

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18344

研究課題名（和文）網膜変性疾患における熱ショック転写因子1の病態解明と網膜神経保護薬の開発

研究課題名（英文）Pathophysiology of heat shock transcription factor 1 in retinal degenerative diseases and development of retinal neuroprotective drugs

研究代表者

波多野 誠（Hatano, Makoto）

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90860669

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、網膜神経細胞保護における熱ショック転写因子1(HSF1)の分子機序を明らかにすることを目指した。今回の研究では光誘因性網膜変性モデルにおけるHSF1と関連する分子を同定した。RNAシーケンシング、およびPCR検査にてMsp27がHSF1ノックアウト群において発現亢進を示した。すなわち光刺激によっておこるHSF1の神経保護作用の中でMsp27がそのシグナル経路に関与していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性などの網膜変性疾患は不可逆的な組織障害を引き起こし、最終的には社会的失明に至る予後不良な疾患である。現状の治療では根治は困難であり、網膜変性発症の機序や新たな治療や予防的な知見が求められている。熱ショック転写因子1(HSF1)は、高温、酸化ストレス、タンパク質毒性物質への曝露などのストレスに応答してシャペロンの発現を調節する転写制御因子である。本研究では網膜における神経細胞の機能障害および細胞死の分子機序にHSF1およびMsp27を介した網膜神経保護作用機序を明らかにした。今後さらなる研究により網膜変性疾患の新たな予防や治療法の開発に繋げたい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to show the molecular mechanism of heat shock transcription factor 1 (HSF1) in retinal neuron protection. We identified HSF1-associated molecules in a light-induced retinal degeneration model, and RNA sequencing and PCR assays showed that Msp27 was upregulated in the HSF1 knockout group. This indicates that Msp27 is involved in the signaling pathway of the neuroprotective effect of HSF1 induced by light stimulation.

研究分野：眼科学関連

キーワード：網膜変性 HSF1 HSP

### 1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性や黄斑ジストロフィーなどの網膜変性疾患は不可逆的な組織障害を引き起こし、最終的には社会的失明に至る予後不良な疾患である。現状の治療では根治は困難であり、網膜変性発症の機序や新たな治療や予防的な知見が求められている。熱ショック転写因子 1 (HSF1) は、高温、酸化ストレス、タンパク質毒性物質への曝露などのストレスに応答してシャペロンの発現を調節する転写制御因子である。ハンチントン病、パーキンソン病など神経変性疾患において HSF1 活性の障害が認められており、脳における神経細胞の機能障害および細胞死に HSF1 が密接に関連している。本研究では網膜における神経細胞の機能障害および細胞死の分子機序を解明し、HSF1 の網膜変性における役割について明らかにする。さらに、HSF1 を介した網膜神経保護作用機序を明らかにし、網膜変性疾患の新たな予防や治療法の開発に繋げたい。

### 2. 研究の目的

本研究の目的では、網膜神経細胞保護における HSF1 の分子機序を明らかにし、最終的には種々の原因による網膜変性疾患の抑制ならびに網膜神経保護作用を有する新たな治療薬の開発である。本研究で、光刺激が網膜に与える反応に対して HSF1 がどのように関与しているか、および HSF1 がもたらす神経保護の作用機序を解明する。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下の項目について検討を行い、その機序を明らかにした。

#### (1) 光誘因性網膜変性モデルにおける HSF1 と関連する分子の同定

HSF1 ノックアウトマウスを用いて、光刺激による網膜障害における HSF1 と関係する分子や機能パスウェイを検討するため網羅的 RNA シークエンス解析を行った。HSF1 ノックアウトマウスおよび野生型マウスに光刺激を与え、24 時間後に網膜から RNA を抽出し次世代シークエンサーで解析する。結果から、HSF1 の有無が mRNA レベルで光誘因性網膜変性モデルにどのような変化をもたらしているか、さらにはどのような細胞機能パスウェイが関与しているか明らかにした。

