

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06605

研究課題名(和文)炎症性反応の空間的・時間的制御による新規網膜変性疾患治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel treatment strategy for retinal degenerative diseases by the spatial and temporal control of the inflammatory reactions

研究代表者

坂本 謙司 (SAKAMOTO, Kenji)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：80317065

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)：本研究計画では、緑内障や網膜色素変性といった網膜変性疾患における網膜神経細胞死の進行に、網膜における炎症性反応が何らかの役割を果たしているとの仮説を立て、一連の研究を行った。一般的に炎症を惹起すると考えられているTLR9の刺激が緑内障モデルマウスにおける網膜神経細胞死を抑制すること、およびこの保護作用にはミュラー細胞由来のTNF- α が関与していることが明らかとなった。網膜色素変性モデルマウスにおいてもTLR9やカンナビノイドCB2受容体の刺激が視細胞の小胞体ストレスによる傷害に対して、弱いながらも保護作用を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、網膜神経変性の発症と炎症性反応との間の関係を明らかにすることによって、網膜変性疾患に伴う網膜神経細胞死の発症やその抑制の鍵となる分子を推測・実証するための基礎を得ることができた。今後、本研究で得られた研究成果は、緑内障や網膜色素変性をはじめとする網膜変性疾患に対する神経保護治療法の開発に繋がること期待される。これらの疾患に対する神経保護薬の開発は未だ実現していない現状において、本研究の成果の学術的および社会的意義は大であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, I hypothesize that the inflammatory reaction are at least in part involved in progress of retinal neuronal cell death induced by retinal degenerative diseases, such as glaucoma and retinitis pigmentosa. The present study demonstrated that stimulation of TLR9, which is thought to evoke the inflammatory responses, induced protective effects on the retinal ganglion cells in the retinas of glaucoma model mice, and that TNF-alpha originated from Muller cells was involved in the underlying mechanisms. retinitis pigmentosa model mice were comprehensively analyzed. In addition, the present study showed that stimulation of TLR9 and cannabinoid CB2 receptor induced weak protective effects on photoreceptor cells in the retinas of the retinitis pigmentosa model mice.

研究分野：薬理学

キーワード：薬理学 網膜 神経変性疾患 緑内障 網膜色素変性

1. 研究開始当初の背景

私たちは、眼、耳、鼻といった感覚器から視覚、聴覚、嗅覚などの外界の情報を入手して生活しているが、視覚は感覚器からの情報の 90%以上を占めていると考えられている。網膜変性疾患は、直接的に生命に危険をもたらさないものの、視覚情報の入手を困難にするため、Quality of Life (QOL) を大きく低下させる原因となる。従って、網膜変性疾患の克服は非常に重要な研究課題の 1 つである。我が国における後天性失明原因の第 1 位は緑内障である。

緑内障は、眼圧上昇などの原因により視神経が傷害され、その結果視覚障害をきたす疾患であり、そのまま治療せずに放置しておくとも患者は失明する。我が国では、眼圧が正常にもかかわらず、視神経に緑内障に特有の傷害が認められる正常眼圧緑内障の患者が高眼圧緑内障の患者よりも多いことが知られている。現在、有効性が認められている高眼圧緑内障および正常眼圧緑内障の治療法は、眼圧降下薬や手術による眼圧降下のみであるが、眼圧を十分に下げることができない症例や、眼圧が下がったにもかかわらず視野の狭窄が進行する症例が少なからず存在することから、網膜神経細胞を直接保護する薬物の開発が切望されている。視神経節細胞培養系を用いた *in vitro* の実験系や、*N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 硝子体内注入モデルをはじめとする実験的緑内障モデル動物を用いた神経保護薬の探索が、主に応募者や国内外の研究者によって進められている。しかし、明らかな神経保護作用を示す緑内障治療薬は現在のところ実用化されていない。

