

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16955

研究課題名(和文)カルパイン抑制ペプチドによる網膜変性遅延効果の光干渉断層計(OCT)による解析

研究課題名(英文)Optical coherence tomographic analysis of the effect of calpain inhibiting peptide on the delay of retinal degeneration

研究代表者

高橋 静(Takahashi, Shizuka)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00747925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性は遺伝子異常に基づく視細胞の変性により細胞死が起こり、網膜変性となって暗順応障害や視野狭窄などの視覚障害が生じる。この視細胞死の過程でカルパインというタンパク分解酵素が活性化することが知られている。本研究はカルパインの1つの酵素タンパクを特異的に阻害するペプチドを徐放するデバイスを用い、そのデバイスを眼球結膜下に埋植することで将来的に網膜色素変性の新規の薬物療法を開発することに主眼が置かれた。研究期間中にデバイスを作成し、網膜色素変性モデルラットであるRCSラットに安全に埋植されることを確認した。ただし、その効果については確認できず、今後の課題となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性に対する治療法開発の一環として、視細胞保護により視細胞死の発症を遅延させ、その結果重篤な視覚障害に陥るまでの時間を延長させるという手段があり、本研究は視細胞保護療法の新規開発として位置づけられる。視細胞内でカルパインを持続的に抑制できればその結果として視細胞死の進行を遅延できるという考えに基づいている。本研究者は所属する研究室で明らかにしたカルパインを特異的に阻害するペプチドを持続的に網膜に到達させることの出来る徐放デバイスを作成してその効果を検討した。本研究によって、薬剤徐放という新規の視細胞保護治療法への新たな研究への方向性が示されたものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Retinitis pigmentosa is caused by the photoreceptor cell death due to gene mutations, leading to visual disturbances like night blindness and visual field constriction. During the photoreceptor cell death mechanisms, it has been known that calpain, a kind of proteases, becomes activated. This study was aimed to develop a new drug delivery device which would slowly deliver peptide molecules that specifically inhibit activation of calpain into the eye. The device was intended to be implanted under the bulbar conjunctiva. In this study, the researcher made a calpain inhibitor device, and confirmed that it was able to be safely implanted under the RCS rat conjunctival tissue. However, the effect of this device on the RCS rat photoreceptor protection was not detected. This point became a future point that should be clarified.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素変性 視細胞死 カルパイン 徐放システム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は遺伝性の視細胞変性疾患で、視細胞杆体変性を初発とし、次第に視細胞錐体変性へと進行する。したがって、初期症状として夜盲などの暗順応障害が生じ、徐々に周辺部から求心性に視野狭窄が進行する。その後、やがて中心視野障害から視力低下や色覚異常へと進むのを特徴としている。本疾患は、本邦における視覚障害の原因疾患の14%を占め、緑内障に次いで第2位に位置する視覚障害対策としては主要な疾患に位置する。本疾患に対する治療法には根本的かつ画期的なものは未だ存在しないが、本疾患の原因遺伝子異常や視細胞変性機構が次第に明らかになるにしたがって、様々な角度から新規の治療法が画策されるようになってきた。代表的な方策として以下の4点が挙げられる。

1. 視細胞保護療法。視細胞変性の病態はアポトーシスやネクロプトーシスなど様々な様式の視細胞死によって引き起こされるとの理解のもと、視細胞死の反応経路を抑制することで視細胞死の進行を遅延させ、結果として網膜変性の進行を阻止することを目的とする治療手段。薬物療法が主要な手段となる。
2. 遺伝子治療。網膜色素変性の原因遺伝子変異を明らかにして、変異遺伝子に代わる健常遺伝子を導入することで、先天的に欠失しているタンパク質を補充する治療法。遺伝子補充療法は主として劣性遺伝性疾患に適応となるが、優性遺伝性疾患に対しては近年遺伝子編集を用いた遺伝子治療の方法も模索されている。*RPE65* 遺伝子はすでに患者用に承認されている。
3. 再生医療。ES細胞やiPS細胞に代表される幹細胞を用いて、健常な網膜や視細胞を再生させ、それらの細胞を患者網膜へ移植する方法。
4. 人工網膜。光刺激を電気反応に変換するのが視細胞の本来の機能であることに注目して、光を電気に変換するデバイスを直接網膜に装着して電気信号を網膜の細胞に伝達する治療法。

