

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09683

研究課題名（和文）iPS研究から発展した網膜色素変性に対する新規神経変性抑制・神経保護治療の開発

研究課題名（英文）To explore a new therapeutic approach for retinitis pigmentosa based on the patient-derived iPS cell research

研究代表者

小澤 洋子（Ozawa, Yoko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任准教授

研究者番号：90265885

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：網膜色素変性は、遺伝子変異により生じる網膜視細胞もしくは網膜色素上皮細胞の変性に基づく失明疾患であり、そのメカニズムには不明の点が多い。本研究ではロドプシン変異を持つ網膜色素変性モデルマウスにおいて候補薬剤による網膜変性抑制効果、すなわち網膜神経細胞の保護効果とそのメカニズムの一端を解明した。そして、候補薬剤が視細胞の生存の促進と視機能低下の抑制に役立つこと、その背景メカニズムは小胞体ストレスの抑制である可能性を示した。網膜色素変性のための新規進行抑制治療法の開発につながる結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性は4000-8000人に1人という高率に生じる遺伝性疾患で国内失明原因の第2位を占める。RPE65遺伝子変異に伴う変性のみ遺伝子治療が適応になったが、それ以外の原因遺伝子を持つ、もしくは原因遺伝子が同定されない症例に対しては治療法が無い。本研究でロドプシン変異に伴う変性のメカニズムの一端を解明し薬剤候補を示した学術的意義は大きい。更に、小胞体ストレスを来す他の変異を持つ症例にも応用しうる薬剤治療の開発につながる研究となった。これにより、多くの症例に適応可能な治療法の開発につながったため、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Retinitis pigmentosa is one of the inherited retinal disorders in which retinal photoreceptor cells and/or retinal pigment epithelium are affected, and causes blindness; the underlying mechanisms were still obscure. In the current study, we showed that the candidate drug suppressed retinal degeneration and promoted retinal protection in the mouse models of retinitis pigmentosa with rhodopsin mutation. We clarified that the drug promoted photoreceptor survival and suppressed visual dysfunction by suppressing endoplasmic reticulum stress. The result will help developing a new therapeutic approach for suppressing progression of retinitis pigmentosa.

研究分野：網膜

キーワード：網膜 網膜色素変性 網膜神経保護

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は国内失明原因の第 2 位であり(図 1)は、遺伝子変異による視細胞死の進行に伴い、視野欠損が周辺から中心へと進行し、最終的には中心視野も失い失明に至る疾患である(図 2)。視野欠損は年齢とともに進行するため、高齢化社会に伴う高齢患者の増加は、患者本人だけでなく介護者の Quality of Life に関わる重要な社会問題となる。

