

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861611

研究課題名(和文) 緑内障性神経節細胞死に対する新たな分子標的療法の研究

研究課題名(英文) Biochemical study of molecular target therapy for retinal ganglion cell death in glaucoma

研究代表者

尾崎 拓(Ozaki, Taku)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：70621069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： 緑内障は、視神経障害による視野欠損を特徴とする我が国における第1位の失明原因であり、加速する少子高齢化社会において、失明対策上最も重要な疾患である。本疾患は、高眼圧緑内障と正常眼圧緑内障に大きく分類されるが、我が国では全体の約7割が正常眼圧緑内障で占められる。従って、本疾患に対する効果的な治療薬を開発することは、世界レベルで重要な研究課題である。本研究では、視神経軸索障害モデル、虚血モデル、正常眼圧緑内障モデルなど各種緑内障モデル動物を用いて、網膜神経節細胞に対する新規ペプチド(Tat- $\mu$ CL)の効果を評価した。その結果、虚血モデルに対してTat- $\mu$ CLの効果が有意に観察された。

研究成果の概要(英文)： Glaucoma is a disease that damages the eye's optic nerve and retinal ganglion cells (RGC), resulting in vision loss and blindness. The purpose of the present study was to determine whether the inhibition of mitochondrial  $\mu$ -calpain protects the RGC in one of the animal models of glaucoma.

I used a well-established rat model of experimental acute glaucoma, ischemia/reperfusion injury. The specific peptide inhibitor of mitochondrial  $\mu$ -calpain, Tat- $\mu$ CL, was used for the topical eye-drop application. I applied eye-drops containing 1 mM Tat- $\mu$ CL to rats three times a day for 5 days after I/R. RGC death was determined by TUNEL assay. The change of retinal function was examined by electroretinogram (ERG).

Eye-drop application of Tat- $\mu$ CL significantly prevented the RGC death. The Tat- $\mu$ CL significantly inhibited the decrease of RGC. In addition, both a- and b-wave in ERG were attenuated after I/R, but the eye-drop application of Tat- $\mu$ CL significantly recovered the attenuation.

研究分野：細胞生化学

キーワード： 緑内障 網膜 網膜神経節細胞 アポトーシス ペプチド医薬 ミトコンドリア カルパイン アポトーシス誘導因子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 緑内障は、視神経障害による視野欠損を特徴とする我が国における第1位の失明原因であり、加速する少子高齢化社会において、失明対策上最も重要な疾患である。本疾患は、高眼圧緑内障と正常眼圧緑内障に大きく分類される。高眼圧緑内障の治療に対しては眼圧を下降させる点眼剤が広く使用され、視野障害の進行を遅延させることができるが、患者によっては全く効果がない場合もある。さらに我が国では全体の約7割が正常眼圧緑内障で占められることなどから、正常眼圧緑内障における網膜変性機構を解明し、より効果的な治療薬および治療法を開発することは、世界レベルで非常に重要な研究課題である。

(2) 申請者らは以前の研究で、網膜色素変性症モデル動物の1つである RCS (Royal College of Surgeon's) ラットの網膜変性にミトコンドリアカルパインおよび AIF が関与していること、ミトコンドリアカルパインが活性化する変性初期にカルパイン阻害剤を硝子体内投与することによって、視細胞死が有意に抑制されることを見出した。この結果は網膜視細胞変性に対して、カルパイン特にミトコンドリアに存在するカルパインを分子標的とする全く新しい治療法の可能性を示唆するものであった。哺乳類において14種類存在する全てのカルパインを阻害した場合、細胞の機能が保持されなくなるといった懸念があったため、申請者らはミトコンドリアカルパインを特異的に阻害するペプチドを探索した。ミトコンドリアには少なくとも  $\mu$ -カルパインと m-カルパインの2種が存在し、各々 ERp57 と Grp75 といった分子シャペロンと結合することで安定化し、さらに2種のカルパインは協調的にアポトーシス誘導因子 (AIF: Apoptosis-Inducing Factor) 依存的な細胞死を制御している。申請者らは最近、ミトコンドリアカルパインを不安定化および不活性化させる Tat- $\mu$ CL を同定し、それが AIF の活性化を阻害すること、RCS ラットへの硝子体内投与または点眼によって視細胞死を著しく阻害すること、さらには視機能低下を有意に抑制することを見出した。また、他の視細胞変性症モデル動物であるロドプシン変異 S334ter および P23H ラットにおいても、Tat- $\mu$ CL の硝子体内投与または点眼によって顕著に視細胞死を阻害することが明らかとなった。そこで本研究では、網膜色素変性症のみにとどまらず緑内障に対する治療薬としての Tat- $\mu$ CL の有効性を明らかにし、主要な眼疾患の治療法としての Tat- $\mu$ CL 硝子体内投与および点眼の重要性を評価することを目的とする。