以上のような、研究法が考案され、それぞれの分野で盛んに研究が進んでいるのが現況である。本研究では第1の視細胞保護治療法の一環として、視細胞死に関与することが明らかにされているカルパインに対してそれを特異的に抑制するペプチドを利用した視細胞保護治療法の開発に主眼が置かれている。

2. 研究の目的

本研究者の研究室では近年網膜色素変性モデル動物(RCSラット)における視細胞変性の進行過程でカルパイン活性が亢進しているのを発見した(文献1)。このことはカルパインが視細胞死の反応過程で重要な位置を占めるのではないかという事を示唆する(文献2)。とくにミトコンドリアに局在するミトコンドリアカルパイン(1, 2型)はアポトーシス誘導因子(AIF)を限定分解することにより活性化させ、核内への移動を促進することで細胞死を引き起こさせるという過程を仮説として予想した(文献1)。引き続き、ラットミトコンドリアカルパイン1の活性化に際してそれを特異的に阻害するペプチドを同定し(文献3)、そのペプチドのRoyal College of Surgeons) RCSラットおよびロドプシンP23HおよびS334terトランスジェニックラットへの点眼投与によって視細胞変性を遅延化させることを明らかにした(文献3, 4)。このことはカルパイン阻害ペプチドを用いた新しい網膜色素変性治療法の開発への可能性を示すものであった。しかし、ペプチドそのものが生体内で容易に分解されるためその半減期が短く、有効な点眼療法を考案するとしてもラットのような菲薄な強膜をもつ動物であっても1日4回以上の点眼を持続する必要がある、実際の臨床応用を考えた場合、それ以上の点眼回数や高濃度点眼を要することが予想され、患者へのアドヒアランスや点眼剤の保存に難があると感じられた。そこで、ペプチドを効果的に徐放できるデバイスがあれば、それを球結膜下の強膜上に埋植することにより徐放面から持続的に強膜へ浸透させ、網膜視細胞へ送達できるのではないかと考えるに至った。東北大学大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センター細胞治療学部門にて開発された眼科用薬物徐放デバイスにカルパイン阻害ペプチドを封入したものを作成して、網膜色素変性モデルラット(RCSラット)の球結膜下強膜上に安全確実に埋植が可能か否か、また、そのような方法が可能だとして、埋植されたデバイスから徐放されたペプチドが視細胞変性の進行にどのような効果を及ぼすのかについて明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) カルパイン阻害ペプチド徐放デバイスの作成

東北大学大学院医学系研究科補綴創生応用医学研究センター細胞治療学部門(阿部俊明教授)に依頼して、ラットミトコンドリアカルパイン-1を特異的に阻害するペプチド(細胞内取り込みTat配列を含む23アミノ酸残基: GRKKRRQRRRPPQPDALKSRTLRL, MW 2857.35)の配列ならびに対照として用いる逆配列の生理効果を持たないペプチド配列(23アミノ酸残基: GRKKRRQRRRPPQASLRLDRPTK, MW 2857.35)をラット用薬物徐放デバイスに含有させたものの作成を依頼した。

(2) カルパイン阻害ペプチド徐放デバイスのラット球結膜下強膜上への埋植

野生型RCSラット野生型および変異型ラットの生後20日前後の個体を全身麻酔(メドミジン、ミダゾラム、ブトルファノール腹腔内注射)にて眠らせた後、眼球にはプロカイン点眼にて局所麻酔を加え、右眼には阻害(活性型)ペプチド、左眼には対照(非活性型)ペプチドを含む

デバイスを埋植した。埋植に際しては、上耳側象限の角膜輪部にて球結膜切開を施行し、結膜下組織を鈍的に剥離した後、デバイスを結膜下に挿入し、輪部結膜切開部を8-0 バイクリルにて1糸縫合することで創を閉鎖した。埋植後には感染予防のためモキシフロキサシン点眼薬を投与した。

(3) カルパイン阻害ペプチド徐放デバイスの効果判定

野生型においてはデバイス埋植による副作用や合併症の有無の確認、変性型においては視細胞変性遅延作用の有無について検討した。埋植後、4週間ラットは通常の明暗環境下で飼養した。4週間後に網膜の形態所見については光干渉断層計 (optical coherence tomography, OCT, Micron IV™) にて、また機能面では網膜電図 (electroretinography, ERG, Micron IV™) にて評価した。ERGは12時間暗順応の後、 $3.0 \text{ cd}\cdot\text{sec}\cdot\text{m}^{-2}$ の光強度の刺激で全視野刺激を行い、杆体錐体最大刺激 ERGを記録した。ERG測定後ラットを安楽死させた後、眼球摘出を行い光学顕微鏡による組織所見と電子顕微鏡所見を検討した。