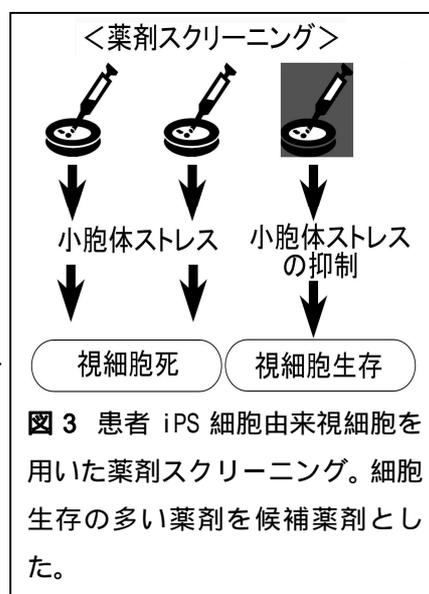
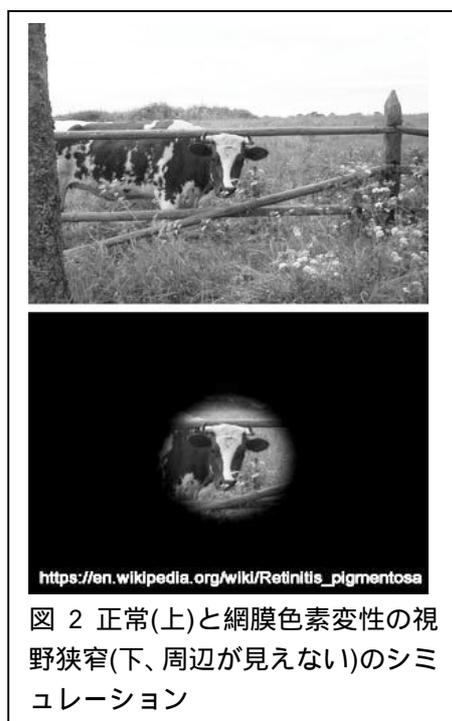
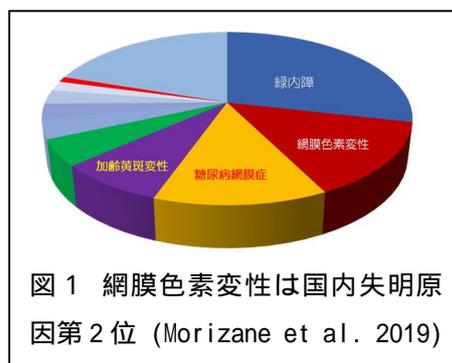
患者網膜組織を採取して研究することは困難であり、これまで網膜色素変性の治療に関する研究は遅れを取ってきた。しかし、申請者らは、京都大学の山中らが作成した人工多能性幹細胞(induced-pluripotent stem cell; iPS 細胞)(Takahashi, Yamanaka Cell 2006)の技術を利用した研究を行った。すなわち、網膜色素変性の中でも多くを占めるロドプシン変異を持つ患者の体細胞から iPS 細胞を樹立して、遺伝子変異を保持した網膜視細胞を分化誘導し、病態メカニズムと薬剤スクリーニングを行う疾患 iPS 研究を行った(図 3)。そして、その患者の網膜色素変性のメカニズムは、異常ロドプシタンパクが小胞体ストレスを引き起こすものであり、小胞体ストレス抑制剤の投与は視細胞の生存に働かうことを示した(Yoshida, Ozawa, Okano et al. Mol. Brain 2014)。

これにより、網膜色素変性の新規治療法の候補薬剤がいくつか挙げられた。ただし、疾患 iPS 研究は、in vitro の実験であり、臨床応用のためには、in vivo における効果の解析が必要であった。薬剤投与においては、有効性のほか、安全性にも留意が必要であり、生体を用いた実験が必要であった。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、国内外で人口の 4000 から 8000 人に 1 人という多数の患者を持つ遺伝性神経変性疾患である網膜色素変性による失明を予防するための世界初の新規治療法の開発である。

申請者らはこれまでに、別のマウス網膜実験系において、生体防御反応のためのストレス応答に必要なエネルギーの継続的供給を行えばストレス刺激下でも網膜視細胞の生存確率を高められることを報告した(Kawashima, Ozawa et al. FASEB J 2020)。視細胞は、糖代謝が盛んでミトコンドリアを多く持ちエネルギー代謝が高い。また、組織修復に必要なストレス応答にはエネルギーが必要である。



そこで本研究では、小胞体ストレスを抑制する候補薬剤の中でも、エネルギー代謝に関連し得る 4-phenylbutyric acid (PBA)に着目し、網膜色素変性モデルマウスにおける失明予防効果とその分子メカニズムを解析することとした。PBA は尿素サイクル異常症に対する治療薬として承認され、小児を含む患者に用いられる。一方、タンパク凝集抑制による小胞体ストレス抑制作用があり、アルツハイマー病やパーキンソン病における神経保護作用を持つことが動物モデルにおいて報告された(Mimori et al. *Bioorg Med Chem Lett* 2013, Ozcan et al. *Science* 2006)。さらに PBA は、糖代謝 (Hu et al. *Cell Physiol Biochem* 2014)やミトコンドリア機能 (Tanaka et al. *J Cell Sci* 2019)の是正に関与し得ることが報告された。PBA による視細胞保護効果には複数のメカニズムを含む可能性があると考えた。

網膜色素変性モデルマウスについては、iPS 細胞を樹立した患者と同様にロドプシン変異を持つロドプシン P23H ロドプシン変異ノックインマウス(P23H マウス(Sakami, Palczewski et al. *Hum Mol Genet.*2014)を用いた。P23H 変異を持つロドプシントタンパクは、小胞体ストレスを生じることが従来知られる(Illing et al. *J Biol Chem.* 2002)。

