

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 5 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22692

研究課題名（和文）網膜内層神経障害の分子メカニズムの解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of inner retinal neurodegeneration and development of novel therapies

研究代表者

國見 洋光（Kunimi, Hiromitsu）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：40877073

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、本邦の失明原因第一位の緑内障をはじめとした網膜内層神経細胞障害を生じる疾患における網膜神経細胞死の分子メカニズムを解明することで、その新規治療法開発に繋げることを目的とした。

網膜内層神経障害を生じさせる動物モデルを用いて、網膜内層の神経細胞死に低酸素誘導因子1 α （HIF-1 α ）とその下流の100ほどの遺伝子の中からBNIP3という原因遺伝子を発見した。また、網膜においてこのBNIP3遺伝子を阻害すると、同じように網膜に障害を加えても神経保護作用があることを見出した。これらの結果から、緑内障の新規治療にBNIP3阻害が有用であると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最終目的である緑内障に対する新規治療開発について、HIF-1 α /BNIP3経路の阻害という新しい可能性を見出すことができた。本邦の失明原因第一位である緑内障治療は、現在のところ点眼、手術ともに眼圧下降という対症療法のみであり、根本的な新規治療開発が待たれる状況である。網膜神経節細胞という網膜内層にある細胞が細胞死を引き起こすことで緑内障が発症するが、その分子メカニズムを解明でき、かつ動物モデルでも証明できたことは今後ヒトでの治療法開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the molecular mechanisms of retinal nerve cell death in diseases that cause nerve cell damage in the inner retina, including glaucoma, the leading cause of blindness in Japan, and to develop new treatments for such diseases. Using an animal model of neurodegeneration of the inner retina, we discovered hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and its downstream gene, BNIP3, among about 100 genes, as the causative genes for neuronal cell death in the inner retina. We also found that inhibition of this BNIP3 gene in the retina had a neuroprotective effect even when the same damage was inflicted on the retina. These results suggest that BNIP3 inhibition may be useful in the novel treatment of glaucoma.

研究分野：網膜神経細胞

キーワード：HIF-1 α BNIP3 眼虚血再灌流 網膜神経節細胞 緑内障

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

網膜における重度の虚血・低酸素ストレスは、不可逆的な神経変性を引き起こす可能性がある。網膜虚血性疾患のうち、緑内障、網膜中心動脈閉塞症、虚血性視神経症は、急性網膜虚血または高眼圧により網膜内層変性を引き起こすとされている。これらの網膜神経変性疾患は現在の治療では対症療法のみであり、これらの疾患に対する新規治療法開発が待たれる。

低酸素誘導因子 (HIF) は、低酸素状態への適応に重要な役割を果たす。網膜の虚血やその他の細胞ストレス条件下では、網膜の HIF は安定化し、低酸素状態の網膜細胞に新生血管形成や病的な嫌気性代謝への移行を誘導する。ヒトでは、急性網膜虚血により局所的な HIF-1 α の発現が増加することが報告されており、慢性的に進行した緑内障網膜や視神経頭部でも HIF-1 α の発現増加が観察されている。これらの報告は、網膜虚血疾患における神経変性進行に HIF 制御が関係している可能性を示唆している。

網膜虚血再灌流 (I/R) マウスモデルは、網膜中心動脈閉塞症や緑内障などの急性虚血性網膜内膜疾患の実験的動物モデルとして、網膜内層の機能障害や神経変性の研究によく用いられている。このマウスモデルを使って、以前我々は、既知の HIF-1 α 阻害剤トポテカンが網膜変性に対して保護効果を有することを報告した。さらに我々は、薬剤スクリーニングにより新規の HIF-1 α 阻害剤ハロフジノンを見出し、網膜虚血モデルマウスにおいてハロフジノンが網膜の HIF-1 α を阻害し神経保護効果を持つことを報告した。これらの研究結果から、網膜虚血における HIF-1 α の過剰発現が、網膜神経節細胞 (RGC) を含む網膜内膜変性と関連していることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、網膜内層の神経細胞障害に HIF-1 α が関与していることを、上記動物モデルを用いてさらに検証した。HIF はプロモータータンパクであり、その下流には 100 ほどの遺伝子が報告されている。そのため、HIF の下流のどの遺伝子が具体的に網膜神経細胞死に関与しているかを検証することで、その分子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) 網膜虚血による神経変性における HIF タンパクの発現が網膜神経細胞死へ関与していることを検証するため、感覚網膜特異的 Hif-1 α コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製し用いた。これらのマウスに網膜 I/R を誘発し、Hif-1 α cKO が網膜 I/R 後の網膜の HIF 標的遺伝子発現に影響を与えるかどうか検証した。また、網膜 I/R による HIF タンパクの発現、網膜菲薄化、RGC 減少、および視覚誘発電位による視機能障害についてコントロールマウスと比較検証した。

