

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462746

研究課題名(和文) 網膜色素変性に対する新規視細胞保護療法の展開

研究課題名(英文) Strategy of photoreceptor protective treatment for retinitis pigmentosa

研究代表者

目時 友美 (Metoki, Tomomi)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00400169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアカルパイン - 1のlarge fragmentには分子シャペロンと特異的に結合する部位があり、この部位の10個のアミノ酸配列からなるペプチドには視細胞保護作用があることが、以前の申請者の研究室で明らかとなった。本研究ではこのペプチドがウサギなどの中型動物でも点眼により網膜まで送達できるかどうかを調べた。その結果、濃度依存性に点眼にて網膜への送達が可能である事が明らかとなった。その他、ヒト皮膚細胞からiPS細胞を作製することに成功したとともに、ヒト由来細胞へのラットカルパイン阻害ペプチドの効果も検討した。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that the 10-amino-acid fragment derived from the large fragment of rat mitochondrial calpain-1 have an inhibitory effect on the mitochondrial calpain-1. In the present study, we clarified that this peptide can be delivered to the rabbit retina by a topical instillation. In addition, we successfully made iPS cells from human skin fibroblasts for our future research projects. We also studied to examine whether or not the peptide derived from rats can demonstrate protective effects on human-derived cells such as ARPE-19 cells.

研究分野：眼科学

キーワード：眼科学 網膜色素変性 カルパイン 眼薬理学

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は遺伝性の杆体および錐体視細胞の進行性変性を本態とする疾患で、本邦における中途視覚障害原因疾患の第3位に位置する失明対策上重要な病気である。近年、分子遺伝学の進歩にともなって網膜色素変性の病態に関する知見が集積され、その原因となる遺伝子は少なくとも約70種類以上あり、この疾患がきわめて異質性の高いものであることが判明してきている。さらにこれらの多彩な原因遺伝子の変異により最終的に視細胞のアポトーシス(広義)という共通の細胞死機構が働き、視細胞変性が進行することも判明してきている。このような網膜色素変性に対する分子病態的な理解が進んだことに呼応して本疾患に対する新しい治療法の開発を目的とした研究も推進されている。それらには遺伝子治療、人工網膜、視細胞保護治療および再生医療などの先端的治療研究がある。このうち本研究は分子標的療法を視細胞のアポトーシス抑制に応用する新しい視細胞保護治療法を開発しようとする試みである。

2. 研究の目的

申請者らは2010年に網膜変性モデル動物の1つであるRCS (Royal College of Surgeons)ラットの網膜変性の進行期にミトコンドリア画分のカルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインの活性が上昇することを見いだした (Mizukoshi, Metoki et al. *Exp Eye Res* 2010)。本酵素はミトコンドリアに存在するアポトーシス誘導因子 (AIF, apoptosis inducing factor) を活性化することで caspase 非依存性アポトーシス(広義のアポトーシス)の引き金を引く働きをされると考えられる。さらに申請者らはカルパイン活性上昇期にカルパイン阻害薬をラット硝子体に注射すると視細胞のアポトーシスを抑制できることを明らかにした (Mizukoshi, Metoki et al. *Exp Eye Res*

2010)。この事実は視細胞カルパインを分子標的とした新しい視細胞保護治療法実現の可能性を示唆するものであった。また連携研究者の尾崎らはミトコンドリアカルパインの2つのサブタイプである m-カルパインと μ -カルパインの分子構造の解析から、これらの酵素分子に分子シャペロン (Grp75 および Erp57) が特異的に結合することを突き止め (Ozaki et al. *Arch Biochem Biophys* 2011, *Biochim Biophys Acta* 2008)、結合部位 (ドメイン III) に相同な10アミノ酸からなる合成ペプチド (カルパインペプチド) を投与することによりカルパインとシャペロンとの結合を競合的に阻害できることを世界で初めて明らかにした (Ozaki, et al. *Biochem Biophys Acta* 2012)。これらのペプチドはミトコンドリア内でアポトーシス誘導因子 (AIF) の活性化を阻害することも確認された。さらにそれらのペプチドの N-末端に膜透過配列を連結した上で RCS ラットに投与したところ、硝子体投与のみならず点眼によっても視細胞のアポトーシスを実際に抑制することを証明した (Ozaki, et al. *Biochem Biophys Acta* 2012)。

申請者はこれらの独創的な新規ペプチドをトラップとして用いた視細胞アポトーシス抑制による新しい網膜色素変性の分子標的療法の開発を最終的な研究目的とし、本研究を臨床応用へ展開するための基盤研究と位置づけている。