## 2. 研究の目的

本研究では、高眼圧緑内障モデル動物 (視神経軸索障害モデルおよび虚血モデル) のみならず、世界で唯一の正常眼圧緑内障モデル動物であるグルタミン酸輸送体 (GLAST) 欠損マウスを用いて、網膜神経節細胞死に対する Tat- $\mu$ CL の抑制効果を評価することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 正常眼圧緑内障モデル GLAST 欠損マウスにおける神経節細胞死誘導機構の解明

GLAST 欠損マウスにおいては、グルタミン酸の過剰放出に伴う興奮毒性が生じ、細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇が起こっていると考えられているため、ミトコンドリアカルパイン-AIF 経路が神経節細胞死の主たる経路であると予想される。従って、GLAST 欠損マウスを用いてミトコンドリアカルパイン-AIF 経路が神経節細胞死に寄与しているかどうかを形態学的、生化学的、電気生理学および分子生物学的に評価する。

① GLAST 欠損マウスの網膜凍結切片を作製することにより、TUNEL 法およびヘマトキシリン・エオシン染色によって経時的に神経節細胞死を評価する。さらに AIF の活性化に伴う核移行が誘導されているのか免疫組織化学的手法を用いて評価する。

② GLAST 欠損マウスの網膜から可溶性画分に含まれるタンパク質および RNA を抽出し、カルパインおよび AIF の活性化が起こっているのか生化学的に評価する。また、それらの遺伝子発現の変化を分子生物学的に評価する。

(2) GLAST 欠損マウスおよび虚血モデルラットに対する Tat- $\mu$ CL の網膜保護効果の評価

GLAST 欠損マウスおよび虚血モデルラットにおける神経節細胞死に対して Tat- $\mu$ CL の硝子体内投与または点眼が有効であるか否かを評価する。

① 各モデル動物に Tat- $\mu$ CL を硝子体内投与または点眼 (1日 2-6回) を施す。対照群として、非投与群、基剤 (生理食塩水) 投与群および Tat- $\mu$ CL ランダムペプチド投与群を用いる。

② Tat- $\mu$ CL の硝子体内投与または点眼を施したモデル動物の視機能レベルを網膜電図により測定し、各投与群で比較する。

③ 眼球を摘出し網膜の組織切片を作製し、網膜厚をヘマトキシリン・エオシン染色によって観察し、Tat- $\mu$ CL 投与群と他の投与群で比較する。

④ 網膜の組織切片を用いた TUNEL 法によりアポトーシスを起こした神経節細胞を検出し、Tat- $\mu$ CL 投与群と他の投与群で比較する。

#### 4. 研究成果

研究の方法に対応して以下に記載した。

##### (1) 正常眼圧緑内障モデル GLAST 欠損マウスにおける神経節細胞死誘導機構の解明

GLAST 欠損マウスの網膜では、経時的に神経節細胞死と双極細胞死が観察された。また、網膜の菲薄化も見られた。一方で、AIFの核への移行は観察できなかった。また、GLAST 欠損マウスの網膜では、カルパインならびに AIF のタンパク質量と RNA 量において、経時的な変化は見られず、ミトコンドリアカルパインの活性も変化していなかった。この結果から、GLAST 欠損マウスでは、ミトコンドリアカルパインと AIF を介した神経節細胞死が起こっているのではなく、細胞死経路を介して神経節細胞が変性する可能性が示唆された。

##### (2) GLAST 欠損マウスおよび虚血モデルラットに対する Tat- $\mu$ CL の網膜保護効果の評価

GLAST 欠損マウスに対する Tat- $\mu$ CL の点眼処置により、神経節細胞死を抑えることはできず、Tat- $\mu$ CL の網膜保護効果は認められなかった。

一方、高眼圧虚血モデルラットにおいては、Tat- $\mu$ CL の点眼処置により神経節細胞死を有意に抑制することができた。それに伴って、神経節細胞数の減少を有意に抑制することが確認された。本モデルでは、AIF の限定分解（活性化）が起こることも分かり、Tat- $\mu$ CL の点眼処置によりその限定分解を有意に抑えることが確認された。（これらの研究成果については、国際誌に投稿中のためデータの掲載を差し控えさせていただきます。）

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 9 件）

① Ozaki T, Nakazawa M, Yamashita T, Ishiguro S. Delivery of topically applied calpain inhibitory peptide to the posterior segment of the rat eye. *PLoS One* 10(6), e0130986, 2015. 査読有