(2) 網膜 I/R による網膜全体の遺伝子発現の変化は以前から報告されているが、我々はより具体的に、主な変性部位である網膜内層に着目した。レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により神経線維層と RGC 層を含む網膜内層サンプルのみを採取し、そのサンプルを用いて qPCR アレイを実施した。HIF の下流に位置する遺伝子の中から、qPCR アレイによって網膜内層神経障害の責任遺伝子を絞り込み、BNIP3 についてさらに検証した。

(3) Hif-1 α cKO マウスが網膜 I/R による網膜内層障害を有意に抑制するという結果を受け、次に HIF-1 α の発現が網膜神経細胞死と直接関連するかを検証した。マウス網膜神経細胞株 661W において、CRISPR-SpCas9 システムで HIF-1 α KO 細胞株を作製し、低酸素環境下または偽低酸素下での遺伝子発現と細胞死についてコントロール細胞と比較した。

(4) BNIP3 が低酸素条件下の網膜細胞死メカニズムに関与しているか検証するために、661W 細胞株から Bnip3 KO 細胞株も作製し、同様の検証を行った。

(5) 我々はこれまでの研究で、ハロフジノンとトポテカンという HIF 阻害剤がマウス網膜全体の Hif-1 α の発現を有意に抑制し、神経変性を抑制することを報告していた。しかし、網膜内側におけるその発現と Bnip3 の発現の変化については、これまで検討されていなかった。そこで、まず網膜 I/R 後にマウスへ PBS 投与、ハロフジノン投与、トポテカン投与、および感覚網膜特異的 Hif-1 α cKO マウス網膜から網膜内側の RNA サンプルを抽出した。そして、これらのサンプルを用いて、Hif-1 α および Bnip3 の発現を比較した。次に、網膜内側の BNIP3 の発現抑制が網膜 I/R に対して網膜神経保護作用を有するかどうかを検証するために、AAV2-CRISPR/Cas9 系を用いて網膜内側の Bnip3 ノックアウトを試み、網膜 I/R 後の網膜内側の Bnip3 発現の変化を調べた。この Bnip3 cKO マウスを用いて、網膜 I/R による網膜障害を検証した。

4. 研究成果

(1) 以前の我々の報告で、網膜 I/R により網膜全体で Hif-1 α と代表的な HIF 標的遺伝子である血管内皮増殖因子 a (Vegfa)、グルコーストランスポーター 1 (Glut1)、3-phosphoinositide dependent protein kinase 1 (Pdk1) の発現変化が見られた。これらの遺伝子における発現が Hif-1 α cKO マウスで抑制された。また、網膜 I/R 後の HIF-1 α 発現を調べたところ、Hif-1 α cKO マウスでは HIF-1 α の誘導は見られなかった。また我々の以前の研究では、網膜 I/R による網膜菲薄化や RGC 数の減少は、HIF 阻害剤の投与により抑制された。Hif-1 α cKO マウスでは、

I/R 後の網膜菲薄化（全網膜厚および内網膜厚で分析）がコントロールマウスと比較して抑制された。Hif-1 α cKO マウスはコントロールマウスと比較して I/R 誘発 RGC の細胞死を有意に抑制していた。またマウスの視機能検査としての視覚誘発電位の比較では、コントロールマウスで見られた網膜 I/R による VEP 振幅の減少が、Hif-1 α cKO マウスでは有意に抑制されていることがわかった。

