モデルマウス・ウサギに投与することで、生体内で実際に疾患の進行予防ができるか否か検討する。

3. 研究の方法

1) 光干渉断層計を用いた、マウス・ウサギ視細胞の経時変化の検出法確立。

網膜色素変性モデルマウス・モデルウサギを用いて、視細胞層の菲薄化の経時変化を、画像としてとらえられるかを検討した。また、画像取得後に、実際に眼球摘出後、組織像と、光干渉断層計での網膜描写像とを比較し、今までの組織学的な評価と同等の評価が光干渉断層計でも可能かを検討した。

2) 網膜色素変性モデルマウスでの薬剤効果の判定。

視細胞保護効果の確認できた薬剤について、網膜色素変性モデルマウスへ投与し、視細胞の障害を抑制できるかを確認した。

網膜色素変性モデルとしては、まずは比較的視細胞変性が早いrd10マウスを使用した。薬剤を生後7日齢より毎日腹腔内投与し、生後21, 25, 29, 33日齢にて光干渉断層検査を行い、視細胞層をはじめ、網膜各層の経時変化を追うとともに、網膜電図検査にて視機能を評価した。視細胞層の厚みおよび視機能の両面から、コントロール生食投与群と比較してVCP ATPase阻害剤投与群で視細胞の障害が抑制されているか検討した。

3) 遅発性網膜色素変性モデルマウスでの薬剤効果の判定。

視細胞変性が緩徐におこる網膜色素変性モデルであるrd12に、発症後と考えられる生後12カ月齢から薬剤投与を試み、光干渉断層計にて、視細胞の減少抑制効果があるか、長期経過を見た。視機能に関しては、同様に、網膜電図検査にて検討した。

4) 網膜色素変性モデルウサギへの薬剤投与。

網膜色素変性モデルである変異ロドプシンのトランスジェニックウサギ (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50: 1371-1377, 2009) に薬剤投与を試みた。2, 3, 4カ月齢にて、光干渉断層計を用い、視細胞の減少抑制効果があるか、経過を見た。視機能に関しては、同様に、網膜電図検査にて検討した。

4. 研究成果

1) 光干渉断層計を用いた、マウス・ウサギ視細胞の経時変化の検出法確立。

光干渉断層計を用い、マウス・ウサギで外顆粒層や視細胞の外節・内節接合部が描写さ

れることを確認した。また、網膜色素変性モデルマウス・モデルウサギを用いて、視細胞層の菲薄化の経時変化を、画像としてとらえられることを確認した。

2) 網膜色素変性モデルマウスでの薬剤効果の判定。

網膜色素変性モデル rd10 マウスでは、薬剤投与群にて、経過観察期間で有意に網膜厚が保たれ、また、網膜電図での振幅が有意に大きかった。視細胞層の厚みおよび視機能の両面から、コントロール生食投与群と比較して VCP ATPase 阻害剤投与群で視細胞の障害が抑制されていることが確認できた。

3) 遅発性網膜色素変性モデルマウスでの薬剤効果の判定。

rd12 では、薬剤投与群にて、わずかではあるが、網膜の厚みが非投与群と比べて厚いことがわかった。また、明順応下での網膜電図 b 波振幅も、薬剤投与群で有意に保たれていた。つまり、進行期からの薬剤投与においても、VCP ATPase 阻害剤が、さらなる進行抑制効果を持つことが明らかになった。

4) 網膜色素変性モデルウサギへの薬剤投与。

変異ロドプシンのトランスジェニックウサギにおいて、薬剤投与群においては、有意に網膜電図の振幅が保たれ、また、網膜厚も保たれていた。

以上より、網膜色素変性モデル動物において、VCP ATPase 阻害剤が形態的にも視機能的にも保護作用を示すことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