本ペプチドの網膜への送達法を点眼やナノパーティクルからの徐放化など低侵襲な方法で実現できれば本疾患の新しい治療法として臨床応用できる可能性は大きい。

3. 研究の方法

(1)カルパイン分子の活性化を特異的に阻害するカルパインペプチドの創製

カルパインペプチドのミトコンドリアカルパインに対する特異的な競合阻害機構を図1に示す。このペプチドには細胞質 (Cyt)

カルパイン阻害活性はなく、ミトコンドリアカルパインに特異的であることが予備実験によって確認されている。このペプチドはミトコンドリアカルパインの分子シャペロンとの結合ドメイン（ドメイン III）のN-末端から23から32番目の10アミノ酸残基からなるペプチドであり、既報（BBA 2012）ではこのペプチドにカルパイン阻害効果ならびにAIF活性化抑制効果が強くみられた。このペプチドのN-末端に13アミノ酸からなる膜通過ペプチド（HIV-N）を結合させた計23アミノ酸からなるペプチドが最も効率よくカルパインを阻害したので本研究ではこの構造をもつペプチドをカルパインペプチドとして用いることとした。

合成ペプチドによるミトコンドリアμ-カルパイン阻害

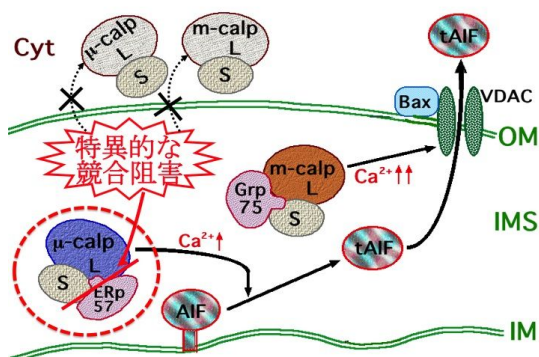


図1 カルパインペプチドによるミトコンドリアカルパインの阻害（原理図）

カルパインペプチド（黒線）は、カルパイン（μ-calp および m-calp, L）と分子シャペロン ERp57 および Grp75 の特異的結合を阻害することでこれらのカルパインの活性化を阻害する。AIF: アポトーシス誘導因子、tAIF: 活性型 AIF、OM: ミトコンドリア外膜、IM: ミトコンドリア内膜、IMS: ミトコンドリア膜の内腔、Cyt: 細胞質、S: カルパイン small subunit（共通分子）

(2) カルパインペプチドのウサギ網膜への送達法の検討

本研究の中心となるカルパインペプチドによる分子標的治療の薬物投与法は予備実験では主として硝子体内注射を用いてきたが、臨床応用へと展開するにはより簡便で安全な投与方法の開発が望まれる。ラットでも点眼が有効であったがこれはラットの

比較的薄い強膜を通しての特殊な効果である可能性もある。将来の臨床応用には眼外投与が理想的であり、強膜が比較的分子量の大きな物質に対しても透過させる潜在性をもつことから、点眼やテノン嚢下注射が有望な投与方法としての可能性を秘める。それが無理なら眼内への徐放システムを考慮しなければならないであろう。平成27年度にはそれまでのカルパインペプチドの有効性の検証とともにそれと平行して網膜への送達法についての研究も行うこととした。つまり、カルパインペプチドの網膜への送達法を硝子体注射ばかりでなく、点眼によってウサギ網膜へ送達されるか否かについて実験にて検証した。

実験は7週齢の白色家兎を用い、カルパインペプチド点眼液を1, 5, 10, 20 mM に調整してウサギ各眼に1滴（30μl）を1日3回1週間点眼し、最終点眼の1時間後に抗Tat抗体を用いて免疫染色を行なうことで観察した。

(3) 将来の研究発展を見越した iPS 細胞の作製

本研究はカルパインペプチドが実際にヒト由来の視細胞に対して抗アポトーシス効果を発揮できるかどうかを明らかにすることを最終目標としている。ヒト型カルパインペプチドはラットカルパインペプチドと相同なアミノ酸配列部位から合成することとした。申請者が属している研究室ではまだiPS細胞を作製した実績がないので、最初に健康人ボランティアから皮膚細胞の供与を受けて、標準的な手法に従ってiPS細胞を作成した。

