

令和元年6月24日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11335

研究課題名(和文) HSP70を標的とした網膜色素変性症の新たな病態メカニズム解明と治療戦略

研究課題名(英文) HSP70 targeting therapy for retinitis pigmentosa

研究代表者

郡山 恵樹 (Koriyama, Yoshiki)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：70397199

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)：網膜色素変性症は成人中途失明原因の第3位にあり、患者数が増加しつつあるが治療法が確立されていない。これまで網膜色素変性症における視細胞死のメカニズムは、Ca/カルパイン、酸化ストレスに起因するものが個々に報告されていたが、それらの関連性は不明であった。本研究では、より包括的な観点で網膜色素変性症の発症メカニズムを精査し、より新しい病態メカニズム解明によって新たな治療法を確立することを目的とした。我々の研究により、新たにHSP70を標的とした網膜色素変性症に対する治療法開発に貢献できると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性症(RP)の最終病態は視細胞死の変性脱落であるため、その新たな病態メカニズム解明が新規治療戦略につながる。我々の仮説では分子シャペロンであるHSP70が、カルボニル化・分解を受けることでミスフォールディングが増え、広範囲のプロテオスタシス破綻が起き、次いでリソソーム酵素であるカテプシンが漏出することで二次的プロテオスタシス破綻といった悪循環をもたらす、独創的で新たなRP病態メカニズムを想定している。本研究で新たに提唱するカルボニル化阻害剤、HSP70誘導剤、カテプシン阻害剤がRPに有効であれば新たな治療戦略のひとつとなり、多くのRP患者に光を戻すことができると信じている。

研究成果の概要(英文)：Retinal degenerative diseases, such as retinitis pigmentosa, are characterized by night blindness and peripheral vision loss caused by the slowly progressive loss of photoreceptor cells. A comprehensive molecular mechanism of the photoreceptor cell death remains unclear. We reported that heat shock protein 70 (HSP70), which has a protective effect on neuronal cells, was cleaved by a calcium-dependent protease, calpain, in N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-treated mice retina. Carbonylated HSP70 is much more vulnerable than noncarbonylated HSP70 to calpain cleavage. However, it was not known whether protein carbonylation occurs in MNU-treated mice retina. In this study, we clearly show protein carbonylation-dependent photoreceptor cell death induced by MNU in mice. Therefore, protein carbonylation and subsequent calpain-dependent cleavage of HSP70 are key events in MNU-mediated photoreceptor cell death. Our data provide a comprehensive molecular mechanism of the photoreceptor cell death.

研究分野：網膜変性

キーワード：網膜色素変性症 HSP70 カルボニル化 カルシウム カルパイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症(retinitis pigmentosa: RP)は、中高年中途失明をきたす重要な変性疾患のひとつであり、進行性の夜盲、求心性視野狭窄、視力低下を主な症状とする。RPの有病率は世界規模ではおよそ5,000人に1人とされ、わが国においても、4,000~8,000人に1人と患者数が多い。RPは先天盲の第1位であり、中途失明原因でも第3位を占める。しかし、有病率の高さに反していまだに効果的な治療薬や治療法が無いのが現状であり、可及的速やかな治療法の開発が求められている。RPは常染色体優性遺伝、常染色体劣性遺伝、伴性劣性遺伝の3つのタイプがある遺伝性疾患であるが、孤発性の割合も多い。また、RPに関わる原因遺伝子は40種を超え、多くの病態モデル動物が存在するため、基礎研究における疾患モデルの選択が極めて難しい。つまり、原因遺伝子の多様性が治療薬および治療法の開発を難化させるハードルの1つとなっている。しかし、いずれもRPの最終病態が網膜視細胞脱落であるため、近年ではN-メチル-N-ニトロソ尿素(N-methyl-N-nitrosourea: MNU)のげっ歯類への腹腔内投与モデルが使用されている²⁾。MNUは腹腔内へ単回投与数日で網膜外層の視細胞選択的な脱落が再現性良く誘導できる。MNUの細胞死メカニズムは、カスパーゼの活性化亢進や細胞内カルシウム濃度の上昇とそれに次ぐカルパイン依存的な細胞死を示すことが知られている。さらに、MNUの視細胞障害における酸化ストレスの寄与も報告されており、種々の酸化ストレスマーカーがMNU投与後の網膜視細胞層で認められている。このように各々の研究室がMNUの障害メカニズムについて断片的な詳細をまとめているが、包括的にそれらのメカニズムを結びつける報告はほとんどなかった。本研究ではこれらのメカニズムをより広く俯瞰し、全体像を捉えながら新たなRPの病態メカニズムの可能性を打ち立てるとともに、そのメカニズムに焦点を当てたRP治療薬および治療法の可能性について述べる。