#### (2) 光誘因性網膜変性モデルにおける HSF1 の神経保護作用の検討

(1)より得られた結果から、光誘因性網膜変性モデルにおいて、変化しているタンパク質の発現ならびに局在変化をウエスタンブロットティングおよび組織免疫染色にて同定した。さらに、siRNA、ブロッキング抗体や阻害薬などを用いて、関連タンパク質の発現、機能抑制を試み、細胞死などの組織学的な変化を検討し、HSF1 を介した神経保護性に及ぼしている影響の程度を明らかにした。

#### (3) 網膜神経細胞の培養細胞における HSF1 関連分子の機能解析

CRISPER/Cas9 system による HSF1 ノックアウト網膜神経細胞株 (661w HSF1<sup>-/-</sup>) を既に樹立していたことから、(1)から得られた研究結果を光刺激にて変化する HSF1 の下流分子の局在、発現、並びに細胞機能への関与を *in vitro* で検討した。

#### (4) 網膜神経細胞の培養細胞における神経保護作用の検討

(3)により得られた結果から、変化しているタンパク質の発現ならびに核移行などの局在変化をウエスタンブロットティングおよび細胞免疫染色にて同定し、siRNA、ブロッキング抗体や阻害薬などを用いて、関連タンパク質の発現、機能抑制を試み、細胞死を *in vitro* で検討した。

### 4. 研究成果

本研究では、網膜神経細胞保護における熱ショック転写因子 1(HSF1)の分子機序を明らかにし、最終的には種々の原因による網膜変性疾患の抑制ならびに網膜神経保護作用を有する新たな治療薬の開発を目指した。

#### (1) 光誘因性網膜変性モデルにおける HSF1 と関連する分子の同定

同母のマウスからサンプル調整した実験では HSF1 に関連する分子としてクリスタリン蛋白の RNA が RNA シークエンスにて同定された。尚、HSF1 遺伝子は受精に関与していることから、同母のマウスからのサンプル調整には 1 年以上の時間を要した。そこで、別母のマウスを用いてを同実験の再現実験を行った。RNA シークエンスで検出されたもののうち、Msp27 のみが HSF1 ノックアウト群において発現亢進を示した。Hsp40, Hsp70, Hsp110, Mcl1, Bcl2, Bid, Bad, BAG3, Bax, Cryaa, Cryab, Crya1, Crygc については明らかな有意差は認められなかった。

#### (2) 光誘因性網膜変性モデルにおける HSF1 の神経保護作用の検討

実験(1)に時間を要したため、未検討である。

#### (3) 網膜神経細胞の培養細胞における HSF1 関連分子の機能解析(4)網膜神経細胞の培養細胞における神経保護作用の検討

CRISPER/Cas9 system による HSF1 ノックアウト網膜神経細胞株(661w HSF1<sup>-/-</sup>)に様々な照

射条件を検討した結果、光量 1500lux、24 時間で光刺激により、661w HSF1<sup>-/-</sup>に生じたアポトーシスは野生型 661W のものに比較して細胞数あたりのアポトーシスの発生率の減少を確認した。一方で、光刺激を受けた 661wHSF1<sup>-/-</sup>は接着性能が落ちることを確認した。すなわち、CRISPER/Cas9 system により樹立した 661w HSF1<sup>-/-</sup>を用いた実験においては、細胞成分のサンプル回収が難しいことが分かった。

