

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20331

研究課題名(和文)低酸素応答調節を介したマクロファージ分化誘導による網膜変性へのアプローチ

研究課題名(英文) Approach for retinal degeneration based on macrophage differentiation via hypoxia response regulation

研究代表者

宮内 真紀 (MIYAUCHI, Maki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員

研究者番号：70757830

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)：近年、ストレス応答の中心的な分子として低酸素誘導因子(HIF)が、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、HIFの網膜変性における役割を明らかにするため、網膜血管新生および萎縮変性動物モデルを用いて薬物的介入を行いその治療効果を検討した。網膜病的血管新生および萎縮変性誘導に伴いHIFとHIFの標的遺伝子の発現亢進を確認した。さらにこれらモデルに対し既知およびスクリーニングによって得られた新規HIF阻害剤を投与し網膜病的血管新生と萎縮変性に対する抑制効果を確認した。これらの結果から薬物的介入によるHIF阻害は、網膜変性に対する有効な治療法になりうる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Recently, hypoxia-inducible factor (HIF) has been identified to be involved with pathogenesis of various diseases as a central molecule of stress response. In this study, to elucidate roles of HIF in retinal degeneration, we evaluate therapeutic effects of pharmacological HIF inhibition against retinal neovascular and atrophic degeneration in animal models. HIF and its target genes were upregulated according to induction of retinal pathological angiogenesis and atrophic degeneration in the animal models. Furthermore, known and newly screened novel HIF inhibitors were confirmed to have therapeutic effects in these animal models. These results suggested that pharmacological intervention for HIF can be a new therapeutic approach for retinal diseases.

研究分野：細胞生物学

キーワード：動物モデル 薬物スクリーニング 低酸素誘導因子 網膜

## 1. 研究開始当初の背景

網膜の最外層に光を受容する視細胞は位置し、視細胞が失われる(網膜変性)と失明に至る。視細胞が失われ網膜変性と至る原因は、他因子疾患(加齢黄斑変性)、遺伝性(網膜色素変性症)、網膜剥離、炎症性疾患(ぶどう膜炎)など様々である。手術による治療法が存在する網膜剥離にしても、その治療が遅れ、一度視細胞が失われれば視力は取り戻せない。また個々の疾患の原因は様々であっても、最終的な表現型は視細胞欠失である。加齢黄斑変性(AMD)は先進国においてもっとも頻度の高い失明原因疾病の一つであり、脈絡膜血管新生の有無を問わず最終的には視細胞欠失が、失明を直接的に規定する。加齢・生活習慣・遺伝背景など、AMDの病態形成における原因は多岐にはわたるが、その共通の表現型は視細胞および網膜色素上皮(RPE)細胞の変性・脱落である。その病態形成において慢性炎症・異常免疫応答の関わりが指摘されている。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、ストレス応答の中心的な分子として低酸素誘導因子(HIF)が、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、免疫担当細胞が発現するHIFの網膜変性における役割を明らかにする。

## 2. 研究の目的

加齢黄斑変性(AMD)・網膜色素変性症といった網膜変性疾患は、主要な失明原因である。加齢・生活習慣・遺伝背景など、病態形成における原因は多岐にはわたるが、その共通の表現型は視細胞および網膜色素上皮(RPE)細胞の変性・脱落である。その病態形成において慢性炎症・異常免疫応答の関わりが指摘されている。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、

ストレス応答の中心的な分子として低酸素誘導因子(HIF)が、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、免疫担当細胞が発現するHIFの網膜変性における役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

通常酸素下において、HIFのサブユニット(HIF-1, HIF-2, HIF-3)は、その抑制因子であるVHL(von Hippel Lindau protein)によって特異的に認識され、ユビキチン化後プロテアソームによって分解される。低酸素下では、HIFはVHLの認識に必要な水酸化を受けないため安定化し、核内に移動して下流の遺伝子群を発現させる。本研究では網膜血管新生モデル動物としてマウス酸素誘導網膜症(Oxygen-induced Retinopathy: OIR)モデルを、萎縮性網膜変性モデルとしてマウス網膜光障害(Light-induced Retinopathy: LIR)モデルを用いた。OIRモデルは生後8日のマウスを高酸素下で飼育し、その後通常酸素条件に戻すことで相対的な低酸素により網膜の病的血管新生を誘導するモデルである。LIRモデルはアルビノマウスに対し強い光を照射することにより網膜視細胞変性を誘導するモデルである。これらモデルを用いて網膜病的血管の組織学的な評価と網膜機能の電気生理学的な評価を行った。また遺伝子発現変化をreal-time PCRで行った。

## 4. 研究成果

網膜病的血管新生の病態形成においてHIFが重要な役割を果たしていることを確認するために、病的血管誘導初期・後期・退縮期のマウスから網膜を摘出しリアルタイムPCRを実施した。その結果、病的血管誘導後期においてHIFとHIFの標的遺伝子の発現の亢進を確認した。次にこのモデルに対し既知のHIF阻害剤であるトポテカンとドキシソルピシン

を投与し網膜病的血管新生抑制効果と網膜障害抑制効果を検討した。その結果、トポテカンとドキシソルピシンによる網膜病的血管新生の有意な抑制効果と網膜障害抑制効果が認められた。以上の結果から低酸素誘導因子の阻害というこれまでとは異なるアプローチによる血管新生性網膜変性疾患治療の可能性が示唆された。また、網膜視細胞変性の病態形成において HIF が重要な役割を担っていることを確認するために、光照射を行ったマウスの網膜を摘出しリアルタイム PCR を行った。その結果、HIF と HIF の標的遺伝子の発現の亢進を確認した。次にこのモデルに対し既知の HIF 阻害剤であるトポテカンの投与を行い、組織学的・電気生理学的な手法を用いて HIF 阻害剤の網膜視細胞変性の抑制効果を確認した。これらの結果から既知 HIF 阻害剤の網膜変性モデルへの治療効果を確認し(Miwa Y, Miyauchi M et al. ARVO Annual Meeting 2016、三輪、宮内ら。第 121 回日本眼科学会総会) 新規 HIF 阻害剤のスクリーニング実験により新たな薬剤介入アプローチも可能となりつつある。