網膜色素変性症 (RP) は遺伝病で、厚生労働省が定めた特定疾患治療研究事業対象疾患、いわゆる難病の 1 つであり、進行性の視細胞および網膜色素上皮細胞の変性により視覚障害、ひいては失明を引き起こす疾患である。現在のところ RP による視細胞死を明らかに遅延あるいは停止させる有効な治療法は存在しない。近年、RP 患者に対し iPS 細胞から作製した網膜色素上皮細胞の移植治療の治験が開始されたことが大きな話題となったのは記憶に新しい。また、動物実験レベルにおいては、神経幹細胞を用いた再生医療やウイルスベクターを用いた遺伝子治療による RP の視覚障害遅延効果が報告されている。しかし、これらは視細胞ではなく網膜色素上皮細胞における遺伝子変異が原因の RP に適用したもの、あるいはあらかじめ分かっている原因遺伝子の変異をレスキューしたものであり、個々の患者の発症原因遺伝子が不明であることが多い RP の治療に際しては、原因遺伝子によらず視細胞を保護できる薬物の探索も不可欠である。応募者は、ヒトの常染色体劣性遺伝型 RP において最も多く変異が認められる遺伝子の 1 つであるホスホジエステラーゼ 6 (PDE6) の α サブユニットをコードする *Pde6a* に変異を持つ RP モデルマウスである *nmf363* を世界で初めて同定した。このマウスモデルは *PDE6A* の変異に起因する RP の機序解明やその治療法開発に非常に有用なツールであり、応募者は、本モデルマウス等を活用して、RP により引き起こされる桿体・錐体細胞死の機序解明のための研究を進めているところである。

網膜神経細胞を対象とした神経保護薬の開発には、網膜変性疾患に伴う神経細胞死の機序解明が不可欠である。網膜変性疾患に伴う神経細胞死をテーマとした研究が世界中で精力的に進められているにもかかわらず、未だその機序は明確に解明されているとは言い難い。

2. 研究の目的

これまでに、網膜変性疾患により惹起される網膜神経細胞死のメカニズムに対する炎症性反応の役割に関する研究はあまり進んでいない。微生物感染などによる眼球内の炎症が緑内障を引き起こすことは古くから知られているが、近年、高眼圧緑内障においても、微生物に感染した時と同様に、Toll 様受容体 (TLR) 4 の刺激によりカスパーゼ 8 が活性化され、その結果、網膜神経細胞死が促進されることが報告されており、我々も実験的緑内障モデルの 1 つである *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 硝子体内投与動物において、死細胞から放出され非感染性の炎症反応を惹起する High Mobility Group Box 1 (HMGB1) の中和抗体、TLR4 遮断薬、NF- κ B 活性化阻害薬などの炎症の惹起を抑制する薬物等が、NMDA 硝子体内投与により誘発される網膜神経細胞死を抑制することを報告している。一方、最近、我々は、エンドソームに局在し、主に微生物由来の CpG ヌクレオチドを認識する TLR の 1 種である TLR9 の刺激は神経細胞死が抑制する可能性を見いだした。従って、網膜における炎症性反応に関わる細胞内情報伝達系の活性化は、網膜神経細胞にとって単に傷害性に働くわけではなく、場合によっては保護的にも働くといえる。炎症性反応の惹起に関与している類似の受容体が、網膜神経細胞の生存に対して全く正反対の影響を及ぼす機序を明らかにできれば、神経変性や神経保護を引き起こす鍵となる因子を明らかにできる可能性がある。本研究の目的は、網膜における炎症性反応に関わる細胞内情報伝達系の活性化の空間的・時間的变化と網膜神経細胞死との関係を検討することにより、網膜において神経細胞死や神経細胞の保護を引き起こす鍵となる因子を見いだすこと、そして、得られた研究成果を網膜変性疾患の新規治療法に応用するための基盤づくりを行うことである。

3. 研究の方法

(1) 炎症性反応に関与する分子の網膜における発現部位に関する検討

我々の過去の検討により、NMDA 硝子体内投与誘発緑内障モデル動物において、HMGB1→TLR4/RAGE→NF- κ B シグナル経路は網膜神経細胞傷害性に、TLR9→TNF α →NF- κ B シグナル経路は網膜神経細胞保護的に働くことが明らかとなっている。一般的には上述のどちらの経路も炎症性反応に関与していると考えられているが、網膜においては明らかに異なる細胞応答を引き起こしている。この細胞応答の違いが、関連分子の発現部位の違いで説明できるかどうかを明らかにするため、網膜のパラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学を行い、炎症関連因子である TLR9、HMGB1、TNF- α 、TNF-R1、および TNF-R2 の発現部位を検討する。

