

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10881

研究課題名(和文) 低酸素応答制御による網膜疾患へのアプローチ

研究課題名(英文) Approach for retinal diseases based on regulation of hypoxia response

研究代表者

栗原 俊英 (Kurihara, Toshihide)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任准教授

研究者番号：50365342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、低酸素誘導因子(HIF)が様々な疾患の病態生理に関与していることが明らかにされつつある。そこで網膜疾患の病態形成におけるHIFの役割を解明するためにHIFやその制御因子VHLを標的としたコンディショナルノックアウトマウスを作製し解析を行った。HIFを欠損させても成体網膜に異常をきたさず、HIFの異所的な安定は網膜変性を誘導することが明らかとなり、網膜疾患における新たな治療標的となることを見出した。さらに、網膜変性モデルに対する既知HIF阻害剤の投与実験を行い、その治療的抑制効果を確認した。これらの結果から、HIF阻害は網膜疾患治療のみならず発症予防にも寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To date, hypoxia-inducible factors (HIFs) have been revealed to play an important role in pathogenesis of various diseases. In this study, we generated and evaluated conditional knockout mice for HIFs and their negative regulator VHL. HIF deletion in adult retina induced no abnormal phenotype whereas ectopic HIF stabilization lead retinal degeneration indicating that HIF can be a new therapeutic target for retinal diseases. Furthermore, we administrated HIF inhibitors in animal models of retinal degeneration and confirmed a therapeutic effect against the phenotypes. These results suggested that HIF inhibition can contribute not only for retinal disease treatment but also prevention.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜 低酸素応答 動物モデル 薬物治療

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで HIF の網膜発生および網膜疾患モデルにおける役割を研究してきた (Kurihara T. et al. *J Clin Invest.* 2012, Kurihara T. et al. Kurihara T. et al. *J Cell Biol.* 2011, Kurihara T et al. *Development.* 2010)。これまでの研究結果から網膜に存在する様々な種類の細胞において HIF とその関連分子は、発生学的にも網膜疾患の病態メカニズムを考えるうえでも重要であることを明らかにしており、本研究の結果から RPE 細胞における HIF と AMD 病態形成メカニズムの役割が明らかになり、その知見が新しい AMD 治療戦略の要になる可能性がある。

2. 研究の目的

加齢黄斑変性 (AMD) は、先進国での55歳以上の主要な失明原因である。

その病態形成において網膜色素上皮 (RPE) が重要な役割を担うことが報告されているが、根本的な病態メカニズムは分かっていない。近年、低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor; HIF) は、ストレス応答の中心的な分子として、様々な病態生理に関与していることが明らかにされつつある。

本研究では、Cre/loxPシステムを用いたコンディショナルノックアウトマウス技術を用いて、RPE細胞特異的に、HIF関連遺伝子を操作することにより、AMDの病態形成におけるHIFの役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

Cre/LoxP 技術を利用した実験手法を用いて成体誘導 RPE 特異的コンディショナルノックアウトマウスを作成する。HIF、VHL および下流の代表的遺伝子である VEGF を標的としてコンディショナルノックアウトマウスを作成し、組織が完成した後の成体において遺伝子欠損を誘導し、その表現型を解析する。解析方法は、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用

いて形態学的に観察をおこなうほか、免疫染色、real-time PCR、ELISA、イムノプロット法を用いた遺伝子・タンパク発現の変化、さらには網膜電図 (Electroretinogram; ERG) を用いて機能的な評価を行い、表現型のヒト AMD に対する類似点・相違点を考察する。続いて、HIF とその抑制因子である VHL、さらには標的遺伝子である VEGF をそれぞれ組み合わせたコンディショナルノックアウトマウスを作成することにより、互いの分子の相互作用を in vivo で検証する。これらダブル・トリプルノックアウトマウスの作成を行い、表現型の比較をおこなうことで、成体網膜における低酸素応答遺伝子群の役割を明らかにする。またその結果から HIF およびその関連分子のヒト AMD 発生過程への関与を考察する。

