

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16907

研究課題名（和文）網膜色素変性症に対するオプシン類の進行抑制効果の解明

研究課題名（英文）Protection effect of opsins on the progression of retinitis pigmentosa

研究代表者

堅田 侑作（Katada, Yusaku）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：40645834

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：これまでにまず予防メカニズムの評価系としてとして、HPLCを用いたレチノイド分析の系の立ち上げを実施した。これによって網膜中のAll-trans-retinalと11-cis-retinalの存在比を測定することが可能となった。系の立ち上げの中で、1網膜からでもretinalを鋭敏に検出できる最適な条件を見出した。AAVベクターを用いて生直後のP23Hマウスにキメラロドプシンの遺伝子導入網膜下注射で行ったところ、仮説の通り11-cis-retinalの上昇する傾向が認められた。相対的に11-cis-retinalが上昇することで、小胞体ストレスが軽減していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、オプシン類が現在治療法予防法共に確立していない網膜色素変性症をはじめとした遺伝性網膜疾患に対して進行抑制効果をもつ可能性が見いだされ、またそのメカニズムの一端が明らかになった。これによって、今後網膜内の光代謝メカニズムへの理解がより深まるとともに、成果の応用としてオプシン類の遺伝性網膜疾患に対する進行抑制剤としての開発の可能性が広がった。本研究開発を今後さらにすすめることで、光遺伝学的治療の実用化による、遺伝性網膜疾患による社会的損失の是正にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have first set up a system for retinoid analysis using HPLC as an evaluation system for the prevention mechanism. This system has made it possible to measure the ratio of all-trans-retinal to 11-cis-retinal in the retina. In the course of setting up the system, we found the optimum conditions for sensitive detection of retinal in a single retina. Using AAV vectors, we performed gene transfer subretinal injections of chimeric rhodopsin in postnatal P23H mice, and found a trend toward elevated 11-cis-retinal, as hypothesized. The relative increase in 11-cis-retinal suggested that endoplasmic reticulum stress was reduced.

研究分野：眼科

キーワード：網膜色素変性 オプトジェネティクス 進行抑制

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在に至るまで予防法も治療法もなく早期の治療法の確立が望まれる失明疾患として、網膜色素変性症・萎縮型加齢黄斑変性がある。これらは共に網膜視細胞が変性消失する疾患である一方、他の網膜細胞は保たれているという共通したフェノタイプを持つ。特に脳との連絡を担う網膜神経節細胞が残存しているため、これを利用した視覚再生研究が国内外で行われている。

そのうちの一つが遺伝子治療によるアプローチである。近年、オプトジェネティクス技術の発展に伴い、チャンネルロドプシンをはじめとする光駆動タンパク質を遺伝子導入することで、細胞レベルでの光制御による機能操作が可能となった。この技術を応用し、変性網膜の残存神経細胞に光駆動能を付与することで、視覚再生効果が期待できることが、非臨床レベルで明らかとなっている(Bi et al, Neuron 2006)。しかし、先行研究で使用されている遺伝子は大きな問題として、光の感度が低いということがあり、具体的には屋外光レベルの光量が必要となるため、暗い屋内や夜道などでは、視覚が期待できなかった。

そこで申請者らは、微生物型ロドプシンと動物型ロドプシンをハイブリッドさせることで生まれた、光感受性に G タンパク質を活性化するキメラロドプシン(Nakatsuma et al. Biophys J 2011, Sasaki et al. PLoS One. 2014) を使うことによって、感度の問題を克服し、高感度の視覚再生効果を得た (Katada et al. bioRxiv 2020, 堅田ら 第 122 回日本眼科学会総会 学術展示優秀賞, 堅田ら 第 41 回日本炎症・再生医学会がポスター発表優秀演題)。一方で同時に、網膜変性の進行抑制という想定外の所見が同時に得られたが、そのメカニズムの詳細は不明のままである。

2. 研究の目的

そこで、本研究ではその網膜変性の進行抑制メカニズムを解明するとともに、これが広く他のオプシン類やその他の物質において、また網膜色素変性症の遺伝型に依らず起こり得るものかを検討することとした。