(2) 網膜における炎症性反応をマニピュレーションすることによる網膜神経細胞保護治療開発のための基礎的検討

NMDA 硝子体内投与誘発緑内障モデルにおける TLR9 刺激薬の神経保護作用

マウスの硝子体内に NMDA を注入することにより作製した緑内障モデルを用いる。マウスに、TLR9 刺激薬である ODN D-SL01 を硝子体内投与する。その 24 時間後に NMDA を硝子体内投与する。NMDA 投与 7 日後に眼球を摘出し、固定後、網膜ホルマウント標本を作製して Alexa Fluor 488 標識抗 NeuN 抗体で染色することにより網膜神経節細胞を標識する。共焦点レーザー顕微鏡で観察することにより、網膜神経節細胞において ODN D-SL01 が NMDA 誘発神経傷害に与える影響を評価する。また、ODN D-SL01 の神経保護作用に TNF- α が関与しているかどうか調べるため、TNF- α 中和抗体を ODN D-SL01 と同時に投与した際に、ODN D-SL01 の神経保護作用が認められるかどうかを検討した。

ツニカマイシン硝子体内投与誘発網膜色素変性モデルにおける TLR9 刺激薬の神経保護作用

マウスの硝子体内にツニカマイシンを注入することにより作製した網膜色素変性モデルを用いる。マウスに、TLR9 刺激薬である ODN D-SL01 を硝子体内投与する。その 24 時間後にツニカマイシンを硝子体内投与する。ツニカマイシン投与 7 日後に、網膜電図で視機能を計測してから眼球を摘出し、固定後、パラフィン包埋標本を作製して厚さ 5 μ m の薄切切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色する。外顆粒層にある細胞核の数を計測することで、視細胞において ODN D-SL01 がツニカマイシン誘発神経傷害に与える影響を評価する。

抗炎症作用を示すことが報告されているカンナビノイド CB₂ 受容体刺激薬のツニカマイシン硝子体内投与誘発網膜色素変性モデルにおける神経保護作用

マウスの硝子体内にツニカマイシンを注入することにより作製した網膜色素変性モデルを用いる。マウスに、カンナビノイド CB₂ 受容体刺激薬である CB65 とツニカマイシンを同時に硝子体内投与する。投与 7 日後に、網膜電図で視機能を計測してから眼球を摘出し、固定後、パラフィン包埋標本を作製して厚さ 5 μ m の薄切切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色する。外顆粒層にある細胞核の数を計測することで、視細胞において CB65 がツニカマイシン誘発神経傷害に与える影響を評価する。

4. 研究成果

(1) 炎症性反応に関与する分子の網膜における発現部位に関する検討

TLR9 は網膜神経節細胞層に存在する細胞と視細胞内節に発現していた。HMGB1 は、網膜各層に存在する細胞核内に発現していた。TNF-R1 と TNF-R2 は主に網膜神経節細胞層に存在する細胞や視細胞内節、網膜色素上皮細胞などに発現していた。HMGB1 を起点とする反応（神経傷害的）と TLR9 を起点とする反応（神経保護的）が異なるのは、HMGB1 が網膜のほぼ全層において発現しているのに対して、TLR9 は網膜神経節細胞や視細胞内節に局限して発現していることに起因している可能性があるが、今後のさらなる検討が必要である。

TNF- α は正常網膜での発現はほとんど認められなかったが、TLR9 刺激薬である ODN D-SL01 を硝子体内投与した 6 時間後において、網膜において線維状の TNF- α の発現が認められ、この発現部位はミュラー細胞のマーカータンパク質の一つである Glutamine Synthetase の発現部位と一致した。したがって、ODN D-SL01 を硝子体内投与した 6 時間後には、ミュラー細胞において TNF- α の発現が増加する可能性が考えられた。

(2) 網膜における炎症性反応をマニピュレーションすることによる網膜神経細胞保護治療開発のための基礎的検討

NMDA 硝子体内投与誘発緑内障モデルにおける TLR9 刺激薬の神経保護作用

TLR9 刺激薬である ODN D-SL01 をあらかじめ腹腔内投与あるいは硝子体内投与しておき、その 24 時間後に NMDA を硝子体内に投与すると、NMDA により誘発される網膜神経節細胞傷害が抑制されることが明らかとなった。