4. 研究成果

作製した RPE 細胞特異的 HIF および VHL コンディショナルノックアウトマウスの表現型を解析することで、RPE における HIF の過剰発現が、網膜変性を誘導することを見出した。また、網膜切片の組織学的な検証や代謝変化を検証することにより、HIF の過剰な発現がグルコースや脂質の代謝に影響を与え、その結果網膜変性が引き起こされることを明らかにし、HIF を阻害することによる AMD への新たな治療の可能性を見出し、論文報告した (Kurihara T, et al. eLife 2016)。

さらに、網膜変性モデルに対する既知 HIF 阻害剤であるトポテカンの投与実験を行い、その治療的抑制効果を確認した (三輪、栗原ら。第 120 回 日本眼科学会総会)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

Jiang X, Kurihara T, Kunimi H, Miyauchi M, Ikeda S, Mori K, Tsubota K, Torii H, Tsubota K, A highly efficient murine model of experimental myopia, Scientific Reports, 査読有、8 巻、2018

DOI:10.1038/s41598-018-20272-w

Minami S, Nagai N, Suzuki M, Kurihara T, Sonobe H, Kamoshita M, Uchida A, Shinoda H, Takagi H, Sonoda S, Sakamoto T, Tsubota K, Ozawa Y, Benefits of aflibercept treatment for age-related macular degeneration patients with good best-corrected visual acuity at baseline, Scientific Reports, 査読有、8 巻、2018

DOI:10.1038/s41598-017-18255-4

Aketa N, Yamaguchi T, Asato T, Yagi-Yaguchi Y, Suzuki T, Higa, K, Kurihara T, Satake Y, Tsubota K, Shimazaki J, Elevated Aqueous Cytokine Levels in Eyes With Ocular Surface Diseases, American Journal of Ophthalmology, 査読有、184 巻、2017

DOI:10.1016/j.ajo.2017.09.029

Torii H, Ohnuma K, Kurihara T, Tsubota K, Negishi K, Violet Light Transmission is Related to Myopia Progression in Adult High Myopia, Scientific Reports, 査読有、7 巻、2017

DOI:10.1038/s41598-017-09388-7

Ozawa Y, Shigeno Y, Nagai N, Suzuki M, Kurihara T, Minami S, Hirano E, Shinoda H, Kobayashi S, Tsubota K, Absolute and estimated values of macular pigment optical density in young and aged Asian participants with or without age-related macular degeneration, 査読有、17 巻、2017

DOI: 10.1186/s12886-017-0557-5

Kurihara T, Roles of Hypoxia Response in Retinal Development and Pathophysiology, The Keio Journal of Medicine, 査読有、67 巻、1~9、2017

DOI:10.2302/kjm.2017-0002-IR

Sato S, Shinoda H, Nagai N, Suzuki M, Uchida A, Kurihara T, Kamoshita M, Tomita Y, Iyama C, Minami S, Yuki Ka, Tsubota K, Ozawa Y, Predictive factors of better outcomes by monotherapy of an antivasular endothelial growth factor drug, ranibizumab, for diabetic macular edema in clinical practice, Medicine, 査読有、96 巻、e6459 ~ e6459、2017

DOI:10.1097/MD.0000000000006459

Kurihara T, Development and pathological changes of neurovascular unit regulated by hypoxia response in the retina, Progress in Brain Research, 査読有、225 巻、201-211、2016

DOI:10.1016/bs.pbr.2016.03.006

Kurihara T, Development and pathological changes of neurovascular unit regulated

by hypoxia response in the retina, Progress in Brain Research, 査読有、225 巻、201-211、2016

DOI:10.1016/bs.pbr.2016.03.006

Suzuki M, Nagai N, Shinoda H, Uchida A, Kurihara T, Tomita Y, Kamoshita M, Iyama C, Tsubota K, Ozawa Y, Distinct responsiveness to intravitreal ranibizumab therapy in polypoidal choroidal vasculopathy with single or multiple polyps, American Journal of Ophthalmology, 査読有、166 巻、52-59、2016

