

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03094

研究課題名（和文）低分子化合物カクテルによる急性期網膜再生医療

研究課題名（英文）Acute retinal regenerative medicine with low molecular weight cocktail

研究代表者

園田 康平（Sonoda, Koh-Hei）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：10294943

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000 円

研究成果の概要（和文）：今回網膜内在ミューラー細胞を視細胞へ分化誘導させる、以下の4種類の低分子化合物を同定した。

1. SB431542：トランスフォーミング成長因子 阻害剤 2. LDN193189：骨形成タンパク質阻害剤 3. CHIR99021：グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 阻害剤 4. DAPT：-セクレターゼ阻害剤

4種類の低分子化合物によりミューラー細胞がロドプシンを恒常的に発現する。網膜へ定着させることにより、疾患モデルにおいて一部網膜機能の回復が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

眼科領域での再生医療は目覚ましく発展し、ES細胞やiPS細胞を用いて網膜細胞を再構成できるようになった。一方、幹細胞由来細胞を補充する再生医療には倫理的・経済的ハードルがあり、機能再生まで道りは長い。炎症状態でグリア細胞が神経前駆細胞へ「リプログラミング」されることから、先行研究でそのプロセスを促進する候補遺伝子スクリーニングを行った。本研究ではその中から必須遺伝子を決定し、治療に耐える低分子化合物カクテルを決定した。さらに疾患モデルで治療プロトコルを最適化した。決定的ダメージを受ける前に、眼局所で原疾患治療と同時に「急性期」網膜再生医療（網膜疾患先制治療）に道を拓くものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified four small molecule compounds that induce the differentiation of retinal endogenous Muller cells into photoreceptor cells.

1. SB431542: transforming growth factor beta inhibitor 2. LDN193189: osteogenic protein inhibitor 3. CHIR99021: glycogen synthase kinase 3 beta inhibitor 4. DAPT: -secretase inhibitor

The discovery of these four small molecule compounds could revolutionize the treatment of retinal diseases. They cause Muller cells to permanently express rhodopsin and fix it in the retina, leading to a significant partial recovery of retinal function in disease models.

研究分野：眼科

キーワード：網膜再生医療 リプログラミング ロドプシン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

眼科領域での再生医療は目覚ましく発展し、ES細胞やiPS細胞を用いて網膜細胞を再構成できるようになった。一方、幹細胞由来細胞を補充する再生医療には倫理的・経済的ハードルがあり、機能再生まで道のりは長い。申請者は「視機能喪失前に、原疾患治療と同時に進行再生医療」を別立てで考えてきた。

炎症状態でグリア細胞が神経前駆細胞へ「リプログラミング」される。我々は後眼部疾患(含む緑内障)の「自然再生医療」を目指す研究を行ってきた。これまで「網膜剥離モデル」「実験的ぶどう膜炎モデル」「視神経挫滅モデル」の3つのマウス疾患モデルで、ミューラー細胞から誘導される自己増殖能を獲得した前駆細胞を高い精度で抽出し、遺伝子スクリーニングを行った。シングルセル由来のRNAを分離し、次世代シーケンサーでゲノム解析を行い、ミューラー細胞から3疾患に共通して変動する因子を特定した。さらにプロテオーム解析を併用し、精製細胞分画からタンパクを抽出し、二次元電気泳動を行い、ソフトウェア上で3疾患共通して変動するタンパクを同定した。ゲノム解析と共通して変動する因子を選ぶことで、34因子まで候補因子を絞りこんだ。

2. 研究の目的

決定的ダメージを受ける前に、眼局所で原疾患治療と同時に進行“急性期”網膜再生医療(網膜疾患先制治療)に道を拓く。本研究ではその中から必須遺伝子を決定し、治療に耐える低分子化合物カクテルを決定する。さらに疾患モデルで治療プロトコルを最適化する。

3. 研究の方法

2021年度：網膜神経分化必須遺伝子の確定

我々は後眼部疾患(含む緑内障)の「自然再生医療」を目指す研究を行ってきた。これまで「網膜剥離モデル」「実験的ぶどう膜炎モデル」「視神経挫滅モデル」の3つのマウス疾患モデルで、ミューラー細胞から誘導される自己増殖能を獲得した前駆細胞を高い精度で抽出し、遺伝子スクリーニングを行った。シングルセル由来のRNAを分離し、次世代シーケンサーでゲノム解析を行い、ミューラー細胞から3疾患に共通して変動する因子を特定した。さらにプロテオーム解析を併用し、精製細胞分画からタンパクを抽出し、二次元電気泳動を行い、ソフトウェア上で3疾患共通して変動するタンパクを同定した。ゲノム解析と共通して変動する因子を選ぶことで、34因子まで候補因子を絞りこんだ(以前プロテオーム解析で見出したDRP-2,DRP-3,STIP1が含まれた。Tokuda K, Sonoda KH et al. *BBRC*, 2015)。順次ゼブラフィッシュおよびメダカの2種類の魚類で候補遺伝子ノックダウンを行い、大きく網膜形質の異常が認められる因子を特定する。かつ病的網膜においてリプログラミングを介した神経分化に必須となる遺伝子(4~5程度)を絞り込む。

2022年度：網膜神経再生を促す低分子化合物カクテルの最適化

前年度までに絞り込んだ遺伝子について、個別にグリア細胞株を用いて遺伝子発現をルシフェラーゼで測定できるレポーター細胞を作成する。その上で複数の低分子化合物ライブラリーを用いて、各遺伝子を効率よく発現または抑制する低分子化合物を同定する。

2023年度：カクテル治療薬の効果検証

前年度で最適化された低分子化合物カクテルについて、疾患モデルで有効性を確認し製剤化を進める。製剤化において問題となる、用法用量についても検証を行う。疾患モデルは「網膜剥離モデル」「実験的ぶどう膜炎モデル」「視神経挫滅モデル」を用いる。網膜機能評価は網膜電図と動物用光干渉断層計を用いて評価する。同時に組織学的評価も行う。

4. 研究成果

今回網膜内在ミューラー細胞を視細胞へ分化誘導させる、以下の4種類の低分子化合物を同定した。

SB431542：トランスフォーミング成長因子 阻害剤、LDN193189：骨形成タンパク質阻害剤、CHIR99021：グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 阻害剤、DAPT：-セクレターゼ阻害剤

4 種類の低分子化合物によりミュラー細胞がロドプシンを恒常的に発現するようになり、網膜へ定着させることにより、疾患モデルにおいて一部網膜機能の回復が見られた (Fujii Y, et al. *PLoS ONE*. 2023;18: e0282174)。

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 Fujii Yuya, Arima Mitsuru, Murakami Yusuke, Sonoda Koh-Hei	4. 巻 18
2. 論文標題 Rhodopsin-positive cell production by intravitreal injection of small molecule compounds in mouse models of retinal degeneration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0282174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0282174	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
研究分担者	石川 桂二郎 (Ishikawa Keijiro) (00795304)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	武田 篤信 (Takeda Atsunobu) (40560313)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	村上 祐介 (Murakami Yusuke) (50634995)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	有馬 充 (Arima Mitsuru) (60772845)	九州大学・大学病院・学術研究員 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中島 欽一 (Nakashima Kinichi) (80302892)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

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