

令和 4 年 10 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861455

研究課題名(和文) 網膜色素変性における慢性炎症機構の解明と新たな治療戦略の確立

研究課題名(英文) Investigation of the chronic inflammatory mechanisms and development of a new therapeutic strategy in Retinitis Pigmentosa

研究代表者

吉田 倫子 (Yoshida, Noriko)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：70725853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性(RP)の病態には、中枢神経系のマクロファージであるマイクログリアの活性化とそれに付随する慢性炎症の関与が示唆されている。マイクログリアは周囲の刺激因子に応じて「炎症促進型(M1)」又は「抗炎症型(M2)」へと分化する。本研究では、RPモデルマウスを用いて、変性網膜における各マクロファージサブセットマーカーの発現量及び局在について検証した。その結果、RPモデルマウス網膜ではM2よりもM1マーカーの発現量が優位であることや、網膜変性過程において各マクロファージマーカーの発現量は徐々に減少することを確認した。さらに、M2の分化促進作用を有するスタチンの視細胞保護効果について検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性(RP)は有効な治療法が確立されていない遺伝性の網膜変性疾患である。我々は、原因遺伝子に依存しないRPに共通した病態として、慢性炎症の網膜変性への関与を報告してきた。本研究では、RPモデルマウス網膜では炎症促進型マクロファージが活性化しており、網膜変性早期における網膜の慢性炎症の誘導に関与している可能性を明らかにした。また、抗炎症作用などの多面的効果を有するピタバスタチンをRPモデルマウスに投与して網膜マクロファージ活性化の抑制や視細胞保護効果を検証し、新たな治療薬としての可能性を確認した。

研究成果の概要(英文)：Microglial activation and the consequent chronic inflammation have been implicated in the pathogenesis of Retinitis Pigmentosa (RP). Microglial cells differentiate into "pro-inflammatory (M1)" or "anti-inflammatory (M2)" subsets depending on surrounding microenvironmental factors. In this study, we investigated the level and localization of each microglial subset in the degenerating retina, using rd10 mice, a mouse model of RP. We found that the level of M1 markers was significantly increased compared to M2 markers in the retina of rd10 mice, and the level of each macrophage markers was gradually decreased during retinal degeneration. Furthermore, we investigated the neuroprotective effect of statin that promotes the microglial differentiation into M2 phenotype.

研究分野：網膜

キーワード：慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性(Retinitis Pigmentosa: RP)は、未だ有効な治療法が確立されていない遺伝性の網膜変性疾患で、我が国で約3万人の患者が罹患している。これまでに50種類以上もの原因遺伝子が同定されているものの、これらの原因遺伝子によってなぜ、またどのようにして視細胞死が引き起こされるかは不明な点が多い。また最新の遺伝子診断技術を用いても、半数以上の患者で原因遺伝子を同定できないのが現状である。そこで我々は、原因遺伝子に依存しないRPに共通した病態を解明し、そのメカニズムに則した治療法を開発することが重要な課題と考えている。

RPにおける炎症は、従来視細胞死に続いて起こる生体反応として、あまり注目されてこなかった。しかし、最近の我々の研究から、RP患者の眼内には慢性的な炎症反応が認められ、病気の進行や視機能との関連を認めることが明らかとなった(文献1)。またRPモデル動物の解析から、網膜変性のごく早期から炎症の活性化を認めること、抗酸化剤による眼炎症への介入により視細胞保護効果が得られることを報告した(文献2)。これらの結果から、網膜の慢性炎症は、RPの病態進行に積極的に関与している可能性が示唆された。

マクロファージは様々な慢性炎症反応に関与しており、RP患者においても眼内への浸潤が観察されている。マクロファージには機能的に異なる2つのサブセットが存在し、周囲の刺激因子に応じて「炎症促進型」のM1マクロファージと「抗炎症型」のM2マクロファージへと分化することが知られている(文献3)。M1及びM2マクロファージは、それぞれ動脈硬化やアレルギー性疾患などへ関与することが知られているものの、RPへの関与についてはこれまでに検討がない。

HMG-CoA還元酵素阻害剤であるスタチンは、脂質低下作用に加えて、抗炎症作用などの多面的効果を有することが知られている。近年の研究から、スタチンの抗炎症作用にはM1マクロファージへの分化抑制や、M2マクロファージへの分化促進が関与していることが報告されている(文献4、5)。

このような背景から、我々はM1及びM2マクロファージの動態ならびにスタチンのM2分化促進作用に着目し、RPにおける慢性炎症の役割について研究を進めることとした。

<参考文献>

1. Yoshida N, et al. Ophthalmology 2013;120:100-5.
2. Yoshida N, et al. Ophthalmology 2013;120:e5-12.
3. Miron VE, et al. Nat Neurosci 2013;16:1211-8.
4. Youssef S, et al. Nature 2002;420:78-84.
5. Fujita E, et al. Am J Pathol 2010;177:1143-54.