② Itoh K, Ye P, Matsumiya T, Tanji K, Ozaki T. Emerging functional cross-talk between the Keap1- Nrf2 system and mitochondria. *Journal of Clinical Biochemistry Nutrition* 56(2), 91-97, 2015. 査読有

③ Ozaki T, Nakazawa M, Kudo T, Hirano S, Suzuki K, Ishiguro S. Protection of cone photoreceptor M-opsin degradation with 9-cis- $\beta$ -carotene-rich alga *Dunaliella bardawil* in *Rpe65*<sup>-/-</sup> mouse retinal explant culture. *Current Eye Research* 39(12), 1221-1231, 2014. 査読有

④ Tanji K, Miki Y, Ozaki T, Maruyama A, Yoshida H, Mimura J, Matsumiya T, Mori F, Imaizumi T, Itoh K, Kakita A, Takahashi H,

Wakabayashi K. Phosphorylation of serine 349 of p62 in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathologica Communications* 2, 50, 2014. 査読有

⑤ Tomita H, Sugano E, Murayama N, Ozaki T, Nishiyama F, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Tamai M. Restoration of the majority of the visual spectrum by using modified Volvox channelrhodopsin-1. *Molecular Therapy* 22(8), 1434-40, 2014. 査読有

⑥ Ito R, Matsumiya T, Kon T, Narita N, Kubota K, Sakaki H, Ozaki T, Imaizumi T, Kobayashi W, Kimura H. Periosteum-derived cells respond to mechanical stretch and activate Wnt and BMP signaling pathways. *Biomedical Research* 35(1), 69-79, 2014. 査読有

⑦ Ozaki T, Nakazawa M, Yamashita T, Tomita H, Ebina Y, Ishiguro S. Decrease of ATP by mitochondrial m-calpain inhibitory peptide in the rat retinas. *Cell Structure and Function* 38(2), 205-221, 2013. 査読有

⑧ Ozaki T, Ishiguro S, Hirano S, Baba A, Yamashita T, Tomita H, Nakazawa M. Inhibitory peptide of mitochondrial  $\mu$ -calpain protects against photoreceptor degeneration in rhodopsin transgenic S334ter and P23H rats. *PLoS One* 8(8), e71650, 2013. 査読有

⑨ Ozaki T, Ishiguro S, Itoh H, Furuhashi K, Nakazawa M, Yamashita T. Cisplatin binding and inactivation of mitochondrial glutamate oxaloacetate transaminase in cisplatin-induced rat nephrotoxicity. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 77(8), 1645-1649, 2013. 査読有

〔学会発表〕（計 6 件）

① 中澤 満, 尾崎 拓, 目時友美, 安達功武, 高橋 静, 石黒誠一, 山下哲郎. ミトコンドリア・カルパイン-1 阻害ペプチド点眼のウサギ網膜への送達. 第 34 回日本眼薬理学会. 2014 年 9 月 13 日~14 日, 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市) .

② Mitsuru Nakazawa, Taku Ozaki, Takato Ueno, Sei-ichi Ishiguro, Tetsuro Yamashita. Delivery of topically applied mitochondrial calpain-1 inhibitory peptide to the rodent retina., World Ophthalmology Congress 2014, April 2-6, 2014, Tokyo International Forum, Tokyo.

③ Mitsuru Nakazawa, Taku Ozaki, Takato Ueno, Sei-ichi Ishiguro, Tetsuro Yamashita. Delivery of topically applied mitochondrial  $\mu$ -calpain inhibitory peptide to the retina. The 8<sup>th</sup> Congress of Asia-Pacific Vitreo-Retina Society Congress. December 6-8, 2013. Nagoya Congress Center, Nagoya.

④ Taku Ozaki, Tetsuro Yamashita, Mitsuru Nakazawa, Sei-ichi Ishiguro. ERp57 and GRP75 associate with mitochondrial calpains and modulate AIF-dependent apoptotic pathways in the ocular diseases. 国際ミニシンポジウム Protein Folding and Disease". October 29-30,

2013. Akita View Hotel, Akita.

⑤ 上野嵩登, 尾崎 拓, 中澤 満, 山下哲郎, 石黒誠一. 網膜視細胞変性を抑制するペプチドの点眼による網膜への送達経路. 日本動物学会 第 84 回岡山大会. 2013 年 9 月 26 日~27 日. 岡山大学 (岡山県・岡山市)

⑥ 尾崎 拓, 石黒誠一, 伊藤 優, 山下哲郎, 中澤 満. ミトコンドリア  $\mu$ -カルパイン阻害による虚血性網膜神経節細胞死の保護. 第 86 回日本生化学会. 2013 年 9 月 11 日~13 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

## 6. 研究組織

研究代表者

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