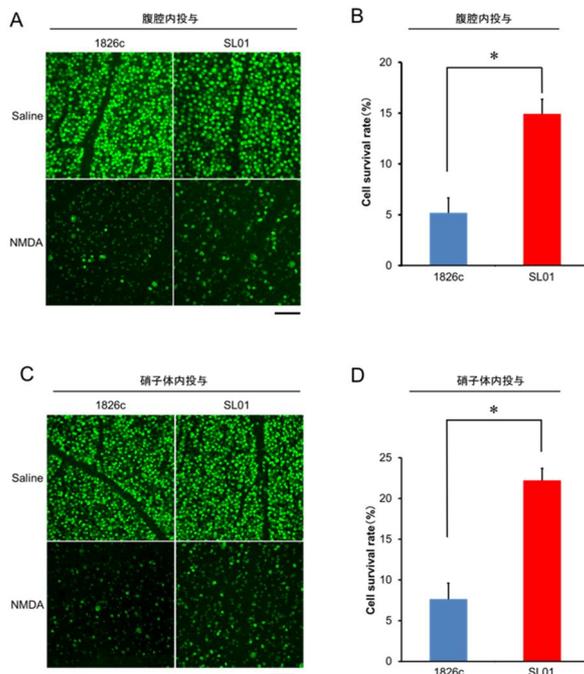


Fig. 1 ODN D-SL01 が NMDA 硝子体内投与により誘発される網膜神経節細胞死に与える影響

A: 1 日目に ODN D-SL01 (SL01) 溶液または ODN 1826c (1826c) 溶液 (陰性対照) を腹腔内投与し, 2 日目に右眼に NMDA, 左眼に Saline を投与した. その 7 日後に眼球を摘出し, 網膜 flat-mount 標本を作製した. Alexa fluor 488 標識抗 NeuN 抗体を用いて染色し, 共焦点レーザー顕微鏡にて画像を取得した. それらの代表的な画像を示す. Scale bar=100 μ m. B: A の細胞残存率を評価したグラフ. C: 1 日目に SL01 または 1826c を硝子体内投与し, 2 日目に右眼に NMDA 溶液 左眼に Saline を投与した. NMDA あるいは Saline の投与 7 日後に眼球を摘出し, 網膜 flat-mount 標本を作製した. Alexa fluor 488 標識抗 NeuN 抗体で染色し, 共焦点レーザー顕微鏡にて画像を取得した. それらの代表的な画像を示す.

Scale bar=100 μ m. D: C の細胞残存率を評価したグラフ. SL01 は NMDA により誘発される網膜神経節細胞傷害を抑制した. Mean \pm SEM for 5 independent experiments, * p <0.05.

この ODN D-SL01 の神経保護作用は, TNF- α 中和抗体をあらかじめ投与しておくことが明らかとなった. したがって, ODN D-SL01 の NMDA 誘発網膜神経傷害に対する抑制作用には, TNF- α が関与していることが明らかとなった. 網膜神経節細胞上の TLR9 が刺激されると, 何らかの因子を介してミュラー細胞における TNF- の発現が上昇し, 分泌された TNF- が網膜神経節細胞に作用することによって, 神経保護作用が惹起されるものと考えられた.