2. 研究の目的

RPの最終病態は視細胞の脱落であるため、我々は選択的な視細胞死を誘発するN-メチル-N-ニトロソ尿素(MNU)投与モデルを用いて新規病態メカニズムの可能性を示してきた。MNUは腹腔内へ単回投与により数日で視細胞選択的な脱落が再現性良く誘導できる。興味深いことにMNUの細胞死メカニズムは、i)酸化ストレスによる脂質過酸化(4HNE)の産生、ii)細胞内カルシウム動員とそれに次ぐカルパイン活性化、iii)カスパーゼの活性化亢進などRP遺伝子改変動物モデルと非常に類似したメカニズムを示す。このようにRP視細胞障害メカニズムについて断片的な報告が多数なされているが、それらのメカニズムの全体像を捉えた報告は皆無である。本研究では、より俯瞰したRPの新たな包括的病態メカニズムの可能性を打ち立てるとともに、それに焦点を当てた新たなRP治療薬開発の基盤を構築したい。

3. 研究の方法

MNUは分子量が103.1のメチル基をもつニトロソ化合物である。1967年HerroldらはゴールデンハムスターにMNU単回静脈内投与を行うと、視細胞のある網膜外顆粒層が選択的に脱落することを報告している。また、1990年代にTsuburaらのグループがMNUの視細胞障害メカニズムを精査し、MNUの腹腔内投与によるRPモデルを確立させた。このモデルを用いてRPをマウスで再現させた。網膜色素変性症モデルとして、視細胞死を選択的に引き起こすMNU(メチルニトロソ尿素: 60 mg/kg)を腹腔内投与したC57BL/6雄マウスを用いた。MNU投与したマウスの視細胞選択的な細胞死の定量にTUNEL染色を行った。HSP70やカルパインの役割を調べるためにHSP70誘導剤であるバルプロ酸(VPA)やHSP阻害剤(HSP inh)、カルパイン阻害剤(AL)を用いた。酸化ストレスの程度を確認するために脂質の過酸化最終産物である4HNEの量を免疫染色とドットプロットにより解析した。HSP70の発現および分解を確認するためにウェスタンプロットを行った。

4. 研究成果

我々は代表的なHSP70誘導剤として抗てんかん薬バルプロ酸(VPA)を用いMNUによる視細胞への影響を調べた。VPAはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤として働きヒストンのアセチル化を起こし、HSP70を発現誘導することが知られている。ヒストンH3のアセチル化抗体を用い、HSP70のプロモーターであるHspa1bを標的としてクロマチン免疫沈降を行ったところ、VPAの濃度依存的にHspa1bとの結合が増加した。また、VPA眼球内投与1日目をピークとして外顆粒層にHSP70陽性像が認められた。HSP70誘導は生存シグナルAktを活性化することが報告されており、VPA投与後1日目をピークとして視細胞にHSP70発現依存的なAktの活性化が認められた。VPAを用いてMNUによる視細胞死に対する保護作用メカニズムを精査した。MNU投与3日目でONL層が有意に薄くなるが、それに対しVPAは回避作用を示した。さらにHSP70の発現阻害剤を用いるとVPAの細胞死回避作用が認められなくなった。MNU投与3日目に増加する外顆粒層におけるTUNEL陽性像の増加は、VPA前投与により減少しHSP70発現阻害剤で保護作用は認められなくなった。これらのことからMNU誘導の視細胞死および外顆粒層の菲薄化はVPAによるHSP70発現依存的な作用で回避されることが分った。また、視覚断崖試験においてMNU投与により視機能が経時的に低下するのに対し、VPAは有意にその低下を遅延させることができ