- 1) Nukada, M., Hangai, M., Mori, S., Takayama, K., Nakano, N., Morooka, S., Ikeda, H. O., Akagi, T., Nonaka, A. & Yoshimura, N. Imaging of localized retinal nerve fiber layer defects in preperimetric glaucoma using spectral-domain optical coherence tomography. *J Glaucoma* 23, 150-159 (2014). doi: 10.1097/IJG.0b013e3182707456.
- 2) Hangai, M., Ikeda, H. O., Akagi, T. & Yoshimura, N. Paracentral scotoma in glaucoma detected by 10-2 but not by 24-2 perimetry. *Jpn J Ophthalmol* 58, 188-196 (2014). doi: 10.1007/s10384-013-0298-9.
- 3) Takayama, K., Ooto, S., Hangai, M., Ueda-Arakawa, N., Yoshida, S., Akagi, T., Ikeda, H. O., Nonaka, A., Hanebuchi, M., Inoue, T. & Yoshimura, N. High-resolution imaging of retinal nerve fiber bundles in glaucoma using adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy. *Am J Ophthalmol* 155, 870-881 (2013). doi: 10.1016/j.ajo.2012.11.016.
- 4) Takayama, K., Hangai, M., Kimura, Y., Morooka, S., Nukada, M., Akagi, T., Ikeda, H. O., Matsumoto, A. & Yoshimura, N. Three-dimensional imaging of lamina cribrosa defects in glaucoma using swept-source optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54, 4798-4807 (2013). doi: 10.1167/iovs.13-11677.
- 5) Nakano, N., Hangai, M., Noma, H., Nukada, M., Mori, S., Morooka, S., Takayama, K., Kimura, Y., Ikeda, H. O., Akagi, T. & Yoshimura, N. Macular imaging in highly myopic eyes with and without glaucoma. *Am J Ophthalmol* 156, 511-523 (2013). doi: 10.1016/j.ajo.2013.04.028.
- 6) Kimura, Y., Hangai, M., Matsumoto, A., Akagi, T., Ikeda, H. O., Ohkubo, S., Sugiyama, K., Iwase, A., Araie, M. & Yoshimura, N. Macular structure parameters as an automated indicator of paracentral scotoma in early glaucoma. *Am J Ophthalmol* 156, 907-917 (2013). doi: 10.1016/j.ajo.2013.06.029.
- 7) Akagi, T., Hangai, M., Kimura, Y., Ikeda, H. O., Nonaka, A., Matsumoto, A., Akiba, M. & Yoshimura, N. Peripapillary scleral deformation and retinal nerve fiber damage in high myopia assessed with swept-source optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol* 155, 927-936 (2013). doi: 10.1016/j.ajo.2012.12.014.
- 8) Takayama, K., Hangai, M., Durbin, M., Nakano, N., Morooka, S., Akagi, T., Ikeda, H. O. & Yoshimura, N. A novel method to detect local ganglion cell loss in early glaucoma using spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 6904-6913 (2012). doi: 10.1167/iovs.12-10210.
- 9) Muraoka, Y., Ikeda, H. O., Nakano, N., Hangai, M., Toda, Y., Okamoto-Furuta, K., Kohda, H., Kondo, M., Terasaki, H., Kakizuka, A. & Yoshimura, N. Real-time imaging of rabbit retina with retinal degeneration by using spectral-domain optical coherence tomography. *PLoS One* 7, e36135, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0036135.
- 10) Morooka, S., Hangai, M., Nukada, M., Nakano, N., Takayama, K., Kimura, Y., Akagi, T., Ikeda, H. O., Nonaka, A. & Yoshimura, N. Wide 3-dimensional macular ganglion cell complex imaging with spectral-domain optical coherence tomography in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 4805-4812 (2012). doi: 10.1167/iovs.12-9870.

- 11) Kimura, Y., Hangai, M., Morooka, S., Takayama, K., Nakano, N., Nukada, M., Ikeda, H. O., Akagi, T. & Yoshimura, N. Retinal nerve fiber layer defects in highly myopic eyes with early glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 6472-6478 (2012). doi: 10.1167/iovs.12-10319.