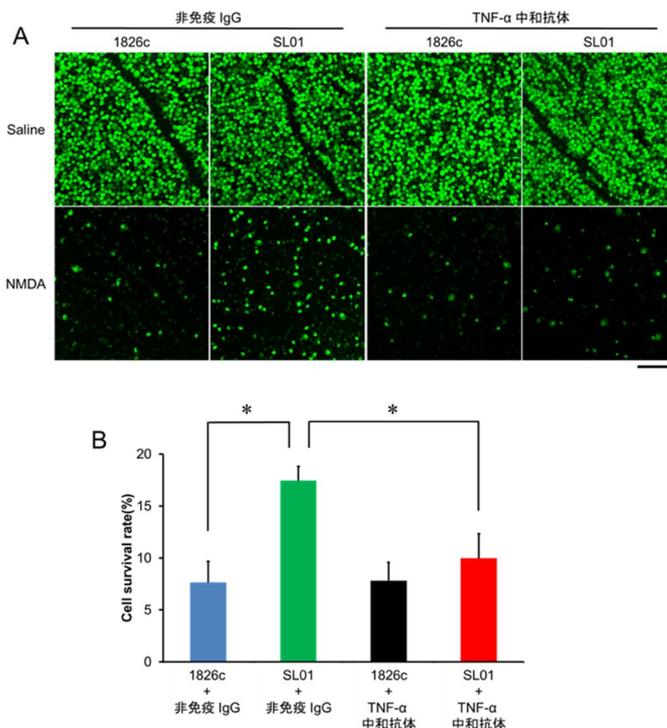


Fig. 2 TNF- α 中和抗体が NMDA 硝子体内投与により誘発される RGC の脱落に対する TLR9 刺激薬の保護作用に及ぼす影響

1 日目に両眼に 1826c+非免疫 IgG, SL01+非免疫 IgG, 1826c+TNF- α 中和抗体および SL01+TNF- α 中和抗体の薬物混合液 4 群を投与し, 2 日目に NMDA 溶液または Saline を投与した. NMDA または Saline を投与した 7 日後に眼球を摘出した. 網膜 flat-mount 標本を作製し, Alexa Fluor 488 標識抗 NeuN 抗体を用いて染色を行った. A: 代表的な染色画像を示した. Scale Bar = 100 μ m. B: A の細胞残存率を評価したグラフ. Mean \pm SEM for 4-6 independent experiments, * p <0.05.

ツニカマイシン硝子体内投与誘

発網膜色素変性モデルにおける TLR9 刺激薬の神経保護作用

TLR9 刺激薬である ODN D-SL01 をあらかじめ硝子体内投与しておき, その 24 時間後にツニカマイシンを硝子体内に投与すると, ツニカマイシンにより誘発される網膜視細胞傷害が抑制されることが明らかとなった. しかし, この保護作用は弱く, 網膜の機能の指標である網膜電図の振幅を回復させるまでには至らなかった.

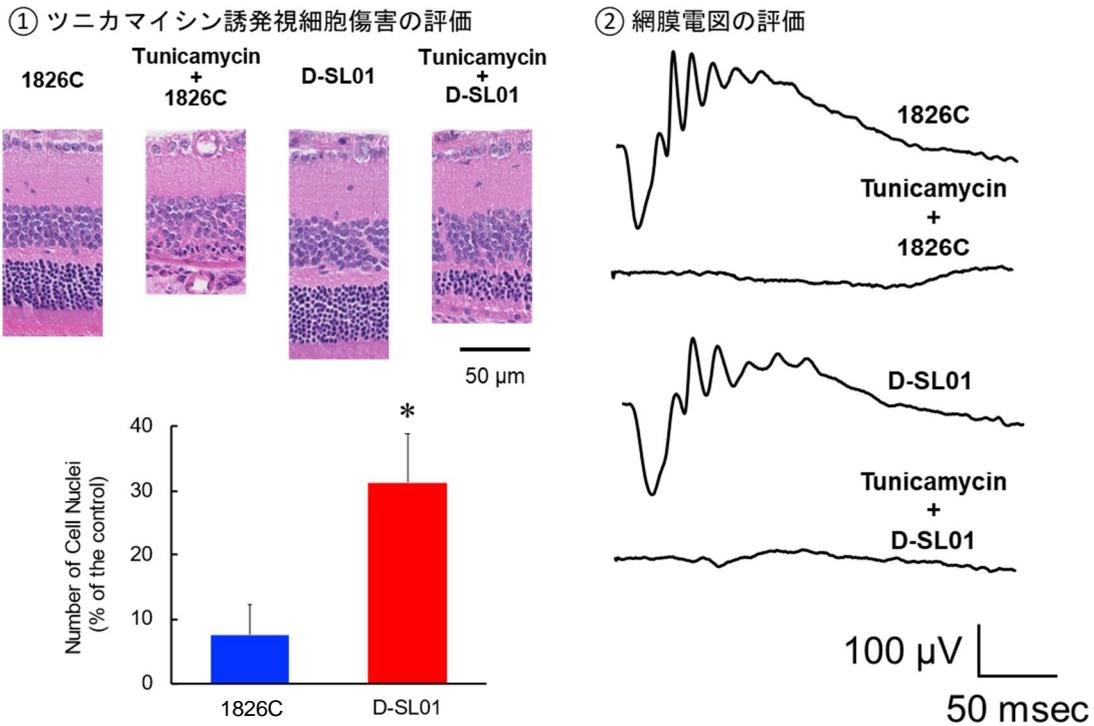


Fig. 3 ODN D-SL01 がツニカマイシン硝子体内投与により誘発される網膜視細胞死に与える影響

：1日目にODN D-SL01 (SL01) 溶液またはODN 1826c (1826c) 溶液 (陰性対照) を硝子体内投与し, 2日目に右眼にツニカマイシン, 左眼にSalineを投与した. その7日後に網膜電図を測定し, 眼球を摘出した. パラフィン包埋標本を作製し, 網膜の厚さ4 μ mの組織切片を得た. HE染色した組織切片の代表的な画像を示す. Scale bar=50 μ m. 下のグラフに, 外顆粒層に存在する核の数の残存率を示した. Mean \pm SEM, n=5-8, * p <0.05. : 暗順応下で測定した網膜電図. ODN D-SL01は, ツニカマイシンにより誘発される網膜電図の振幅の減少に対して有意な影響を与えなかった.