4. 研究成果

(1) 野生型 RCS ラットでの効果

野生型 RCS ラットの生後18日齢5頭を用い、右眼に活性型ペプチド、左眼に非活性型ペプチド含有徐放デバイスを球結膜下強膜上に埋植した。28日後、生後46日齢にてOCT、47日齢にてERGおよび眼球摘出を行った。いずれの計測においてもラット網膜には活性型ペプチド群および非活性型ペプチド群には異常所見はみられなかった (図1)。これらの所見からカルパイン阻害ペプチド含有徐放デバイスには眼球や網膜に対して病的な異常反応を引き起こす可能性は殆どないと結論され、安全にラット眼球に埋植出来ることが明らかになった。

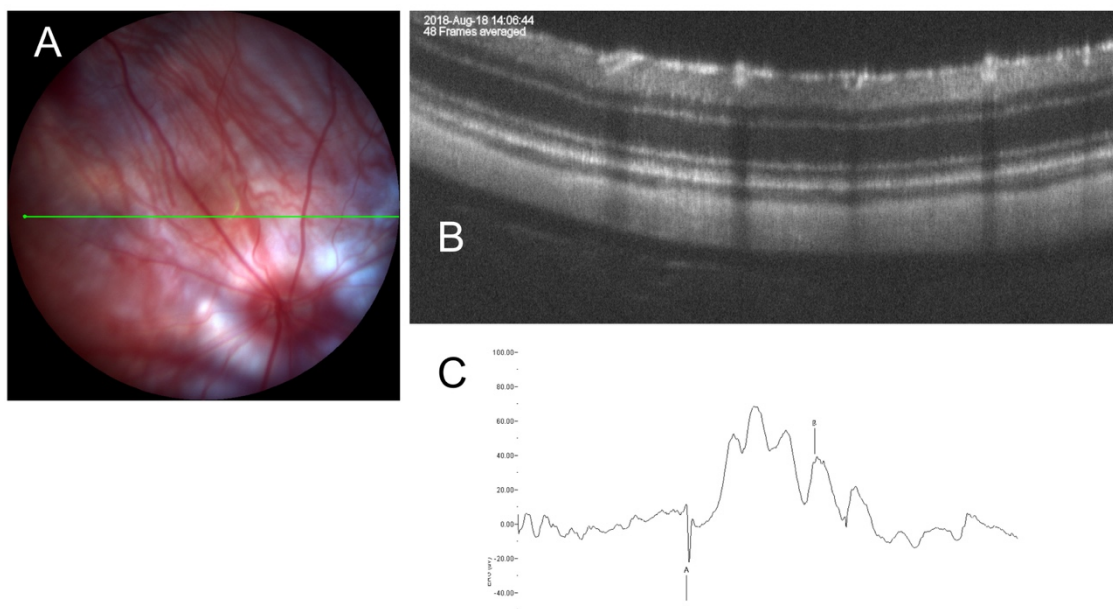


図1. 18日齢の野生型 RCS ラットへの結膜下強膜上カルパイン阻害ペプチド徐放デバイス埋植28日後の眼底写真 (A)、OCT (B) および ERG (C) 所見を示す。いずれも異常所見はみられなかった。

(2) 変異型 RCS ラットでの効果

変異型 RCS ラットの生後21日齢4頭と生後17日齢4頭の計8頭を用い、ランダムに4頭の右眼に活性型ペプチド徐放デバイスおよび他の4頭の左眼に非活性型ペプチド徐放デバイスを埋植した。29日後、生後50日および46日後にOCT、その翌日にERGを計測した。その結果、活性型デバイス埋植眼においては、僚眼の非埋植眼と比較してOCTならびにERGのいずれでも定性的かつ定量的に両者の間には差異は認められなかった (図2および図3)。非活性型デバイス埋植眼でも僚眼との間に定性的および定量的な差異はみられなかった。以上の結果から、今回の研究ではカルパイン阻害ペプチド徐放デバイスによるRCSラットでの網膜変性進行に対するあきらかな阻止効果はみられなかった。かつて、本研究室でのカルパイン阻害ペプチドの点眼による変性進行阻止効果は明らかであった (文献3) が、今回のデバイスでは効果がみられなかった点について、埋植方法やデバイスそのものの問題が考慮されるが、それらについてさらに見直しを行い、かつ使用する網膜変性ラットの種類を変えてみるなどの考察を重ねてさらに研究