DOI: 10.1016/j.ajo.2016.03.024

Kurihara T, Westenskow PD, Gantner ML, Usui Y, Schultz A, Bravo S, Aguilar E, Wittgrove C, Friedlander MS, Paris LP, Chew E, Siuzdak G, Friedlander M, Hypoxia-induced metabolic stress in retinal pigment epithelial cells is sufficient to induce photoreceptor degeneration, eLife, 査読有、5 巻、2016

DOI:10.7554/eLife.14319

小沢洋子、永井紀博、鈴 美砂、栗原俊英、篠田 肇、渡辺 満、坪田 一男、ルテイン高含有ホウレンソウ摂取による黄斑色素密度に対する効果のパイロットスタディ、日本眼科学会雑誌、査読有、120(1)巻、41-48、2016

Okamoto T, Ozawa Y, Kamoshita M, Osada H, Toda E, Kurihara T, Nagai N, Umezawa K, Tsubota K, The Neuroprotective Effect of Rapamycin as a Modulator of the mTOR-NF- κ B Axis during Retinal Inflammation, PLoS One, 査読有、11(1) 巻、2016

DOI:10.1371/journal.pone.0146517

Westenskow PD, Bucher F, Bravo S, Kurihara T, Feitelberg D, Paris LP, Aguilar E, Lin JH, Friedlander M, iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelium Allografts Do Not Elicit Detrimental Effects in Rats: A Follow-Up Study, Stem Cells International, 査読有、2016 巻、2016

DOI:10.1155/2016/8470263

Paris LP, Johnson CH, Aguilar E, Usui Y, Cho K, Hoang LT, Feitelberg D, Benton HP, Westenskow PD, Kurihara T, Trombley J, Tsubota K, Ueda S, Wakabayashi Y, Patti GJ, Ivanisevic J, Siuzdak G, Friedlander M, Global metabolomics reveals metabolic dysregulation in ischemic retinopathy, Metabolomics, 査読有、12 巻、2016

DOI:10.1007/s11306-015-0877-5

Tomita Y, Kurihara T, Uchida A, Nagai N, Shinoda H, Tsubota K, Ozawa Y, Wide-Angle

Viewing System versus Conventional Indirect Ophthalmoscopy for Scleral Buckling, Scientific Reports、査読有、5巻、2015
DOI:10.1038/srep13256

Usui Y, Westenskow PD, Kurihara T, Aguilar E, Sakimoto S, Paris LP, Wittgrove C, Feitelberg D, Friedlander MS, Moreno SK, Dorrell MI, Friedlander M, Neurovascular crosstalk between interneurons and capillaries is required for vision, The Journal of Clinical Investigation、査読有、125(6)巻、2335-2346、2015
DOI: 10.1172/JCI180297

〔学会発表〕(計 11 件)

栗原俊英、「分子標的薬 抗血管新生療法アップデート」インストラクションコース 18 網膜橋渡し研究アップデート 2017、第 71 回日本臨床眼科学会、2017 年

Toshihide Kurihara, Kiwako Mori, Maki Miyauchi, Ayako Ishida, Xiaoyan Jiang, Shin-ichi Ikeda, Shinichiro Kondo, Hidemasa Torii, Kazuo Tsubota, Refractive myopic shift is suppressed by a carotenoid administration in a murine model of lens-induced myopia, The 16th International Myopia Conference (国際学会) 2017 年

Yukihiro Miwa, Maki Miyauchi, Ayako Ishida, Yusaku Katada, Hiromitsu Kunimi, Yohei Tomita, Kazuo Tsubota, Toshihide Kurihara, Retinal neurodegeneration and neovascularization are suppressed by HIF inhibitor topotecan in murine models of retinopathy, ARVO 2017 Annual Meeting (国際学会) 2017 年

三輪幸裕、宮内真紀、石田文子、堅田侑作、國見洋光、富田洋平、坪田一男、栗原俊英、HIF 阻害剤トポテカンがマウス網膜病の血管新生および神経変性を抑制する、第 121 回日本眼科学会総会、2017 年

栗原俊英、VEGF 遺伝子発現調節による後眼部疾患の新しい創薬ターゲット「シンポジウム 11 後眼部疾患の新しい創薬ターゲット 私のイチ押し!」、第 121 回日本眼科学会総会(招待講演) 2017 年

