

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20316

研究課題名(和文)分岐鎖アミノ酸製剤に関する細胞保護メカニズム解明

研究課題名(英文) Investigation of the cell protective abilities of branched chain amino acids in mouse models of retinal neurodegenerative diseases

研究代表者

岩井 祥子 (Iwai, Sachiko)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：00768905

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)：分岐鎖アミノ酸がストレス下の培養細胞に対し、細胞死抑制効果を持つこと、細胞内ATP濃度低下の抑制効果を持つこと、が明らかになった。また、分岐鎖アミノ酸を網膜色素変性モデル動物や緑内障モデル動物に投与することによって、視細胞変性や網膜神経節細胞死が抑制されることが明らかになった。網膜色素変性モデル動物では、分岐鎖アミノ酸投与によって、網膜の機能低下が抑制されることが明らかになった。分岐鎖アミノ酸は、小胞体ストレスの抑制や細胞内ATP濃度低下の抑制、mTORシグナルタンパクの活性化を介して、細胞死抑制効果を示していた。分岐鎖アミノ酸は、眼難治疾患の新たな治療法になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Retinal neuronal cell death underlies many incurable eye diseases such as retinitis pigmentosa and glaucoma. We demonstrated that branched chain amino acids (BCAAs) can increase ATP production by enhancing glycolysis and protect cells from cell death. Administration of BCAAs to mouse models of retinal degeneration, rd10 mice, significantly attenuated photoreceptor cell death both morphologically and functionally. Administration of BCAAs to mouse models of glaucoma, GLAST K/O mice, also significantly attenuated retinal ganglion cell death. These results suggest that administration of BCAAs could contribute to a comprehensive therapeutic strategy for retinal neurodegenerative diseases such as retinitis pigmentosa and glaucoma.

研究分野：眼科分子生物学

キーワード：分岐鎖アミノ酸 BCAA 網膜色素変性 緑内障 網膜保護

## 1. 研究開始当初の背景

現在日本において、**緑内障、網膜色素変性、加齢黄斑変性は中途失明の主な原因**である。緑内障は網膜の**網膜神経節細胞**が、網膜色素変性は網膜の**視細胞**が、萎縮型加齢黄斑変性は**網膜色素上皮**がそれぞれ**変性・脱落**することにより視機能障害をきたす難治性眼疾患である。緑内障に関しては、現行の眼圧降下治療を行ってもなお視野障害が悪化する例が少なくない。網膜色素変性や萎縮型加齢黄斑変性に対しては、近年、網膜循環改善薬などのいくつかの薬剤が注目されつつあるが、著明な効果を示すものは未だ無い。また、病期の進行した網膜変性の患者を対象とした再生医療の試みも為され始めているが、疾患を治療・治癒させる段階には程遠く、疾患の進行予防こそが最重要であると考えられている。したがって、これら眼疾患に対し、**網膜神経節細胞、視細胞、網膜色素上皮の変性・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。

分岐鎖アミノ酸(BCAA)とは、分岐のある脂肪族側鎖を有するアミノ酸であり、ロイシン、イソロイシン、バリンが該当する。京大大学生命科学研究科高次生体統御学講座および眼科学教室では、細胞内のエネルギー供給源として分岐鎖アミノ酸に注目し、味の素製薬(現 EA ファーマ)と共同研究を行ってきた。

## 2. 研究の目的

分岐鎖アミノ酸製剤の眼難治疾患への適応拡大を目標とし、様々な眼疾患モデル動物で網膜保護活性を確認すること、また、それら細胞保護活性のメカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

1) 分岐鎖アミノ酸製剤を亜急性網膜変性モデルマウスである rd10 に投与し、光干渉断層計および網膜電図検査にて、視細胞変性

抑制効果の判定を行った。

(2) 分岐鎖アミノ酸を網膜変性モデルマウス rd12 マウスに投与し、光干渉断層計および網膜電図検査にて、視細胞変性抑制効果の判定を行った。

(3) 分岐鎖アミノ酸を緑内障モデルマウスである GLAST 欠損マウスに投与し、網膜神経節細胞死抑制効果の評価を行った。GLAST 欠損マウスと網膜神経節細胞に蛍光を発する Thy1-CFP マウスを交配して得た GLAST 欠損(+/-)・Thy1-CFP マウスにおいて、網膜のフラットマウントでの網膜神経節細胞の数を計測することによって神経節細胞死抑制効果の判定を行った。