このように、疾患 iPS 研究で行った薬剤スクリーニングに動物実験から得た知見から候補とした薬剤である PBA を網膜色素変性モデルマウスに投与し、視細胞保護・視機能保護の効果の分子メカニズムを詰め、近い将来の新規神経変性抑制・神経保護(臓器保護)治療の開発につなげる目的で研究を行った。

### 3. 研究の方法

本研究では、ロドプシン P23H 変異を持つ網膜色素変性モデルマウス(P23H 変異モデルマウス)において PBA の継続投与が網膜視細胞死および変性による視機能低下を抑制する効果の分子メカニズムを解析した。主に、小胞体ストレスとエネルギー代謝の面から解析した。

#### 方法 1

P23H 変異モデルマウスに PBA を投与し、視細胞保護効果を機能的・組織学的に解析した。本モデルマウスを Palczewski 教授の研究室(米国 Case Western Reserve University)から供与していただき、当研究室で飼育し、経時的に観察した。組織学的には網膜切片においてロドプシン染色等により生存する視細胞の数を、機能的には、これまでも申請者の研究室で行ってきた網膜電図 (Electroretinogram; ERG)(図 4)を用いて測定した。PBA の投与については、予備実験の結果から、10mg/Kg 体重の PBA 腹腔内連続投与とした。

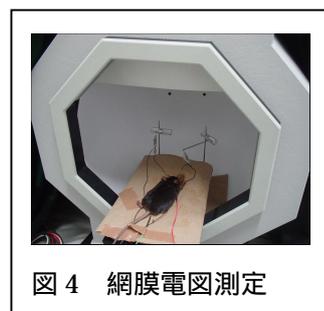


図 4 網膜電図測定

#### 方法 2

P23H 変異モデルマウスに PBA を投与し網膜サンプルにおける小胞体ストレスマーカーを解析した。経時的に網膜サンプルを回収し、BiP や CHOP、PERK、eIF2、ATF4 等の小胞体ストレスマーカーをリアルタイム PCR を用いて解析した。

#### 方法 3

P23H 変異モデルマウスに PBA を投与し網膜サンプルにおけるミトコンドリア変化を解析した。PBA には糖の取り込みに働く Glucose transporter type 4 (GLUT4)の発現を上げる作用がある (Hu et al. *Cell Physiol Biochem* 2014)ほか、ミトコンドリア融合によるミトコンドリア機能調整に作用する(Tanaka et al. *J Cell Sci* 2019)ことが報告されている。そこで、これらのマーカー分子の発現を、リアルタイム PCR 等により解析した。

#### 4. 研究成果

##### 結果 1

ホモ P23H 変異モデルマウスの視細胞の数は野生型と比較して、生後 4 週齢で既に明らかであった。これに対し、ヘテロ P23H 変異モデルマウスの視細胞の数は、生後 6 週齢で野生型との差がみられ、10 週齢ではさらに差が増大した。そこで、ヘテロ P23H 変異モデルマウスを用いてその後の研究を進めることとし、PBA の投与はヘテロ P23H 変異モデルマウスにおいてまだ視細胞数が野生型と比較して差がない生後 2 週齢より開始することとした。その結果、ヘテロ P23H 変異モデルマウスにおいて 4 週齢では明らかな差はみられなかったが、10 週齢の PBA 投与群では Vehicle 投与群と比べ視細胞数がより多く生存していることが示された(図 5)。網膜電図による視機能測定においては、この結果と合致して PBA 治療群では vehicle 群と比べて視細胞の機能を示す a 波の振幅が大きく保たれた。