(4) ラットカルパインペプチドのヒト由来細胞に対する細胞死抑制効果の有無の検討

ラットカルパインペプチドの効果を培養細胞レベルで観察するため、ヒト網膜色素

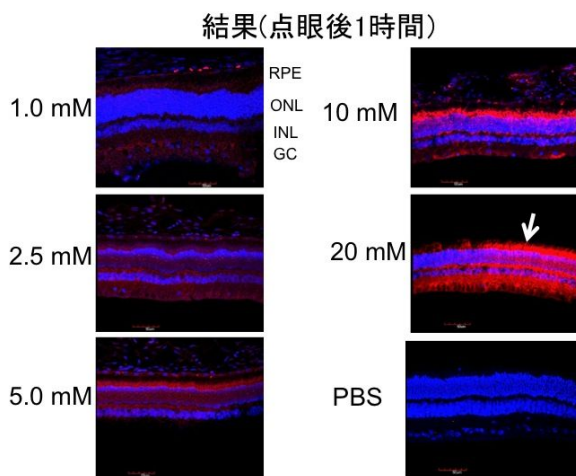
上皮細胞由来の細胞である ARPE19 細胞に酸化ストレスを負荷し、アポトーシス誘導状態とした状態でカルpainペプチドを添加し、抗アポトーシス効果が発揮されるか否かを形態的に観察した。

4. 研究成果

(1) カルpainペプチドのウサギ網膜へ送達法の検討

ウサギ眼球への各種濃度カルpainペプチド点眼液点眼 1 時間後のウサギ網膜の免疫組織化学所見を図 2 に示す。

図 2 ウサギ網膜へのカルpainペプチド点眼での送達

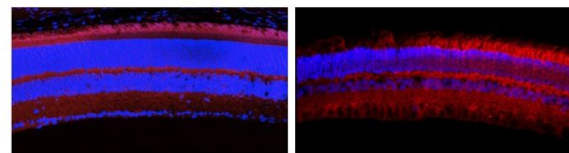


図中の青色は DAPI による核染色であり、カルpainペプチドは赤色に発色している(矢印で示した)。20mM の濃度でもっとも鮮明に染色されており、点眼液の濃度依存性に網膜内へ送達されているのが明らかとなった。図中の略は以下の通り、RPE, 網膜色素上皮; ONL, 外顆粒層; INL, 内顆粒層; GC, 神経節細胞層。

次にラットへの点眼にて 1 mM の濃度で網膜へ送達されたのと同程度の量を送達するためにはウサギへはどの程度の濃度が必要であるかを比較検討したところ、図 3 に示すように、20 mM の濃度でほぼ同程度の染色性となることが分かった(矢印)。つまり、ラットで有効であったペプチド点眼の濃度の 20 倍程度の濃度にするこ

とで、ウサギに対してはラットと同程度のペプチドを点眼によって送達することができることが明らかとなった。

図 3 ラットへの 1 mM 点眼とウサギへの 20 mM 点眼後の網膜へのペプチドの送達性



ラット 1mM, 1時間後

ウサギ 20mM, 1時間後

この結果からさらに将来、本ペプチドをヒト網膜へ送達させるとしたら、どの程度の濃度のペプチドを調整したらよいかについて、送達量と有効濃度および分解速度との兼ね合いから計算される有効作用時間、必要点眼回数などの検討が必要になると考えられた。

(2) ヒト由来 iPS 細胞の作製

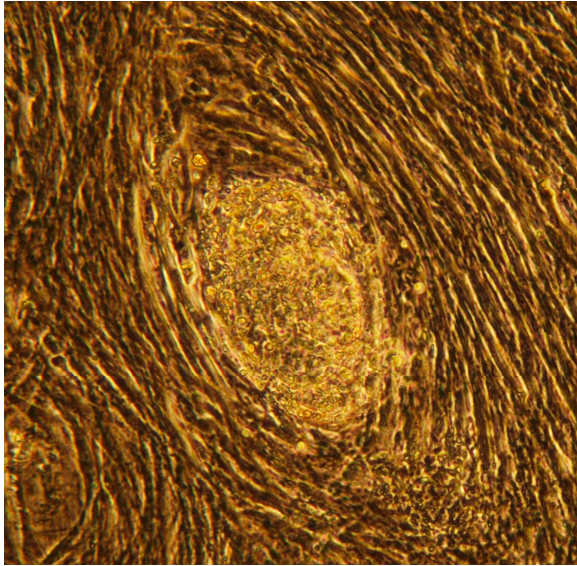
将来、実際の網膜色素変性患者で本カルpainペプチドが視細胞変性を阻止しうるかどうかの検討は、患者由来 iPS 細胞を用いて細胞培養環境下にペプチドを作用させて細胞保護効果が発揮されるかどうかをみることで、ある程度予想されることである。しかも網膜色素変性は原因遺伝子が多彩であるが故に、すべての遺伝子型の網膜色素変性に一樣に効果が発揮できるとは限らず、ある遺伝子型には効果があっても、別な遺伝子型には効果がないという状況が発生しうる。そのような問題を解決する方法として iPS 細胞を利用したオーダーメイド医療が考案される。本研究でも来たるべき、再生医療的研究手法を導入すべく、iPS 細胞作製に着手した。