(2) 網膜 I/R により影響を受ける HIF の下流遺伝子は、qPCR によって 89 個とされた。その中から 6 遺伝子 (Annexin A2; Anxa2, Bnip3, Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; Eif4ebp1, Coagulation factor III; F3, Lectin galactose binding soluble 3; Lgals3 and Placental growth factor; Pgf) は著しく発現が上昇していた。一方、有意に低下した遺伝子は 6 つあった (Ataxia telangiectasia and rad3 related protein; Atr, DnaJ (Hsp40) homolog subfamily C member 5; Dnajc5, Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor; Hif1an, Hepatic nuclear factor 4, alpha; Hnf4a, Solute carrier family 2 facilitated glucose transporter member 1; Slc2a1 and Transferrin receptor; Tfrc)。これらの 12 遺伝子のうち、Bnip3 は HIF-1 α の標的遺伝子であり、細胞死やオートファジーに関与することが知られている。この結果から、I/R 誘発の網膜内層神経障害の分子メカニズムの一端として、HIF-1 α /BNIP3 経路を検証することになった。

(3) コントロール 661W 細胞では、1%低酸素条件下で HIF-1 α および BNIP3 の発現が増加したが、Hif-1 α KO 細胞ではこれらの発現が抑制された。1%低酸素条件下では、Hif-1 α KO 細胞はコントロール細胞に比べて細胞死の割合が低かった。塩化コバルト CoCl₂ (cobalt (II) chloride hexahydrate) による偽低酸素酸化ストレス条件においても、タンパク発現の変化や細胞死に関して同様の結果が得られた。これまでの研究で、低酸素による細胞死は BNIP3 経路を介した切断型カスパーゼ 3 の活性化に関与している可能性が示唆されている。そこで、本システムにおいて切断型カスパーゼ 3 の活性を検討したところ、1%低酸素または CoCl₂ によるその活性のわずかな上昇が、Hif-1 α KO 細胞では減少していた。

(4) Bnip3 KO 細胞では BNIP3 の発現は検出されず、1%低酸素条件下で HIF-1 α の発現が増加し、コントロール細胞と同様であった。Bnip3 KO 細胞では、細胞死が有意に抑制されていた。偽低酸素酸化ストレス条件においても、タンパク質発現の変化や細胞死について同様の結果が得られた。

(5) 網膜 I/R 後の Hif-1 α および Bnip3 の発現の上昇が、ハロフジノン投与群、トポテカン投与群および Hif-1 α cKO 群において、PBS 投与群と比較して減少していることを見出した。また、AAV2-Bnip3-CRISPR を注入した網膜内層特異的 Bnip3 KO マウスの網膜内層の Bnip3 の発現は、シャッフル sgRNA を注入した網膜内層に対して 72%に減少し、統計的に有意であった。次に、Bnip3 KO 網膜はコントロールと比較して、網膜 I/R による網膜全層および内層の菲薄化に対して保護的であることがわかった。さらに、Bnip3 KO 網膜は網膜 I/R に対する RGC の生存率を向上させた。Bnip3 KO マウスは、視機能評価においても I/R による視機能障害を抑制する効果があった。

結論として、我々の研究では HIF-1 α /BNIP3 経路が網膜 I/R によって引き起こされる網膜内層神経障害のメカニズムの一つであることが示唆された。今後さらなる研究が必要であるが、網膜虚血性疾患や緑内障などの網膜内層神経障害に対して HIF-1 α や BNIP3 を阻害することが、有効な新規治療法であることと期待される。

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 0件）

1 . 著者名 Kunimi Hiromitsu、Lee Deokho、Ibuki Mari、Katada Yusaku、Negishi Kazuno、Tsubota Kazuo、Kurihara Toshihide	4 . 巻 35
2 . 論文標題 Inhibition of the HIF - 1α /BNIP3 pathway has a retinal neuroprotective effect	5 . 発行年 2021年
3 . 雑誌名 The FASEB Journal	6 . 最初と最後の頁 e21829
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202100572R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------