(4) 網膜神経細胞の培養細胞における神経保護作用の検討

網膜神経細胞の培養は光刺激により細胞成分のサンプル回収が困難であり、未検討である。

ここまでの実施した研究成果からは HSF1 が光誘因性網膜変性モデルにおいて mRNA およびタンパク質で調べた結果から、光刺激に対して神経保護性の作用を有していることが分かった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yanai R, Nishida T, Hatano M, Uchi SH, Yamada N, Kimura K	4. 巻 61
2. 論文標題 Role of the Neurokinin-1 Receptor in the Promotion of Corneal Epithelial Wound Healing by the Peptides FGLM-NH2 and SSSR in Neurotrophic Keratopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci	6. 最初と最後の頁 29-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.61.8.29	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 Wakuta M, Nomi N, Ogata T, Ohta M, Yamashiro C, Hatano M, Yanai R, Tokuda K, Kimura K	4. 巻 258
2. 論文標題 A Trinity regimen with aflibercept for treatment-naive neovascular age-related macular degeneration: 2-year outcomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 1663-1670
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00417-020-04745-1	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 Yamashiro C, Tokuda K, Kobayashi Y, Higashijima F, Yoshimoto T, Ohta M, Ogata T, Ashimori A, Kobayashi M, Hatano M, Uchi SH, Wakuta M, Kimura K	4. 巻 11
2. 論文標題 Benzalkonium chloride-induced myofibroblastic transdifferentiation of Tenon's capsule fibroblasts is inhibited by coculture with corneal epithelial cells or by interleukin-10	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 16096-16096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-94852-8	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 Kobayashi Y, Tokuda K, Yamashiro C, Higashijima F, Yoshimoto T, Ohta M, Ogata T, Ashimori A, Hatano M, Kobayashi M, Uchi SH, Wakuta M, Kimura K	4. 巻 11
2. 論文標題 Inhibition of epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelial cells by a retinoic acid receptor- agonist	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 11842-11842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-90618-4	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11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 波多野 誠
2. 発表標題 眼科スタッフのための糖尿病診療に必要なKeyword&Trivia
3. 学会等名 第15回やまぐち眼科スタッフ講習会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波多野 誠
2. 発表標題 網膜色素上皮細胞におけるネクローシスによる血管内皮増殖因子の分泌に関する研究
3. 学会等名 第136回山口県眼科医会秋季総会並びに集談会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青木 連, 波多野 誠, 緒方 惟彦, 湧田 真紀子, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 無硝子体眼の治療抵抗性糖尿病黄斑浮腫に対してt-PA硝子体注射が有用であった一例
3. 学会等名 第74回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山城 知恵美, 徳田 和央, 小林 由佳, 小林 正明, 波多野 誠, 永井 智彦, 寺西 慎一郎, 徳田 信子, 木村 和博
2. 発表標題 点眼防腐剤によるテノン囊線維芽細胞の形態変化に対する角膜上皮細胞の抑制作用と機序
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 由佳, 山城 知恵美, 小林 正明, 波多野 誠, 徳田 和央, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 RAR- agonistによるsubretinal fibrosisの抑制作用
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 波多野 誠, 徳田 和央, 小林 由佳, 山城 知恵美, 内 翔平, 小林 正明, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 光誘因性の網膜変性モデルにおけるHSF1の神経保護性についての検討
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 波多野 誠, 湧田 真紀子, 山本 和隆, 新井 栄華, 榎 美穂, 富士本 一志, 山内 一彦, 石川 桂二郎, 園田 康平, 木村 和博
2. 発表標題 糖尿病黄斑浮腫患者へのラニピズマブ非反応群への局所レーザー併用療法の評価に関する探索的研究
3. 学会等名 第60回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湧田 真紀子, 能美 なな実, 太田 真実, 小林 由佳, 竹中 優嘉, 東島 史明, 緒方 惟彦, 波多野 誠, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 滲出型加齢黄斑変性の抗新生血管療法における導入期治療後の再発性に関与する因子
3. 学会等名 第60回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波多野 誠, 太田 真実, 小林 由佳, 湧田 真紀子, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 Evaluation of microaneurysms in -VEGF-resistant DME
3. 学会等名 第27回日本糖尿病眼学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳井 亮二, 内 翔平, 緒方 惟彦, 波多野 誠, 小林 正明, 永井 智彦, 寺西 慎一郎, 木村 和博
2. 発表標題 ぶどう膜炎続発緑内障に対するROCK阻害薬による早期の眼圧下降効果
3. 学会等名 第54回日本眼炎症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波多野 誠, 宮崎 智景, 長谷川 実茄, 緒方 惟彦, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 当院における 3Dビジュアルシステム使用の実際
3. 学会等名 第71回山口眼科手術懇話会
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------