健康人ボランティアから皮膚を採取し、皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を作製した。

図 4 に当教室にて作製した iPS 細胞の写真を示す。なお、この細胞については iPS 細

胞の専門家から、iPS 細胞としてまず間違いないだろうという意見も頂いた。

図3 ヒト皮膚由来 iPS 細胞

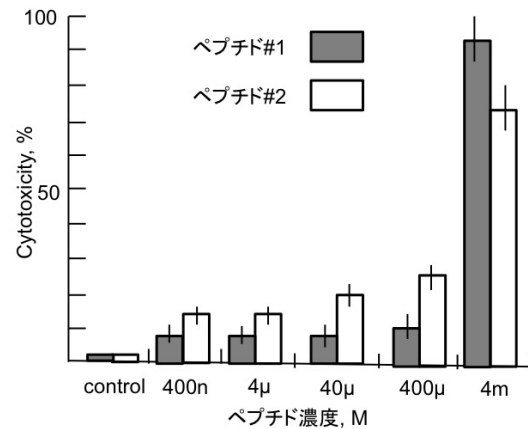


研究申請時の予定ではこの iPS 細胞を用いて視細胞まで分化誘導し、in vitro にてカルパインペプチドの視細胞保護効果を検討する予定だったが、iPS 細胞の作製に予算の時間がかかり消費したので、とりあえず個々までの段階にてとどめることにして、iPS 細胞を冷凍保存することとした。

(4) ラットカルパインペプチドのヒト由来細胞に対する細胞死抑制効果の有無の検討

結果を図4に示す。添加したペプチドの濃度が40μMから400μMまでの範囲で細胞死が対象群に比較して有意に抑制されていた。ここで用いたペプチドはペプチド#1がミトコンドリアカルパイン抑制ペプチドであり、ペプチド#2が、アミノ酸配列を逆向きにして合成した対照ペプチドである。用いた細胞はヒト網膜色素上皮細胞株であるARPE-19細胞である。

図4 カルパインペプチドのヒト由来網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 細胞への細胞死抑制効果



以上の結果から、種の異なるラット由来ペプチドにおいてもヒト由来細胞の細胞死をある程度抑制しうることが明らかとなった。今後ヒトカルパインアミノ酸配列からヒトに対するより特異性の高いペプチドを合成して研究を進めるという方向性が新たに示されることとなった。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 6 件)

- (1) 安達功武、宮川靖博、工藤孝志、木村智美、横井由美子、目時友美、鈴木幸彦、中澤 満：血液透析患者の Vogt-小柳-原田病に対するステロイド療法
臨床眼科 67(3):1979-1985, 2013. (査読あり)
- (2) 陳内嘉浩、鈴木幸彦、目時友美、鈴木香、中澤 満：横行結腸癌原発の右眼転移性虹彩毛様体腫瘍の1例。臨床眼科 68(6), 849-854, 2014. (査読あり)
- (3) 目時友美：強膜炎。図で早わかり、実戦眼科薬理。中澤 満編、臨床眼科 2013 年増刊号, pp.92-96, 医学書院, 2013. (査読なし)
- (4) Nakazawa M, Suzuki Y, Ito T, Metoki T, Kudo T, Ohguro H. Long-term effects of nilvadipine against progression of the central visual field defect in retinitis pigmentosa: An extended study. Biomed

Res Int 2013; 2013:585729. Doi: 10.1155/585729. Epub 2013 Nov 12. (査読あり)

(5) Suzuki Y, Suzuki K, Yokoi Y, Miyagawa Y, Metoki T, Nakazawa M. Effects of intravitreal injection of bevacizumab on inflammatory cytokines in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy. Retina 2014, 34(1), 165-171. (査読あり)

(6) Kudo T, Suzuki Y, Metoki T, Nakazawa M. A case of childhood vitrectomy to a dense vitreous hemorrhage secondary to leukemia therapy and tumor lysis syndrome. Case Reports in Ophthalmology 2015;6:34-38.

DOI: 10.1159/000374088. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 中澤 満、尾崎 拓、目時友美、安達功武、高橋 静、石黒誠一、山下哲郎 . ミトコンドリア・カルパイン-1 デコイペプチド点眼のウサギ網膜への送達 . 第 34 回日本眼薬理学会、2014. 9. 14、長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市) .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等: なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

目時友美 (Metoki, Tomomi)

弘前大学・医学部付属病院・講師

研究者番号 : 00400169

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

中澤 満 (Nakazawa, Mitsuru)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 80180272