〔学会発表〕(計 1 1 件)

国内

- 1) 池田華子、中野紀子、村岡勇貴、長谷川智子、垣塚彰、吉村長久。VCP 阻害剤による網膜神経保護効果のメカニズム。日本眼科学会 1 1 7 回総会。東京国際フォーラム、2013 年 4 月 4 日。
- 2) 長谷川智子、池田華子、中野紀子、村岡勇貴、吉村長久。網膜変性モデルマウスの光干渉断層計、網膜電図、組織所見の比較。日本眼科学会 1 1 7 回総会。東京国際フォーラム、2013 年 4 月 5 日。
- 3) 池田華子。VCP 阻害剤による新規神経保護治療。第 17 回 眼科分子生物研究会。静岡焼津、2013 年 2 月 23 日。
- 4) 池田華子、中野紀子、村岡勇貴、吉村長久。VCP 阻害剤による新規神経保護治療。第 2 回 わかもと先進眼科医療研究会。東京ロイヤルパークホテル、2012 年 7 月 20 日。
- 5) 池田華子、中野紀子、村岡勇貴、板谷正紀、垣塚彰、吉村長久。VCP 阻害剤による網膜色素変性モデルマウスにおける神経保護効果の検討。日本眼科学会 1 1 6 回総会。東京国際フォーラム、2012 年 4 月 5 日。
- 6) 村岡勇貴、池田華子、中野紀子、板谷正紀、近藤峰生、寺崎浩子、吉村長久。ウサギ網膜色素変性症モデルにおける VCP 阻害剤の神経保護効果の検討。日本眼科学会 1 1 6 回総会。東京国際フォーラム、2012 年 4 月 5 日。

海外

- 7) Tomoko Hasegawa, Hanako O. Ikeda, Yuki Muraoka¹, Akira Kakizuka, Nagahisa Yoshimura. Neuroprotective effect of a valosin-containing-protein ATPase inhibitor on late-stage retinal degeneration in a mouse model. *World Ophthalmology Congress* 2014. Tokyo, 2014 年 4 月 5 日。
- 8) Yuki Muraoka, Hanako Ohashi Ikeda, Noriko Nakano, Tomoko Hasegawa, Kondo Mineo, Hiroko Terasaki, Akira Kakizuka, Nagahisa Yoshimura. A Novel Valosin-Containing Protein Inhibitor Suppresses Photoreceptor Degeneration in a Rabbit Model of Retinitis Pigmentosa. ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting 2013. Seattle, USA, 2013 年 5 月 5 日。

- 9) Tomoko Hasegawa, Hanako Ohashi Ikeda, Noriko Nakano, Yuki Muraoka, Akira Kakizuka, Nagahisa Yoshimura. Optical coherence tomography, electroretinography, and histological analysis of mouse models for retinal degeneration. ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting 2013. Seattle, USA, 2013 年 5 月 5 日。

シンポジウム

- 10) 池田華子。New neuroprotective treatment using novel VCP ATPase inhibitors for glaucoma. KU-KU symposium 2013. 京都、2013 年 9 月 17 日。
- 11) 池田華子。VCP 阻害剤による新規神経保護治療。日本眼科学会 1 1 7 回総会。東京国際フォーラム、2013 年 4 月 4 日。

〔講演〕(計 2 件)

- 1) 池田華子。新しい神経保護剤の開発—網膜色素変性モデル動物における VCP 阻害剤の効果。網膜色素変性症・医療講演会。大阪、2013 年 5 月 19 日。
- 2) 池田華子。新しい神経保護剤の開発—網膜色素変性モデル動物における VCP 阻害剤の効果—。第 8 回 JRPS 網脈絡膜変性フォーラム。名古屋ミッドランドスクエア、2012 年 10 月 7 日。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 「眼疾患処置薬」

発明者: 垣塚彰、池田華子、吉村長久、村岡勇貴。

権利者: 国立大学法人京都大学。

種類: PCT 出願

番号: PCT/JP2014/053898

出願年月日: 平成 26 年 2 月 19 日

国内外の別: 国外

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田華子 (IKEDA, Ohashi Hanako)

京都大学大学院・医学研究科・助教

研究者番号: 20372162

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし