

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11486

研究課題名(和文) 網膜疾患におけるVGF修飾ペプチドを創薬ターゲットとした治療薬の創成

研究課題名(英文) Development of therapeutic drugs targeting VGF-modifying peptides in retinal diseases

研究代表者

嶋澤 雅光 (Shimazawa, Masamitsu)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80381721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において、網膜神経節細胞に対するVGFの作用を明らかにするために、マウス視神経挫滅モデルおよびラット培養網膜神経節細胞を用いてVGFペプチドの作用を検討し、VGF由来C末ペプチドであるVGF588-617 (AQEE30)は、1) マウス軸索挫滅モデルにおける網膜神経節細胞死抑制作用、2) ラット新生仔網膜より単離した培養網膜神経節細胞に対して細胞生存促進作用および神経突起伸長作用があることを明らかにした。さらに、より短鎖の既知及び新規のVGF由来ペプチドの神経突起伸長作用を検討し、数種類のVGF由来短鎖ペプチドにおいて神経突起伸長促進作用が認められることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規VGFペプチドが緑内障をはじめとした網膜疾患治療薬として応用することを目的としている。これらの課題を解決することにより、直接的に網膜神経節細胞を保護するような治療薬のない本領域において全く新しい画期的な治療法の開発に繋げることができるかもしれない。

研究成果の概要(英文)： In this study, to clarify the effects of VGF nerve growth factor inducible (VGF), a secreted neuropeptide, on retinal ganglion cells, we examined the effects of VGF peptides using mouse optic nerve crush model and cultured rat retinal ganglion cells. As a result, we found that AQEE30 has 1) a protective effect on retinal ganglion cell death after optic nerve crush in mice, and 2) promoting effects on survival of retinal ganglion cells and neurite outgrowth in rat cultured retinal ganglion cells. In addition, known and novel shorter VGF-derived peptides were investigated, and some VGF-derived peptides were more effective in promoting neurite outgrowth than a combination of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and ciliary neurotrophic factor (CNTF).

研究分野：薬理学

キーワード：網膜神経節細胞 緑内障

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

緑内障は、我が国における中途失明原因の第1位を占める失明疾患であり、緑内障の40歳以上の平均有病率は約5%、20人に1人の割合で存在する(多治見スタディー; 文献1)。しかし、眼圧下降療法以外に緑内障に対して有効な治療法は存在せず、眼圧を十分に下降しても視野障害が進行する患者が多数存在する。したがって、緑内障の病態解明および直接網膜神経節細胞を保護するような治療法の開発が望まれている。近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などに代表される神経変性疾患において、神経細胞内に異常なタンパク質が凝集体を形成していることが報告され、その神経変性と小胞体ストレスとの関連性が注目されている。これまで申請者らは、網膜神経節細胞死における小胞体ストレスの関与について検討し、それを初めて明らかにした(文献2, 3)。さらに申請者らは、小胞体ストレス細胞死を抑制する化合物を見出すことを目的に培養神経節細胞を用いてツニカマイシン誘発小胞体ストレス細胞死に対するスクリーニングから小胞体ストレス細胞死を抑制するいくつかの天然成分および化合物を見出した。そのなかで、抗酸化作用およびNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>チャネル遮断作用を有する(2S)-1-(4-amino-2,3,5-trimethyl phenoxy)-3-(4-[4-(4-fluorobenzyl)phenyl]-1-piperazinyl)-2-propanol dimethanesulfonate (SUN N8075)が最も強力にその細胞死を抑制することを見出した。そこで、SUN N8075の小胞体ストレス細胞死抑制作用の機序についてDNAマイクロアレイを用いた解析を行い、いくつかの標的候補分子を同定した(文献4)。そのなかで、VGF nerve growth factor inducible (VGF)遺伝子の発現がSUN N8075処置単独およびツニカマイシン併用下において著明に増加することを見出し、VGF siRNAによるVGF発現抑制によりSUN N8075の保護作用はほぼ完全に消失した。さらに、一過性のVGF遺伝子導入によりツニカマイシン細胞死は有意に抑制された(文献4)。これらの結果は、SUN N8075の小胞体ストレス細胞死に対する保護作用がVGFの発現を介しており、VGFが小胞体ストレス細胞死抑制作用を有し、VGFが小胞体ストレスを介した神経変性に対して保護作用を有していることを強く示唆する。VGFはエネルギーバランスの維持および海馬シナプスの可塑性への関与が報告されている神経分泌タンパク質で、神経栄養因子であるNerve growth factor (NGF)およびBrain-derived neurotrophic factor (BDNF)により誘導されることが知られている(文献5, 6)。そこで、自然発症緑内障モデルマウス(DAB/2J, 15ヶ月齢)の網膜におけるVGFの発現を蛍光免疫染色により検討したところ、対照の正常マウス網膜と比較して緑内障マウス網膜においてVGFの発現が著明に増加していることが明らかになった。全長VGFタンパク質はprohormone convertases 1/3および $\alpha$ PC1/3, PC2)により切断され、VGF<sub>588-617</sub>(AQEE-30)、VGF<sub>556-576</sub>(TLQP-21)など6種類以上のVGFペプチドが産生されることが報告されている(図1)。しかしながら、網膜神経節細胞変性過程における細胞死、軸索変性、軸索再生機構におけるVGFの関与並びにVGFの網膜神経節細胞への直接作用については十分解明されていない。

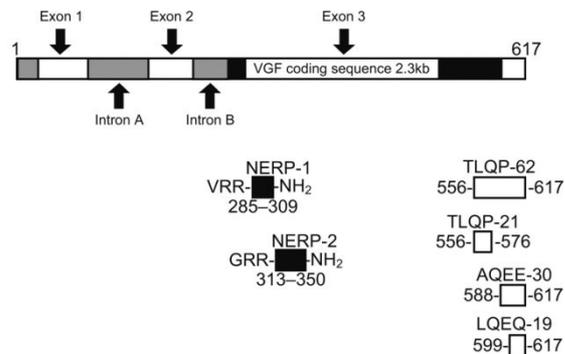


図1. 全長VGFとVGFペプチド

Toshinai and Nakazato (Cell Mol Life Sci. 66, 1939-1945, 2009)より引用

### 2. 研究の目的

本研究では、網膜神経節細胞変性過程における細胞死、軸索変性、軸索再生機構におけるVGFの関与の解明、6種類以上報告されているVGFペプチドの網膜神経節細胞への直接的な細胞保護作用を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験的緑内障(視神経挫滅)モデルの作製

##### 網膜神経節細胞の蛍光標識

マウスにケタミンおよびキシラジンの混合麻酔液を腹腔内投与した。その後、脳定位固定装置に固定し、頭がい骨を露出させた。顕微鏡下、Fluorogoldの注入点を、脳の表面からの深さ2 mm、前後方向の軸に沿ってプレグマの後ろ2.92 mm、正中線の横0.5 mmの場所に右半球・左半球それぞれ定めた。定めた点に手術用ドリルで穴を開け、マイクロシリンジを用いてフルオロゴールド(4% in saline)を1  $\mu$ L (0.5  $\mu$ L/min) 注入することにより、上丘より逆行性に網膜神経節細胞を蛍光標記した。

##### 視神経挫滅モデルの作製

ケタミン120 mg/kgおよびキシラジン6 mg/kgの混合麻酔液を腹腔内投与した。その後、結膜を切開し、切開した結膜の端を持ち眼球を鼻側に動かし慎重に視神経を露出させた。眼球後方約0.5-1 mmの部位でネガティブピンセット(Dumont#7, Jura, Switzerland)を使用し、10秒間視神経を挫滅した。眼球を元の位置に戻し、感染症を防ぐために少量のタリビット眼軟膏0.3%を塗り眼球の保護を行った。視神経挫滅10日後にマウス眼球を摘出し、4%パラホル

ムアルデヒド含有 0.1M PB (pH7.4) 液中で 6~8 時間固定した。固定した眼球は、0.01 M PBS に浸しながら顕微鏡下で角膜および水晶体を切除し、色素上皮から網膜を分離し、網膜を強膜から完全に剥離した。その後、網膜を四分円に切り、平面状態にして Fluoromount (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) で封入し、網膜フラットマウント標本を作製した。その後蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて蛍光観察を行った。撮影は顕微鏡 (Power BX50; Olympus) にデジタルカメラ (Coolpix 4500, Nikon) を装着して行った。

## (2) 免疫染色

マウス眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M PB (pH 7.4) にて 24 時間、4°C で固定した。ついで 25%スクロース含有 0.1 M PB (pH7.4) 液に 48 時間、4°C で浸漬した。その後、O.C.T. compound によって凍結した眼球を包埋し、速やかに液体窒素で凍結し、薄切するまで -80°C にて保存した。クリオスタット (Leica) を用いて、-20°C で眼球後 1,000~1,500  $\mu\text{m}$  の位置で厚さ 10  $\mu\text{m}$  の切片を作成し、MAS コーティングされたカバーガラス (Matsunami) に載せ、-80°C で保存した。網膜凍結切片を染色時 -80°C より取り出し -20°C で 1 時間放置した後、4°C で 1 時間、室温で 2 時間乾燥させ、Super PAP pen (Thermo Scientific) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。その後、PBS に浸して O.C.T. Compound を洗浄した。その後、0.3% Triton X-100 含有 10% goat serum により 1 時間ブロッキングを行った。続いて、一次抗体を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、蛍光標識した二次抗体によって 1 時間反応させ、Fluoromount (水溶性封入基材) で封入した。一次抗体には、rabbit anti-VGF polyclonal antibody [1:50 dilution: Abcam (Cambridge, MA, USA)], mouse anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) monoclonal Antibody [1:500 dilution: Millipore (Bedford, MA, USA)], mouse anti-Glutamine Synthetase (GS) monoclonal Antibody (1:1000 dilution: Millipore)、mouse anti-Neurofilament-Heavy (NF-H) antibody (1:1000 dilution: Millipore) を用いた。二次抗体にはそれぞれ Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG、Alexa Fluor®488 goat anti-mouse IgG、Alexa Fluor®546 donkey anti-rabbit IgG [1:1000 dilution: Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)] を用いた。また、ネガティブコントロールとして、一次抗体を除いたコントロールを用意した。染色した組織標本は、共焦点レーザ走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; Olympus) を用いて撮影した。

## (3) VGF の硝子体内投与

視神経挫滅の直後に AQEE-30 (50  $\mu\text{M}/2 \mu\text{l}/\text{eye}$ ) または溶媒 (PBS) の硝子体内投与、ポジティブコントロールとしてプリモニジン (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) の腹腔内投与を行った。感染症を防ぐために少量のタリビット眼軟膏 0.3% を塗り眼球の保護を行った。視神経挫滅 2、5 日後に、小動物用麻酔器 (Soft Lander, Sin-ei industry Co., Ltd.) を用い、笑気ガス 70%、酸素ガス 30% 下において麻酔導入時には 3.0% イソフルランを、麻酔維持には 1.5% イソフルランを使用し、マウスに麻酔をかけた。その後、AQEE-30 (50  $\mu\text{M}/2 \mu\text{l}/\text{eye}$ ) または溶媒 (PBS) の硝子体内投与を行った。感染症を防ぐためにクラビット点眼剤 0.3% を点眼し、眼球の保護を行った。

## (4) 培養網膜神経節細胞における細胞生存および神経突起伸張に対する VGF 由来ペプチドの作用

培養網膜神経節細胞は、two-step panning 法により生後 5 日の新生仔ラット網膜より単離・培養した。培養 24 時間後に AQEE-30 (1  $\mu\text{M}$ )、より短鎖の VGF ペプチドまたは BDNF (終濃度 50 ng/mL)/CNTF (終濃度 10 ng/mL) を添加し、添加 48 時間後の細胞生存および神経突起伸張に対する作用を calcein-AM および抗 Tuj-1 抗体による染色によりそれぞれ定量評価した。

## (5) 統計学的解析

実験成績は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。統計学的な比較は、SPSS Statistics (IBM, Armonk, NY, USA) を用いて Student's t-test あるいは Dunnett's test により解析した。危険率が 5% 未満を有意差有りとした。

## 4. 研究成果

### (1) 視神経挫滅後の網膜における VGF タンパクの発現およびその局在

蛍光免疫染色法を用いて、網膜上部における VGF タンパクの発現変化およびその局在を検討した。視神経挫滅後より網膜における VGF タンパク質の発現は増加し、1 週間後に有意な増加が認められた。そこで、VGF 発現量の増加が認められた視神経挫滅 7 日後の網膜組織標本を用いてその局在変化について検討した。視神経挫滅 7 日後の網膜において、VGF タンパクの発現は網膜神経線維層 (RNFL)、神経節細胞層 (GCL) および内網状層 (IPL) の全体で上昇しており、特に GCL の細胞周辺での顕著な発現が認められた。Sham 群と視神経挫滅後 7 日群の両群において、VGF はミュラーグリアのマーカーであるグルタミン合成酵素 (GS) と共同在していた (図 2)。さらに、アストロサイトのマーカーである GFAP と VGF は一部共同在していた (データは未掲載)。一方で、VGF は神経軸索マーカーである NF-H とは共同在していなかった (デー

タは未掲載)。

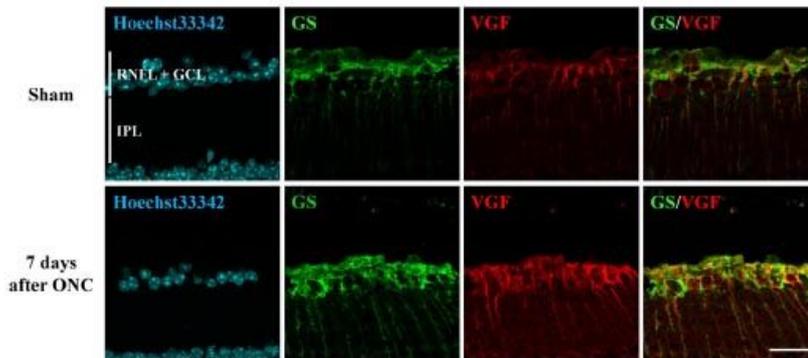


図 2. 視神経挫滅 7 日後の網膜における VGF 発現およびその局在変化  
VGF 発現(赤色)は、GS 陽性ミュラー細胞(緑色)と共局在し、その一部は GFAP 陽性アストロサイトと共局在した。Scale bar = 25 μm.,  
Takeuchi, et al., Sci Rep 2018; 8(1): 16443.より改変引用(文献 7)。

### (2) 視神経挫滅モデルにおける VGF ペプチドの保護作用の検討

視神経挫滅誘発 RGC 死に対する VGF ペプチドである AQEE-30 の作用を検討した。本検討では、過去に保護作用が報告されているブリモニジン(陽性対照薬)として用いた。図 3A は、蛍光標識した RGC の代表例を示している。Sham 群と比較し、Vehicle 群における RGC 数は有意に減少した。Vehicle 群と比較し、VGF ペプチド投与群およびブリモニジン投与群では RGC 数の減少を有意に抑制した (図 3B, C)。

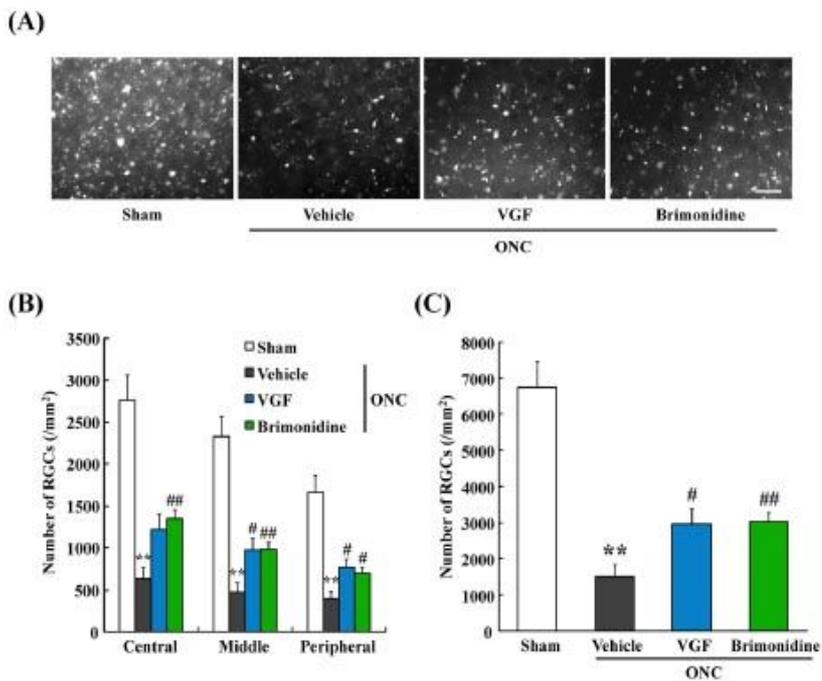


図 3. 視神経挫滅後の網膜神経節細胞死に対する VGF 由来ペプチドの作用  
(A) 軸索挫滅 10 日後の網膜伸展標本におけるフルオロゴールド標識 RGC の代表画像 (B) 網膜周辺～中心領域における生存 RGC 数. (C) 総生存 RGC 数. Data are shown as means ± S.E.M. (n = 4-12). \*\*P < 0.01 vs. sham group (Student's t-test). #P < 0.05, ##P < 0.01 vs. vehicle-treated group (Student's t-test). Scale bar = 50 μm. Takeuchi, et al., Sci Rep 2018; 8(1): 16443.より改変引用(文献 7)。

### (3) 培養網膜神経節細胞における神経突起、軸索伸張に対する VGF 由来ペプチドの作用

ラットより単離・培養した網膜神経節細胞に VGF 由来ペプチドを添加し、神経突起および軸索伸張作用について検討したところ、AQEE-30 に神経突起および軸索伸張促進作用が認められた(図 4)。また、より短鎖の VGF ペプチドについても検討を行い神経突起伸張作用について確認した (特許出願のためデータは未掲載)。これらの活性は神経栄養因子である

BDNF/CNTF の作用と比較して同等またはそれ以上であった。

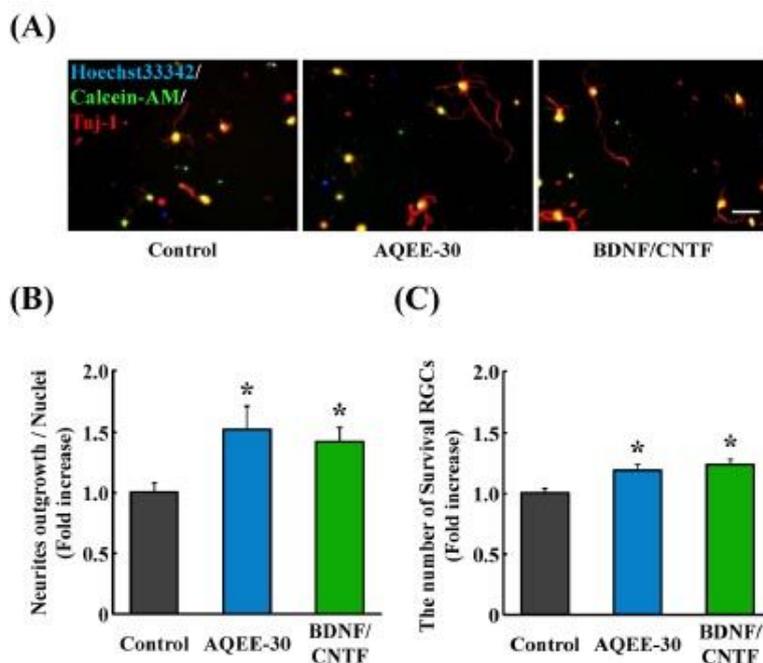


図 4. 培養網膜神経節細胞における VGF 由来ペプチド(AQEE-30)の神経突起伸張および生存細胞数に対する作用. (A) ラット由来培養網膜神経節細胞の単離 3 日後の代表画像を示す. 生存 RGC および神経突起は、Calcein-AM (緑色) および抗 Tuj-1 抗体 (赤色)によりそれぞれ蛍光標識した. (B) 神経突起長の定量結果.(C) 細胞生存数の定量結果. Data are the means  $\pm$  SEMs (n = 6). \*P < 0.05 vs. control group (Student's t-test). Scale bar = 50  $\mu$ m. (C). Takeuchi, et al., Sci Rep 2018; 8(1): 16443.より改変引用(文献 7).

これらの結果から、視神経挫滅後の網膜神経節細胞障害に対して VGF は保護作用を有しており、緑内障などの網膜疾患の治療ターゲットとして有用であることが示唆された。

< 引用文献 >

- 1) 鈴木康之, 他. 日眼会誌. 2008;112:1039-1058.
- 2) Shimazawa M et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 2007; 48: 3729-3736.
- 3) Shimazawa M et al. Mol Vis 2007;13:578-587
- 4) Shimazawa M et al. PloS One 2010;5:e15307.
- 5) Bozdagi O et al., J Neurosci 2008; 28: 9857-9869.
- 6) Alder J et al., J Neurosci 2003; 23: 10800-10808.
- 7) Takeuchi, et al., Sci Rep 2018; 8: 16443.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeuchi H, Inagaki S, Morozumi W, Nakano Y, Inoue Y, Kuse Y, Mizoguchi T, Nakamura S, Funato M, Kaneko H, Hara H and Shimazawa M	4. 巻 8
2. 論文標題 VGF nerve growth factor inducible is involved in retinal ganglion cells death induced by optic nerve crush	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-34585-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masamitsu Shimazawa
2. 発表標題 The effect of VGF nerve growth factor inducible on retinal ganglion cell injury after optic nerve crush in mice.
3. 学会等名 ARVO 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋澤 雅光
2. 発表標題 緑内障患者iPS細胞より分化誘導した網膜細胞を利用した緑内障の病態解明
3. 学会等名 第91回日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋澤雅光
2. 発表標題 緑内障の神経保護治療への研究アプローチ
3. 学会等名 第37回日本眼薬理学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	原 英彰  (Hara Hideaki)  (20381717)	岐阜薬科大学・薬学部・教授    (23701)	