を進める必要があることが示唆された。

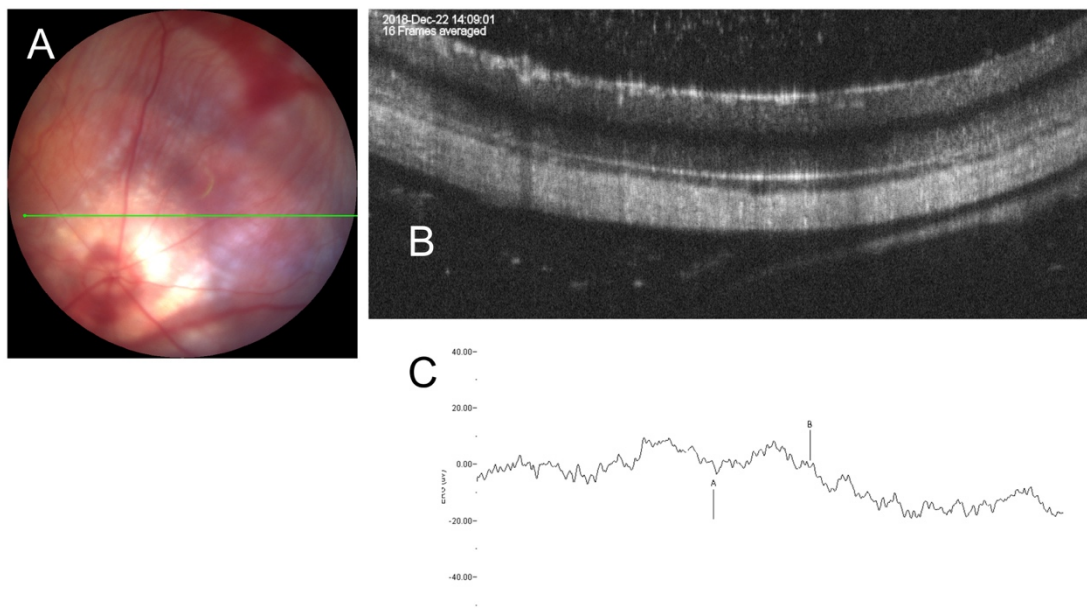


図 2. 21 日齢変性型 RCS ラットの無処置眼の 28 日後 (49 日齢) の網膜変性所見。眼底写真 (A)、OCT (B)、ERG (C) を示す。視細胞変性の進行にともなって、OCT にて視細胞外節層の高輝度化と ERG にて a 波と b 波の著しい振幅の低下がみられる。