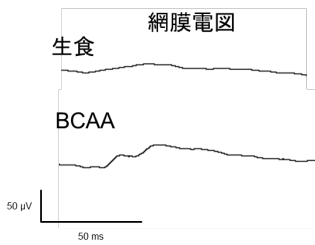
(4) アミノ酸飢餓条件下の HeLa 細胞にツニカマイシンにて小胞体ストレスを加え、細胞内 ATP 濃度および生細胞数を計測し、分岐鎖アミノ酸による細胞内 ATP 濃度低下および細胞死の抑制効果の評価を行った。

(5) 視細胞由来の株化細胞である 661W 細胞にツニカマイシン負荷およびオリゴマイシン負荷を加え、細胞内 ATP 濃度および生細胞数を計測し、分岐鎖アミノ酸による細胞内 ATP 濃度低下および細胞死の抑制効果の評価を行った。

(6) 細胞保護メカニズムの検討のため、ツニカマイシン負荷をかけた HeLa 細胞(上記(4)) およびオリゴマイシン負荷をかけた 661W 細胞(上記(5))において、ウェスタンブロットングを行った。また、rd10 マウス(上記(1)) および GLAST 欠損マウス(上記(3))の組織切片を用いて免疫染色を行った。

## 4. 研究成果

1) 網膜変性モデルマウス rd10 マウスにおいて、光干渉断層計、組織切片、網膜電図検査の結果から分岐鎖アミノ酸製剤投与によって、網膜の菲薄化や機能低下が抑制されることがわかった。(図1)

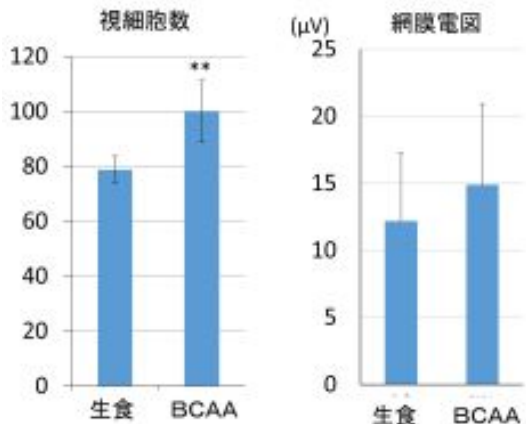


網膜色素変性モデルマウスrd10に分岐鎖アミノ酸を投与すると、網膜の菲薄化や機能低下が抑制された。

図 1

(2) 網膜色素変性モデルマウスである rd12 マウスでは、分岐鎖アミノ酸は、網膜の菲薄化、視細胞の変性脱落を抑制することが明らかになった。また、網膜電図検査の結果、分岐鎖アミノ酸投与群において網膜の機能低下が抑制されることが明らかになった。

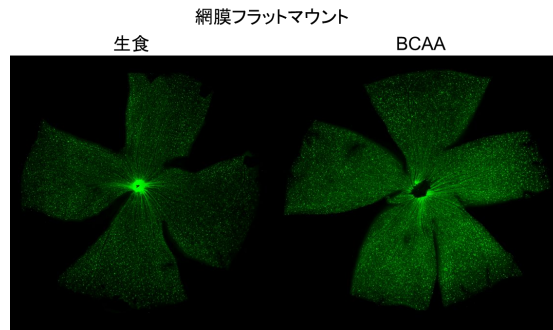
(図 2)



網膜色素変性モデルマウスに分岐鎖アミノ酸を投与すると視細胞減少・網膜電図低下が抑制される。

図 2

(3) 緑内障モデルマウス GLAST 欠損マウスにおいて、網膜フラットマウントにて網膜神経節細胞数を評価した結果、分岐鎖アミノ酸投与によって網膜神経節細胞死が抑制されることがわかった。(図 3)