2. 研究の目的

本研究では、RPにおける慢性炎症の分子機構を明らかにするため、M1及びM2マクロファージに着目し、その動態についてRPモデル動物を用いて検討する。また、M2分化促進作用を有するスタチンの抗炎症作用及び視細胞保護作用について検討し、RPに対する新たな治療戦略の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) RPモデル動物におけるM1及びM2マクロファージの動態と病態への関与

rd10マウス(Background: C57BL/6)は自然発症のRPモデル動物で、Pde6b遺伝子のミスセンス変異によって発症する。生後18日頃より視細胞のアポトーシスが始まり、生後21日でピークとなる。本研究ではrd10マウスを用いて以下の実験を行った。

網膜におけるM1及びM2マーカーの経時的発現変化の解析

rd10マウス網膜よりmRNAを採取し、real-time PCR法を用いてM1及びM2マクロファージマーカーの発現量を経時的に測定した(対照:正常マウス網膜)。

網膜におけるM1及びM2マクロファージの局在変化の解析

M1及びM2マクロファージマーカーに対する抗体を用いて、網膜のwhole mount染色を行い、各マクロファージの細胞数ならびに局在の変化について、経時的な観察を行った(対照:正常マウス網膜)。

(2) RPモデル動物におけるピタバスタチンのM2誘導促進作用と視細胞保護効果の検討

ピタバスタチン原末による視細胞保護効果の検討

これまでの研究から、抗酸化剤であるN-アセチルシステイン(NAC)投与によってrd10マウスの視細胞変性が抑制されることを確認しており、本研究においても同様の検討を行った。rd10マウスにピタバスタチン原末0.1 mg/kgまたは0.3 mg/kgを連日経口投与し、投与群と非投与群で経時的に網膜組織切片の比較を行い、治療効果を判定した。

ピタバスタチン封入ナノ粒子薬によるM2マクロファージ誘導作用の解析

スタチンの高用量内服は横紋筋融解症などの重篤な副作用が報告されている。我々は、生体吸収性高分子ポリ乳酸・グリコール酸重合体(PLGA)を用いた成分封入ナノ粒子製剤に着目し、従来と比較してより安全かつ有効と考えられるピタバスタチン封入ナノ粒子薬(PVS-NP)の開発を行った。生後21日のrd10マウスに生理食塩水またはPVS-NP(ピタバスタチンとして0.3mg/kg含有)を週

に2回静脈内投与し、網膜マクロファージの活性化について解析した。

ピタバスタチン封入ナノ粒子薬による視細胞保護効果の検討

上記の方法で生理食塩水またはPVS-NPを投与したrd10マウスの網膜サンプルを用いて、経時的に網膜組織切片の比較を行い、視細胞保護効果について検討した。

4. 研究成果

(1) RPモデル動物におけるM1及びM2マクロファージの動態と病態への関与

M1及びM2マクロファージマーカーに対する抗体を用いた免疫組織染色による検討において、rd10マウスの生後3週、6週、9週のいずれの時期においてもM2よりもM1マクロファージマーカーの網膜発現量が優位であることを確認した。また、週数が上がるにつれていずれのマクロファージマーカーの網膜発現量も徐々に減少を認めた。

これらの結果から、RPモデル動物の網膜では、炎症促進型マクロファージが活性化しており、網膜変性早期において網膜の慢性炎症の誘導に関与している可能性が示唆された。

(2) RPモデル動物におけるスタチンのM2誘導促進作用と視細胞保護効果の検討

rd10マウスを用いてピタバスタチンの投与方法及び投与量を変更しながら、その効果について検証した。

ピタバスタチン原末0.1 mg/kgまたは0.3 mg/kgの経口投与では、明らかな視細胞保護効果は確認できなかった。

PVS-NPの静脈内投与では、生後31日で生理食塩水投与群と比較して網膜マクロファージの活性化が抑制されていた。また、PVS-NP投与群は生後52日で生理食塩水投与群と比較して錐体細胞密度が維持されていた。これらの結果から、PVS-NPによる視細胞保護効果が示唆された。

上記の結果の詳細については、論文投稿及び公開に向けて準備を行っている。また、十分に解析を行ったうえで今後の研究に応用していく方針としている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

(1) Nakatake S, Murakami Y, Ikeda Y, Morioka N, Tachibana T, Fujiwara K, Yoshida N, Notomi S, Hisatomi T, Yoshida S, Ishibashi T, Nakabeppu Y, Sonoda KH.