抗炎症作用を示すことが報告されているカンナビノイド CB₂ 受容体刺激薬のツニカマイシン硝子体内投与誘発網膜色素変性モデルにおける神経保護作用

カンナビノイド CB₂ 受容体刺激薬であるCB65とツニカマイシンを同時に硝子体内投与したところ, ツニカマイシンにより誘発される網膜視細胞傷害が抑制されることが明らかとなった. しかし, この保護作用は弱く, 網膜の機能の指標である網膜電図の振幅を回復させるまでには至らなかった.

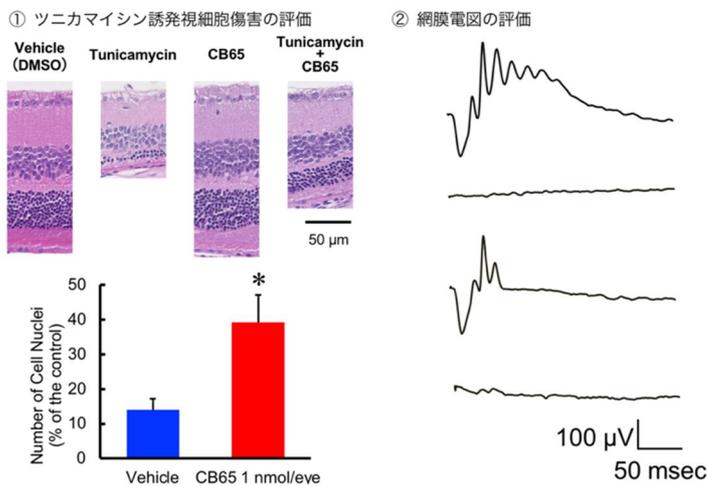


Fig. 4 CB65 がツニカマイシン硝子体内投与により誘発される網膜視細胞死に与える影響

：右眼にツニカマイシンとCB65の混液を, 左眼にCB65を硝子体内投与した. その7日後に網膜電図を測定し, 眼球を摘出した. パラフィン包埋標本を作製し, 網膜の厚さ4 μ mの組織切片を得た. HE染色した組織切片の代表的な画像を示す. Scale bar=50 μ m. 下のグラフに, 外顆粒層に存在する核の数の残存率を示した. Mean \pm SEM, n=7, * p <0.05. : 暗順応下で測定した網膜電図. CB65は, ツニカマイシンにより誘発される網膜電図の振幅の減少に対して有意な影響を与えなかった.

た網膜電図. CB65は, ツニカマイシンにより誘発される網膜電図の振幅の減少に対して有意な影響を与えなかった.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Mori Asami, Ezawa Yuna, Asano Daiki, Kanamori Toshiki, Morita Akane, Kashihara Toshihide, Sakamoto Kenji, Nakahara Tsutomu	4. 巻 793
2. 論文標題 Resveratrol dilates arterioles and protects against N-methyl-D-aspartic acid-induced excitotoxicity in the rat retina	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136999 ~ 136999
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2022.136999	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 -

1. 著者名 Mori Asami, Seki Haruka, Mizukoshi Satoru, Uezono Takashi, Sakamoto Kenji	4. 巻 12
2. 論文標題 Role of Prostaglandins in Nitric Oxide-Induced Glial Cell-Mediated Vasodilation in Rat Retina	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1403 ~ 1403
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom12101403	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂本 謙司, 小島有紗, 増田茜, 森麻美, 上園 崇
2. 発表標題 マウスツニカマイシン誘発網膜神経細胞傷害に対するAM404の保護効果
3. 学会等名 第41回日本眼薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本 謙司, 小林 貴俊, 森 麻美, 上園 崇
2. 発表標題 カンナビノイドCB2受容体刺激薬PM226はマウスNMDA誘発網膜神経細胞傷害に対して保護作用を示す
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------