三輪幸裕、宮内真紀、姜効炎、堅田侑作、森紀和子、鳥居秀成、坪田一男、栗原俊英、低酸素誘導因子阻害剤ドキシソルピシンのマウス酸素誘導網膜症モデルにおける病的血管新生阻害効果、日本獣医眼科カンファレンス 2016 年 年次大会、2016 年

栗原俊英、三輪幸裕、坪田一男、加齢黄斑変性動物モデルに対する HIF 阻害剤投与による神経保護効果、第 16 回日本抗加齢医学会総会、2016 年

三輪幸裕、宮内真紀、姜効炎、堅田侑作、森紀和子、鳥居秀成、坪田一男、栗原俊英、HIF 阻害剤の網膜変性に対する治療効果の検討、第 36 回比較眼科学会年次大会、2016 年

Yukihiro Miwa, Maki Miyauchi, Yusaku Katada, Xiaoyan Jiang, Kiwako Mori, Hidemasa Torii, Kazuo Tsubota, Toshihide Kurihara, HIF inhibitor topotecan suppresses light-induced retinal degeneration in mice, ARVO Annual Meeting 2016、2016 年

三輪幸裕、宮内真紀、姜効炎、堅田侑作、森紀和子、鳥居秀成、坪田一男、栗原俊英、HIF 阻害剤トポテカンによる網膜光障害モデルへの阻害効果、第 120 回日本眼科学会総会、2016 年

Toshihide Kurihara, Hidemasa Torii, Yuko Seko, Kazuo Tsubota, An association of serum vitamin D level with myopia initiation by UV exposure in chick, The 15th International Myopia Conference (国際学会) 2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 2 件)

名称: 虚血性疾患、緑内障、視神経疾患、網膜変性疾患、血管新生性網膜疾患、がん、神経変性、もしくは自己免疫疾患の治療又は予防剤、及び低酸素誘導因子阻害剤

発明者: 坪田一男、栗原俊英、井上浩義、三輪幸裕

権利者: 慶應義塾大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/040884

出願年: 2017 年

国内外の別: 外国

名称: 網膜変性疾患、血管新生性網膜疾患、がん、神経変性、もしくは自己免疫疾患の治療又は予防剤、及び低酸素誘導因子阻害剤

発明者: 栗原俊英、三輪幸裕、坪田一男、井上浩義

権利者: 栗原俊英、三輪幸裕、坪田一男、井上浩義

種類: 特許

番号: 特願 2016-221547

出願年月日: 2016 年 11 月 14 日

国内外の別: 国内

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
「researchmap」
<https://researchmap.jp/kurihara>

栗原俊英、低酸素応答制御による網膜疾患克服～基礎研究成果から臨床応用を目指して～、第5回南多摩眼科アカデミー（招待講演）、2017年

栗原俊英、低酸素応答制御による網膜疾患克服への新しいアプローチ、ノバルティスファーマ社内セミナー（招待講演）、2017年

栗原俊英、低酸素応答制御による網膜疾患克服への取り組み、第1回網膜橋渡し研究会（招待講演）、2016年

栗原俊英、網膜色素上皮細胞における低酸素ストレスは視細胞変性を引き起こす、平成28年度慶大眼科オータムセミナー（招待講演）、2016年

栗原俊英、三代会賞受賞者講演「網膜の発生と病態生理における低酸素応答の役割」、第85回北里記念式（招待講演）、2016年

栗原俊英、抗VEGF薬に反応するが再発を繰り返す糖尿病黄斑浮腫症例、DME Expert Meeting in Tokyo（招待講演）、2016年

栗原俊英、低酸素応答による網膜組織代謝制御と疾患の関わり、弘前大学グルコース代謝セミナー（招待講演）、2016年

栗原俊英、低酸素応答で制御される網膜neurovascular unitの発生と病的変化、Neurovascular Unit研究会2016（招待講演）、2016年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 俊英 (KURIHARA, Toshihide)
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任准教授
研究者番号：50365342