た。このことから HSP70 は低下していく視機能を回復するほどの効果は無いものの、視細胞の脱落と視機能の低下のペースを大幅に遅延する効果が期待できる。一方、別の HSP70 誘導剤として胃潰瘍治療薬として知られるゲラニルゲラニルアセトン(GGA)を用いたところ VPA と同様の作用を示すことができた。MNU は ROS 発生を誘導し、4HNE の産生を増加することが知られている。一方、4HNE でカルボニル化された HSP70 はカルパイン依存的に切断を受けることが知られている。そこで MNU による 4HNE 産生が HSP70 のカルボニル化を誘導させた結果、HSP70 が切断されることが細胞死を引き起こす原因の 1 つと仮定した。抗 4HNE 抗体を用いた免疫染色とドットプロットの結果より、MNU は投与 1-2 日において視細胞層で優位に 4HNE の産生を増加させることが分った。また、HSP70 誘導剤、HSP70 阻害剤、カルパイン阻害剤の前投与は MNU による 4HNE の産生に影響しなかった。このことは網膜において発生する ROS に起因して 4HNE を産生するシグナルは HSP70 の発現誘導やカルパイン活性化の上流にあることが示唆された。また、ウェスタンブロット法により MNU が HSP70 の切断を誘導し、その切断はカルパイン阻害剤で抑制されることが分った。HSP70 誘導剤は MNU による HSP70 の切断を抑制しなかったが、HSP70 の未切断体を有意に増加させた。これらのことから、MNU は酸化ストレス依存的に 4HNE の産生を増やすとともにカルシウム - カルパイン系を活性化することで HSP70 のカルボニル化とそれに次ぐ切断を引き起こし、視細胞死を誘導している可能性が示唆された(カルパイン - カテプシン仮説)。また、HSP70 誘導剤は MNU による HSP70 切断を回避しないが、未切断体の HSP70 を増加させることで MNU の細胞死を回避している可能性が示唆された。また、カルボニル化阻害剤であるビタミン B6 によって、MNU による外顆粒層の菲薄化は抑制された。我々の研究から RP の病態メカニズムと MNU 誘導の視細胞死メカニズムに共通点が多くみられており、その病態発症メカニズムに酸化ストレス、カルシウムイオン、カルパイン、種々アポトーシスシグナルの関与することが示唆された。本研究により HSP70 を発現誘導させる薬物および治療法が新たな非侵襲的 RP 治療法のヒントとなることを望む。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1) Koriyama Y, Furukawa A, Sugitani K, Kubo M, Harada K, Fukuyama Y. Talaumidin Promotes Neurite Outgrowth of Staurosporine-Differentiated RGC-5 Cells Through PI3K/Akt-Dependent Pathways. *Adv Exp Med Biol*. 2018, 1074:649-653.
- (2) Sugitani K, Koriyama Y, Ogai K, Furukawa A, Kato S. Alternative Splicing for Activation of Coagulation Factor XIII-A in the Fish Retina After Optic Nerve Injury. *Adv Exp Med Biol*. 2018, 1074:387-393.
- (3) Furukawa A, Sugitani K, Koriyama Y. Protein Carbonylation-Dependent Photoreceptor Cell Death Induced by N-Methyl-N-nitrosourea in Mice. *Adv Exp Med Biol*. 2018, 1074:297-302.
- (4) Harada K, Zaha K, Bando R, Irimaziri R, Kubo M, Koriyama Y, Fukuyama Y. Structure-activity relationships of talaumidin derivatives: Their neurite-outgrowth promotion in vitro and optic nerve regeneration in vivo. *Eur J Med Chem*. 2018, 25;148:86-94.
- (5) Ueno S, Yoneshige A, Koriyama Y, Hagiwara M, Shimomura Y, Ito A. Early Gene Expression Profile in Retinal Ganglion Cell Layer After Optic Nerve Crush in Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018, 59(1):370-380.

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 郡山 恵樹, 古川 絢子, 那須 隆斗, 竹内 正義
グリセルアルデヒド由来の AGEs 化 チュブリンの異常重合と軸索伸長阻害について
平成 31 年 3 月 139 回 日本薬学会 千葉
- (2) 郡山 恵樹
S-ニトロシル化のエピジェネティック制御による中枢神経再生制御機構
平成 30 年 10 月 第 34 回日本ストレス学会学術総会 愛知
- (3) 杉谷 加代, 郡山 恵樹, 大貝 和裕, 加藤 聖
神経特異的な Factor FXIII-A の活性化と創傷治癒への関与
平成 30 年 9 月 第 40 回日本生物学的精神医学会・第 61 回日本神経化学学会大会 合同年会 兵庫

〔図書〕(計0件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.suzuka-u.ac.jp/wp-content/uploads/2018/06/pp_kouriyama.pdf

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：古川 絢子

ローマ字氏名：FURUKAWA Ayako

所属研究機関名：鈴鹿医療科学大学

部局名：薬学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：10455537

研究分担者氏名：杉谷 加代

ローマ字氏名：SUGITANI Kayo

所属研究機関名：金沢大学

部局名：保健学系

職名：助教

研究者番号(8桁)：20162258

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：奥村俊明

ローマ字氏名：OKUMURA Takaaki

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、研究者個人に帰属されます。