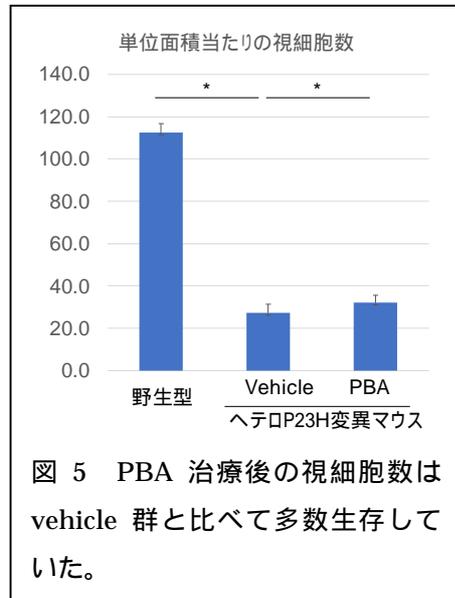


図 5 PBA 治療後の視細胞数は vehicle 群と比べて多数生存していた。

##### 結果 2

ヘテロ P23H 変異モデルマウス 4 週齢において PBA 治療群では vehicle 群と比べて網膜内小胞体ストレスマーカーのうち BiP や CHOP、PERK、eIF2、ATF4 については明らかな差がみられなかった。しかし、小胞体ストレス時に誘導され、異常なタンパク分解を起こす小胞体関連分解のマーカーである VCP の発現は PBA 治療群では vehicle 群と比べて明らかに上昇していた。

##### 結果 3

ヘテロ P23H 変異モデルマウス 4 週齢において PBA 治療群では vehicle 群と比べてミトコンドリア融合および分裂のマーカーである Fis1、Mfn1、Mfn2 の発現は明らかに上昇していた。

このように、PBA 治療群では非治療群と比較して、視細胞の生存と機能維持を促進し、その背景には小胞体ストレスとミトコンドリアの変化があることが明らかになった。この結果により、さらに詳細な分子メカニズムを詰めれば実臨床に応用でき、発展させられる可能性が示された。現時点では網膜変性に対する積極的に使える薬剤は開発されておらず、その分野に切り込む研究といえた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Nagai N, Mushiga Y, Ozawa Y.	4. 巻 4
2. 論文標題 Retinal Pigment Epithelial Abnormality and Choroidal Large Vascular Flow Imbalance Are Associated with Choriocapillaris Flow Deficits in Age-Related Macular Degeneration in Fellow Eyes.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 1360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm12041360.	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 Yasukawa T, Sasaki M, Motomura K, Yuki K, Kurihara T, Tomita Y, Mori K, Ozawa N, Ozawa Y, Yamagishi K, Hanyuda A, Sawada N, Tsubota K, Tsugane S, Iso H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Association between Fatty Acid Intakes and Age-Related Macular Degeneration in a Japanese Population: JPHC-NEXT Eye Study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Transl Vis Sci Technol.	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/tvst.12.1.3.	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 Yasukawa T, Hanyuda A, Yamagishi K, Yuki K, Uchino M, Ozawa Y, Sasaki M, Tsubota K, Sawada N, Negishi K, Tsugane S, Iso H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Relationship Between Blood Pressure and Intraocular Pressure in the JPHC-NEXT Eye Study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 17493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-22301-1.	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 Aichi R, Nagai N, Ohkoshi K, Ozawa Y.	4. 巻 19
2. 論文標題 Impact of treating age-related macular degeneration before visual function is impaired.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 5726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm11195726.	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 Mushiga Y, Nagai N, Ohkoshi K, Ozawa Y.	4. 巻 1
2. 論文標題 Retinal circulation time/arm-to-retina time ratio in the fluorescein angiography to evaluate retina-specific hemodynamics.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 17457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-21117-3.	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 Harada N, Nagai N, Mushiga Y, Ozawa Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Choriocapillaris Flow Imbalance in Fellow Eyes in Age-related Macular Degeneration.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.63.9.13.	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 Ozawa Y, Toda E, Homma K, Osada H, Nagai N, Tsubota K, Okano H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Effects of Epigenetic Modification of PGC-1 by a Chemical Chaperon on Mitochondria Biogenesis and Visual Function in Retinitis Pigmentosa	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11091497.	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 Ofuji Y, Katada Y, Tomita Y, Nagai N, Sonobe H, Watanabe K, Shinoda H, Ozawa Y, Negishi K, Tsubota K, Kurihara T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Non-Perfusion Area Index for Prognostic Prediction in Diabetic Retinopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life12040542.	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 Takei T, Nagai N, Ohkoshi K, Ozawa Y*.	4. 巻 12
2. 論文標題 Arm-to-retina time predicts visual outcome of anti-vascular endothelial growth factor treatment for macular edema due to central retinal vein occlusion.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 2194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-06281-w	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 Minami S, Uchida A, Nagai N, Shinoda H, Kurihara T, Ban N, Terasaki H, Takagi H, Tsubota K, Sakamoto T, Ozawa Y*.	4. 巻 10
2. 論文標題 Shorter axial length is a risk factor for proliferative vitreoretinopathy grade C in eyes unmodified by surgical invasion.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 3944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10173944	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 Guzman NA, Homma K, Osada H, Toda E, Ban N, Nagai N, Negishi K, Tsubota K, Ozawa Y*.	4. 巻 10
2. 論文標題 Neuroprotective effect of 4-phenylbutyric acid against photo-stress in the retina.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants.	6. 最初と最後の頁 1147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10071147	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 Nakamura K, Honda R, Soeda S, Nagai N, Takahashi O, Kadonosono K, Ozawa Y*.	4. 巻 11
2. 論文標題 Factors associated with achieving intraocular pressure lower than 15 mmHg by Trabectome surgery in primary open-angle glaucoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 14308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-93711-w	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 Shinojima A, Ozawa Y*, Uchida A, Nagai N, Shinoda H, Kurihara T, Suzuki M, Minami S, Negishi K, Tsubota K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Assessment of Hypofluorescent Foci on Late-Phase Indocyanine Green Angiography in Central Serous Chorioretinopathy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 2178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10102178	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 Osada H, Toda E, Homma K, Guzman NA, Nagai N, Ogawa M, Negishi K, Arita M, Tsubota K, and Ozawa Y*.	4. 巻 12
2. 論文標題 ADIPOR1 deficiency-induced suppression of retinal ELOVL2 and docosahexaenoic acid levels during photoreceptor degeneration and visual loss.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Dis	6. 最初と最後の頁 458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-021-03741-5	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 1件)