3. 研究の方法

・予防メカニズムの解析

これまでに P23H マウスにおいて予防効果が確認されているが、そのメカニズムは不明である。そこで仮説として

網膜色素変性症の進行の一因に光曝露があることが知られており、発現したオプシンが光を代償的に吸収することで All-trans-retinal などの毒性代謝物を減らしている可能性。

P23H マウスにおいてロドプシンタンパク質のフォールディングの異常による小胞体ストレスが関与していること、また、11-cis-retinal が増えることでこれが改善することが知られており、の結果相対的に 11-cis-retinal が上昇することで小胞体ストレスが軽減している可能性。

一般に末梢からのシグナルが無くなると、中枢神経は廃用性萎縮を生じることが知られているが、異所性のオプシンの発現によって、神経刺激が入り、この廃用性萎縮が抑制されている可能性を想定。

これらを検証するために、まず HPLC を用いて治療を行ったマウス網膜のレチノイド分析を実施、異所性のオプシン発現が網膜のレチノイドにどういった影響を及ぼすかを検討を行った。

・予防効果をもたらす物質の探索

上記実験の結果、 が主に予防効果に関与しているのであれば、光受容で all-trans-retinal を放出しないオプシン類全体に予防効果が期待できる可能性、さらには光吸収する物質でさえあれば同様の効果が期待できることが予想される。

それを検証するために、種々のオプシン類、もしくはカーボンブラックなどの光吸収材を用いて同様の予防効果が得られるかどうか実験を行う。また、 が予防効果を発揮しているのであれば、神経刺激を行えるものであれば予防効果が期待できる可能性がある。それを検証するために、種々のオプシン類に加えて、電気刺激を用いて同様の効果が得られるか実験を行った。

・種々の網膜色素変性症モデルマウスへの効果の確認

これまでに得られている予防効果が、P23H マウスに特異的なものなのか、それとも他の遺伝子変異による変性にも効果を発揮するものであるのかを検証するため、rd1 マウス、rd10 マウス、その他モデルマウスを用いて、予防効果の検討を実施する。

4. 研究成果

・予防メカニズムの解析

これまでにまず予防メカニズムの評価系としてとして、HPLC を用いたレチノイド分析の系の立ち上げを実施した。これによって網膜中の All-trans-retinal と 11-cis-retinal の存在比を測定することが可能となった。系の立ち上げの中で、1 網膜からでも retinal を鋭敏に検出できる最適な条件を見出した。

AAV ベクターを用いて生直後の P23H マウスにキメラロドプシンの遺伝子導入網膜下注射で行ったところ、仮説の通り 11-cis-retinal の上昇する傾向が認められた。相対的に 11-cis-retinal

が上昇することで、小胞体ストレスが軽減していることが示唆された。

・予防効果をもたらす物質の探索

種々のオブシン類、もしくはカーボンブラックなどの光吸収材を用いて同様の予防効果が得られるかどうか実験を行ったが、網膜厚、網膜電図上、明らかな予防効果は認められなかった。

・種々の網膜色素変性症モデルマウスへの効果の確認

P23H マウスに特異的なものなのか、それとも他の遺伝子変異による変性にも効果を発揮するものであるのかを検証するため、rd1 モデルマウスを用いて、予防効果の検討を実施したが明確な予防効果は検出されなかった。

本研究結果から、オブシン類が現在治療法予防法共に確立していない網膜色素変性症をはじめとした遺伝性網膜疾患に対して進行抑制効果をもつ可能性が見いだされ、またそのメカニズムの一端が明らかになった。これによって、今後網膜内の光代謝メカニズムへの理解がより深まるとともに、成果の応用としてオブシン類の遺伝性網膜疾患に対する進行抑制剤としての開発の可能性が広がった。本研究開発を今後さらにすすめることで、光遺伝学的治療の実用化による、遺伝性網膜疾患による社会的損失の是正にも貢献できる可能性がある。

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 1件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Katada Yusaku, Kunimi Hiromitsu, Serizawa Naho, Lee Deokho, Kobayashi Kenta, Negishi Kazuno, Okano Hideyuki, Tanaka Kenji F., Tsubota Kazuo, Kurihara Toshihide | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Starburst amacrine cells amplify optogenetic visual restoration through gap junctions | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtm.2023.05.011 | 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|