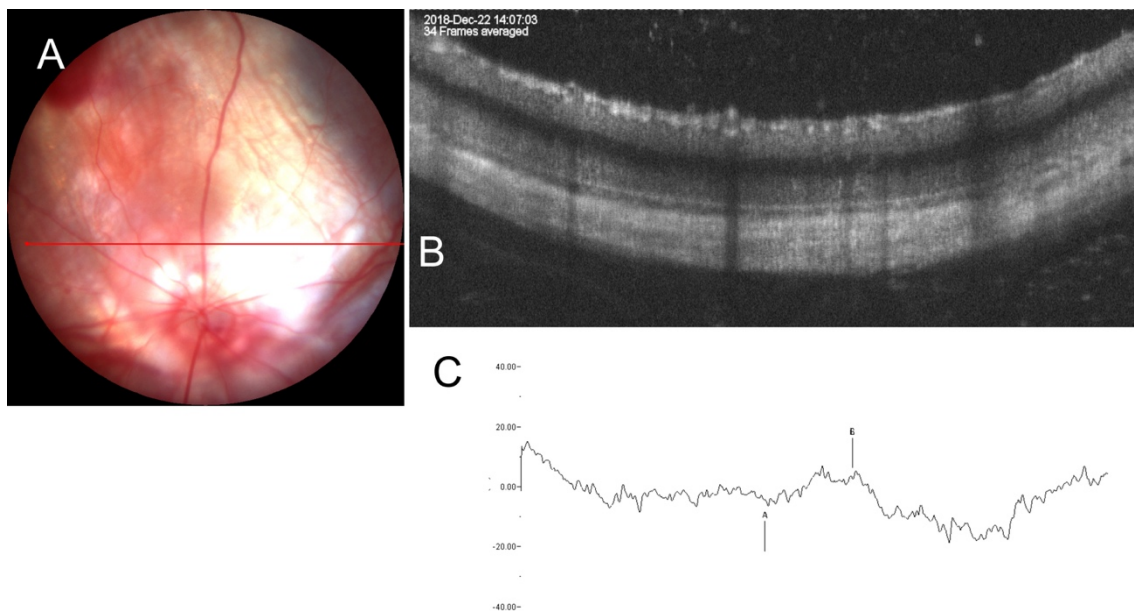


図 3. 21 日齢変性型 RCS ラットのカルバイン阻害ペプチド徐放デバイス結膜下強膜上埋植 28 日後の眼底写真 (A)、OCT (B) および ERG (C) 所見を示す。視細胞変性の度合いは対照眼と比較して定性的にも定量的にも有意な差はみられなかった。

<引用文献>

1. Mizukoshi S, Nakazawa M, Sato K, Ozaki T, Metoki T, Ishiguro S. Activation of mitochondrial calpain and release of apoptosis-inducing factor from mitochondria in RCS rat retinal degeneration. *Exp Eye Res.* 91: 353-361, 2010.
2. Arango-Gonzalez B, Trifurovic D, Sahaboglu A, Kranz K, Michalakis S, Farinelli P Koch S, Koch F, Cottet S, Janssen-Bienhold U, Dedek K, Biel M, Zrenner E, Euler T Ekström P, Ueffing M, Paquet-Durand F. Identification of a common non-apoptotic cell death mechanism in hereditary retinal degeneration. *PLoS One.* 9: e112142, 2014.
3. Ozaki T, Nakazawa M, Yamashita T, Sorimachi H, Hata S, Tomita H, Baba A, Ishiguro S. Intravitreal injection or topical eye-drop application of a μ -calpain C2L domain peptide protects against photoreceptor cell death in Royal College of Surgeons rats, a model of retinitis pigmentosa. *Biochim Biophys Acta – Molecular Basis of Disease* 1822, 1783-1795, 2012.
4. Ozaki T, Ishiguro S, Hirano S, Baba A, Yamashita T, Tomita H, Nakazawa M. Inhibitory peptide of mitochondrial μ -calpain protects photoreceptor degeneration in rhodopsin transgenic S334ter and P23H rats. *PLoS One.* 8: e71650, 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamauchi K, Tanabu R, Monai N, Gonome T, Xie Y, Takahashi S, Ishiguro S, Nakazawa M	4. 巻 2018
2. 論文標題 The spectral domain optical coherence tomography findings associated with morphological and electrophysiological changes in a rat model of retinal degeneration, rhodopsin S334twr-4 rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 ID 5174986
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1155/2018/5174986	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 -

1. 著者名 Tanabu R, Sato K, Monai N, Yamauchi K, Gonome T, Xie Y, Takahashi S, Ishiguro S, Nakazawa M	4. 巻 14
2. 論文標題 The findings of optical coherence tomography of retinal degeneration in relation to the morphological and electroretinographic features in RPE65 - / - mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0210439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1371/journal.pone.0210439	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 -

1. 著者名 Suzuki Y, Adachi K, Takahashi S, Maeno A, Nakazawa M	4. 巻 6
2. 論文標題 Oxidative stress in the vitreous fluid with rhegmatogenous retinal detachment	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 682-686
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4172/2155-9570.1000682	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 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 静、中澤 満
2. 発表標題 色素性静脈周囲網脈絡膜萎縮の4症例の臨床的特徴
3. 学会等名 第135回青森眼科集談会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 毛内奈津姫、田名部玲子、山内宏大、高橋 静、安達功武、中澤 満
2. 発表標題 ロドブシンP23H変異ラットの網膜変性過程のOCT所見による解析
3. 学会等名 第121回日本眼科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山内宏大、田名部玲子、毛内奈津姫、高橋 静、安達功武、中澤 満
2. 発表標題 ロドブシンS334ter変異ラット網膜変性過程のOCT所見
3. 学会等名 第121回日本眼科学会総会
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