緑内障モデルマウスGLAST欠損マウスに分岐鎖アミノ酸を投与すると、網膜神経節細胞の減少が抑制された。

図 3

(4) 小胞体ストレスを加えた HeLa 細胞において、分岐鎖アミノ酸を添加すると、細胞内 ATP 濃度の低下が抑制され、細胞死が抑制されることがわかった。(図 4)

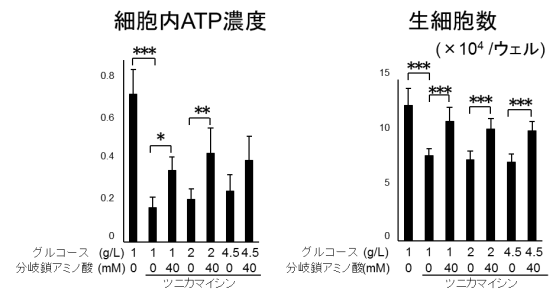


図 4

(5) ツニカマイシンやオリゴマイシンにて負荷をかけた 661W 細胞において、分岐鎖アミノ酸を添加すると、細胞内 ATP 濃度の低下が抑制され、細胞死が抑制されることがわかった。

(6) ツニカマイシン負荷をかけた HeLa 細胞、およびオリゴマイシン負荷をかけた 661W 細胞において、ウェスタンブロッティングを行った結果、小胞体ストレスで発現が上昇する CHOP タンパク質が分岐鎖アミノ酸によって発現抑制されることがわかった。

(図 6) また、分岐鎖アミノ酸投与によって、細胞内シグナル伝達に關与する mTOR およびその下流タンパクが活性化されることがわかった。また、rd10 マウスおよび GLAST 欠損マウスの組織切片の免疫染色を行うこ

とによって、分岐鎖アミノ酸の投与によって、これらのモデル動物でも CHOP タンパク質の発現が抑制されることがわかった。(図5)

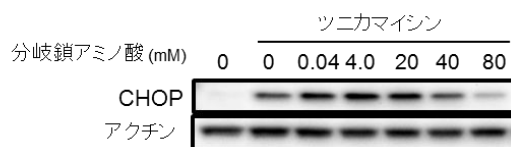


図5

## 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 6 件)

Hasegawa T, Ikeda HO, Iwai S, Muraoka Y, Tsuruyama T, Okamoto-Furuta K, Kohda H, Kakizuka A, Yoshimura N.

Branched chain amino acids attenuate major pathologies in mouse models of retinal degeneration and glaucoma.

Heliyon.2018;4(2):e00544.

doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00544.

Hata, M., Ikeda, H.O., Iwai, S., Iida, Y., Gotoh, N., Asaka, I., Ikeda, K., Isobe, Y., Hori, A., Nakagawa, S.

Reduction of lipid accumulation rescues Bietti's crystalline dystrophy phenotypes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Apr 10;115(15):3936-3941.

doi:10.1073/pnas.1717338115.

Hata, M., and Ikeda, H.O.

Modulation of valosin-containing protein by Kyoto University Substances (KUS) as a novel therapeutic strategy for ischemic neuronal diseases. Neural Regen Res. 2017 Aug;12(8):1252-1255.

doi: 10.4103/1673-5374.213540.

Hata, M., Ikeda, H.O., Kikkawa, C., Iwai,

S., Muraoka, Y., Hasegawa, T., Kakizuka, A., and Yoshimura, N.

KUS121, a VCP modulator, attenuates ischemic retinal cell death via suppressing endoplasmic reticulum stress. Sci Rep. 2017 Mar 20;7:44873.

doi: 10.1038/srep44873.

Nakano, N., Ikeda, H.O., Hasegawa, T., Muraoka, Y., Iwai, S., Tsuruyama, T., Nakano, M., Fuchigami, T., Shudo, T., Kakizuka, A.