1. 発表者名 愛知梨沙, 永井紀博, 小沢洋子.
2. 発表標題 加齢黄斑変性に対する抗VEGF治療において視力の維持改善に関わる術前因子
3. 学会等名 第126回日本眼科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永井紀博, 鈴木美砂, 内田敦郎, 南早紀子, 篠島亜里, 栗原俊英, 長田頼河, 溝口あや子, 鈴木高佳, 篠田肇, 水木信久, 根岸一乃, 小沢洋子.
2. 発表標題 滲出型加齢黄斑変性に対するプロルシズマブ投与後の脈絡膜変化 (SKY-Team Study)
3. 学会等名 第126回日本眼科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小沢洋子.
2. 発表標題 糖尿病網膜症の細胞分子病態. 教育セミナー 糖尿病網膜症と腎症の類似点と相違点
3. 学会等名 第37回日本糖尿病合併症学会・第28回日本糖尿病眼学会総会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小沢洋子.
2. 発表標題 遺伝性神経変性疾患である網膜色素変性に対する神経保護治療の可能性.
3. 学会等名 第42回日本眼薬理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ozawa Y.
2. 発表標題 Impact of lipid metabolism in age-related macular degeneration
3. 学会等名 FujiRetina 2022(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本間耕平, 坪田一男, 岡野栄之, 小沢洋子.
2. 発表標題 タウリンはミトコンドリア病 MELAS 疾患 iPS 細胞の代謝不全と網膜色素上皮細胞の上皮間葉転換を抑制する.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 愛知梨沙, 輿水純子, 都筑賢太郎, 本田理峰, 小沢洋子.
2. 発表標題 初回手術にアーメッド緑内障バルブを選択した落屑緑内障の一例 .
3. 学会等名 第32回日本緑内障学会 京都 2021/9/10-9/12
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田成美, 虫賀庸朗, 新井英介, 永井紀博, 小沢洋子.
2. 発表標題 加齢黄斑変性を有する患者群の傍眼における光干渉断層血管撮影画像の解析.
3. 学会等名 第37回日本眼循環学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 虫賀庸朗, 新井英介, 永井紀博, 小沢洋子.
2. 発表標題 蛍光眼底造影における Retina Circulation time と糖尿病黄斑浮腫の関係 .
3. 学会等名 第37回日本眼循環学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武井達彦, 新井英介, 永井紀博, 小沢洋子.
2. 発表標題 腕 - 網膜循環時間と網膜中心静脈閉塞症の治療予後の関係 .
3. 学会等名 第75回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本間耕平, 坪田一男, 岡野栄之, 小沢洋子.
2. 発表標題 ミトコンドリア病疾患 iPS 細胞を用いたドラッグスクリーニングシステム構築
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
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