MUTYH promotes oxidative microglial activation and inherited retinal degeneration. JCI Insight. 2016 Sep 22;1(15):e87781.

(2) Fujiwara K, Ikeda Y, Murakami Y, Nakatake S, Tachibana T, Yoshida N, Nakao S, Hisatomi T, Yoshida S, Yoshitomi T, Sonoda KH, Ishibashi T. Association Between Aqueous Flare and Epiretinal Membrane in Retinitis Pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 Aug 1;57(10):4282-6.

(3) Yoshida N, Ikeda Y, Murakami Y, Nakatake S, Tachibana T, Notomi S, Hisatomi T, Ishibashi T. Vitreous cysts in patients with retinitis pigmentosa. Jpn J Ophthalmol. 2015 Nov;59(6):373-7.

(4) Yoshida N, Ikeda Y, Murakami Y, Nakatake S, Fujiwara K, Notomi S, Hisatomi T, Ishibashi T. Factors affecting visual acuity after cataract surgery in patients with retinitis pigmentosa. Ophthalmology. 2015 May;122(5):903-8.

(5) Ikeda Y, Yoshida N, Murakami Y, Nakatake S, Notomi S, Hisatomi T, Enaida H, Ishibashi T. Long-term Surgical Outcomes of Epiretinal Membrane in Patients with Retinitis Pigmentosa. Sci Rep. 2015 Aug 13;5:13078.

(6) Murakami Y, Ikeda Y, Akiyama M, Fujiwara K, Yoshida N, Nakatake S, Notomi S, Nabeshima T, Hisatomi T, Enaida H, Ishibashi T. Correlation between macular blood flow and central visual sensitivity in retinitis pigmentosa. Acta Ophthalmol. 2015 Dec;93(8):e644-8.

(7) Murakami Y, Yoshida N, Ikeda Y, Nakatake S, Fujiwara K, Notomi S, Nabeshima T, Nakao S, Hisatomi T, Enaida H, Ishibashi T. Relationship between aqueous flare and visual function in retinitis pigmentosa. Am J Ophthalmol. 2015 May;159(5):958-63.e1.

(8) Murakami Y, Ikeda Y, Akiyama M, Fujiwara K, Yoshida N, Nakatake S, Notomi S, Nabeshima T, Hisatomi T, Enaida H, Ishibashi T. Correlation between macular blood flow and central visual sensitivity in retinitis pigmentosa. Acta Ophthalmol. 2015 Dec;93(8):e644-8.

(9) Murakami Y, Yoshida N, Ikeda Y, Nakatake S, Fujiwara K, Notomi S, Nabeshima T, Nakao S, Hisatomi T, Enaida H, Ishibashi T. Relationship between aqueous flare and visual function in retinitis pigmentosa. Am J Ophthalmol. 2015 May;159(5):958-63.

(10) Yoshida N, Ikeda Y, Murakami Y, Nakatake S, Fujiwara K, Notomi S, Hisatomi T, Ishibashi T. Factors affecting visual acuity after cataract

surgery in patients with retinitis pigmentosa.
Ophthalmology. 2015 May;122(5):903-8.

(11) Akiyama M, Ikeda Y, Yoshida N, Notomi S, Murakami Y, Hisatomi T, Enaida H, Ishibashi T. Therapeutic efficacy of topical unoprostone isopropyl in retinitis pigmentosa. Acta Ophthalmol. 2014 May;92 (3):e229-34.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) Noriko Yoshida, Yasuhiro Ikeda, Yusuke Murakami, Shunji Nakatake, Kota Fujiwara, Shoji Notomi, Shintaro Nakao, Toshio Hisatomi, Hiroshi Enaida, and Tatsuro Ishibashi
Relationship between Aqueous Flare and Visual Function in Retinitis Pigmentosa. ARVO. Orlando 2014 May 04-08.

(2) 吉田倫子

網膜色素変性への炎症の関与と将来の治療
第 68 回日本臨床眼科学会 神戸 2014 年 11 月 13 日 ~ 16 日

〔図書〕(計 1 件)

吉田倫子 医学書院 網膜変性疾患診療のすべて 第 2 章 D 慢性炎症、2016、11、69 - 73

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 倫子 (YOSHIDA, Noriko)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：70725853

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()