Neuroprotective effects of VCP modulators in mouse models of glaucoma. Heliyon. 2016 Apr 19;2(4):e00096.

doi: 10.1016/j.heliyon.2016.e00096.

Hasegawa, T., Muraoka, Y., Ikeda, H.O., Tsuruyama, T., Kondo, M., Terasaki, H., Kakizuka, A., and Yoshimura, N.

Neuroprotective efficacies by KUS121, a VCP modulator, on animal models of retinal degeneration. Sci Rep. 2016 Aug 9;6:31184. doi: 10.1038/srep31184

[学会発表](計 17 件)

「網膜色素変性の視野進行評価と神経保護治療のとりくみ」長谷川智子、池田華子、村岡勇貴、後藤謙元、石原健司、菅原麻紗子、平島貴子、宮田学 京都眼科学会 2016/6/19

網膜色素変性に対する 新規神経保護治療 池田華子  
JRPS 愛知医療講演会 名古屋市総合社会福祉会館 2016/4/10

網膜色素変性に対する 新規神経保護治療 池田華子  
JRPS 愛媛 9 回定期総会 愛媛県視聴覚福祉センター 2016/5/15

網膜色素変性に対する 新規神経保護治療 池田華子  
JRPS 大阪 医療講演会 天王寺区民センター 2016/6/5

網膜色素変性に対する 新規神経保護治療 池田華子

『網膜色素変性症』医療講演 ハートピア京都 2016/12/4

眼疾患モデルを用いた 神経保護治療研究と創薬

池田華子

121 回日本眼科学会総会 2017/4/6  
2017/4/9, 2017/4/7教育講演セミナー

網膜色素変性に対する 新規神経保護治療開発

池田華子

JRPS 徳島 医療講演 2017/5/21

眼難治疾患に対する 新規神経保護治療法の開発

池田華子

第 76 回あやめ池眼科懇談会 2017/6/1

眼難治疾患に対する新規神経保護治療法開発

池田華子

京都眼科学会 宿題報告 2017/6/4

網膜色素変性に対する 新規神経保護治療開発

池田華子

JRPS 滋賀 医療講演 2017/6/11

網膜色素変性に対する 新規神経保護治療開発

池田華子

JRPS 神奈川 医療講演 2017/6/18

網膜色素変性に対する 新規神経保護治療開発

池田華子

JRPS 東京 医療講演 2017/6/18

網膜色素変性に対する 新規神経保護治療開発

池田華子

JRPS 埼玉 6 月 医療講演 2017/6/24

VCP ATPase 阻害剤による神経保護治療開発

池田華子

第 4 回眼科創薬研究会 2017/6/30

新規神経保護治療薬による治療法開発

池田華子

71 回日本臨床眼科学会 2017/10/12

失明を防ぐ -眼の病気に対する神経保護治療研究-

池田華子

女子高生・車座フォーラム 2017/12/23

失明を防ぐ -眼の病気に対する神経保護治療研究-

池田華子

関西 7 大学フェスティバル 2017/7/23

〔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

[http://www.opthalmol.kuhp.kyoto-u.ac.jp/page\\_neuroprotection.html](http://www.opthalmol.kuhp.kyoto-u.ac.jp/page_neuroprotection.html)

[http://www.opthalmol.kuhp.kyoto-u.ac.jp/page\\_clinical\\_study\\_of\\_retinitis\\_pigmentos\\_a.html](http://www.opthalmol.kuhp.kyoto-u.ac.jp/page_clinical_study_of_retinitis_pigmentos_a.html)

<https://www.facebook.com/京都大学網膜神経保護治療プロジェクト-312249548958205/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩井 祥子 (IWAI, sachiko)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号: 00768905

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

池田 華子 (IKEDA, hanako)

京都大学・医学部附属病院 臨床研究総合

センター・准教授

研究者番号: 20372162

長谷川 智子 (HASEGAWA, tomoko)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号: 90802760

(4)研究協力者

吉村長久 (YOSHIMURA, nagahisa)

飯田悠人 (IIDA, yuto)

川口恵理 (KAWAGUCHI, eri)

末次仁美 (SUETHUGU, masami)