#### 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 4 件)

Horie K, Kudo T, Yoshinaga R, Akiyama N, Sasanuma H, Kobayashi TJ, Shimbo M, Jeon H, Miyao T, Miyauchi M, Shirakawa M, Shiba D, Yoshida N, Muratani M, Takahashi S, Akiyama T. Long-term hindlimb unloading causes a preferential reduction of medullary thymic epithelial cells expressing autoimmune regulator (Aire). *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有、2018 DOI:10.1016/j.bbrc.2018.05.060.

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

Torii H, Kurihara T, Seko Y, Negishi K, Ohnuma K, Inaba T, Kawashima M, Jiang X,

Kondo S, Miyauchi M, Miwa Y, Katada Y, Mori K, Kato K, Tsubota K, Goto H, Oda M, Hatori M, Tsubota K. Violet Light Exposure Can Be a Preventive Strategy Against Myopia Progression. *EBioMedicine*. 査読有、2017 DOI:10.1016/j.ebiom.2016.12.007.

Akiyama N, Takizawa N, Miyauchi M, Yanai H, Tateishi R, Shinzawa M, Yoshinaga R, Kurihara M, Demizu Y, Yasuda H, Yagi S, Wu G, Matsumoto M, Sakamoto R, Yoshida N, Penninger JM, Kobayashi Y, Inoue J, Akiyama T. Identification of embryonic precursor cells that differentiate into thymic epithelial cells expressing autoimmune regulator. *J Exp Med*. 査読有、213 巻、2016. DOI: 10.1084/jem.20151780.

##### [学会発表](計 17 件)

Shin-ichi Ikeda, Toshihide Kurihara, Xiaoyan Jiang, Yasuhisa Tanaka, Kiwako Mori, Maki Miyauchi, Hidemasa Torii, Kazuo Tsubota, Morphological changes of scleral fibroblasts in a murine lens-induced myopia model, ARVO2017 Annual Meeting (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, ARVO2017 Annual Meeting (国際学会) 2017 年

Xiaoyan Jiang, Kiwako Mori, YASUHISA TANAKA, Shin-ichi Ikeda, Maki Miyauchi, Erisa Yotsukura, Hidemasa Torii, Toshihide Kurihara, Kazuo Tsubota, A dose dependent myopic shift in refraction and axial length in a murine model of lens-induced myopia, ARVO2017 Annual Meeting (国際学会) 2017 年

Yohei Tomita, Yukihiro Miwa, Maki Miyauchi, Ayako Ishida, Hiromitsu Kunimi, Yusaku Katada, Kazuo Tsubota, Toshihide Kurihara, A selective PPAR modulator has preventive effects in murine models of retinopathy, ARVO2017 Annual Meeting (国際学会) 2017 年

Kiwako Mori, Toshihide Kurihara, Xiaoyan Jiang, Erisa Yotsukura, Yasuhisa Tanaka, Shin-ichi Ikeda, Maki Miyauchi, Hidemasa Torii, Kazuo Tsubota, Transient exposure of high concentration oxygen induces sustained myopia in adult mice, ARVO2017 Annual Meeting, 2017 年

姜效炎、栗原俊英、森紀和子、田中康久、池田真一、宮内真紀、四倉絵里沙、鳥居秀

成、坪田一男、新規レンズ誘導マウス近視モデルの確立及び誘導レンズ屈折力依存性の検討、第121回日本眼科学会総会、2017年

富田洋平、三輪幸裕、宮内真紀、石田文子、國見洋光、堅田侑作、坪田一男、栗原俊英、選択的 PPAR 刺激によるマウス網膜症モデルでの抗血管新生および神経保護効果、第121回日本眼科学会総会、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 阻害剤トポテカンによるマウス網膜病的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

森紀和子、栗原俊英、姜効炎、四倉絵里沙、田中康久、池田真一、宮内真紀、鳥居秀成、坪田一男、成体マウスに対する高酸素負荷により持続的な近視が誘導される、第121回日本眼科学会総会、2017年

池田真一、姜効炎、田中康久、森紀和子、宮内真紀、鳥居秀成、坪田一男、栗原俊英、マウスレンズ誘導近視モデルにおける強膜リモデリングに関する細胞間クロストーク、第121回日本眼科学会総会、2017年

Xiaoyan Jiang、Toshihide Kurihara、Maki Miyauchi、Shin-ichi Ikeda、Kiwako Mori、Kinya Tsubota、Hidemasa Torii、Kazuo Tsubota、A comparison of form deprivation myopia with lens-induced myopia using newly designed eyeglasses for mice、The 16th International Myopia Conference (国際学会)、2017年

Kiwako Mori、Toshihide Kurihara、Xiaoyan Jiang、Erisa Yotsukura、Yasuhisa Tanaka、Shin-ichi Ikeda、Maki Miyauchi、Hidemasa Torii、Kazuo Tsubota、Effect of high concentrated oxygen on myopia in neonatal and adult mice、The 16th International Myopia Conference (国際学会)、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

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ランス 2016 年年次大会、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

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)  
なし

取得状況(計 0件)  
なし

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮内 真紀 (MIYAUCHI, Maki)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員  
研究者番号: 70757830