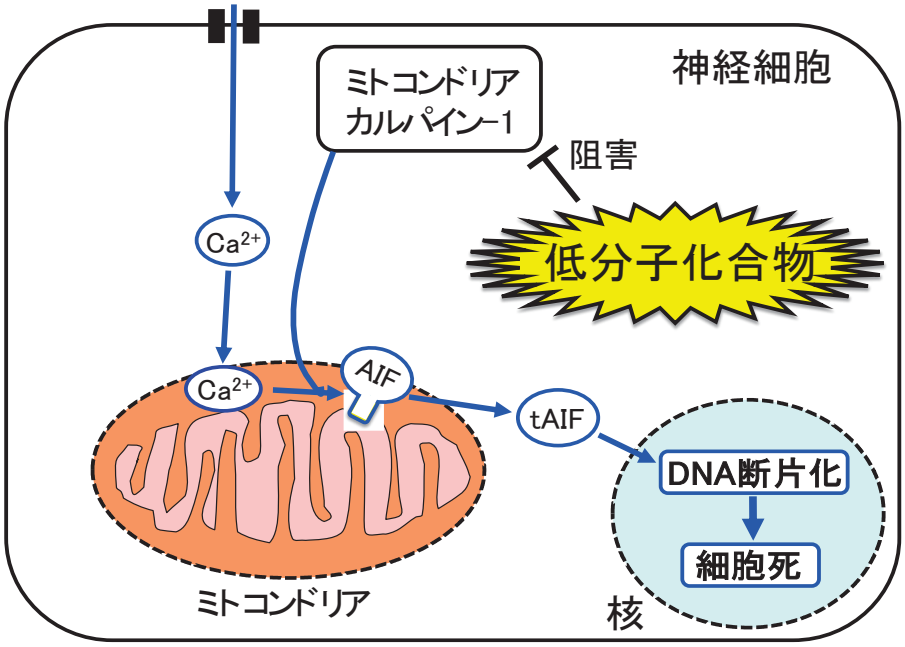
207　正常眼圧緑内障に対する神経保護療法の創出	尾﨑　拓

【目的】人生 100 年時代を迎える日本において、加齢に伴う神経変性疾患に対する治療薬の開発が急がれる。失明原因の第 1 位である緑内障の約 7 割は、眼圧が正常値でも進行することから、正常眼圧緑内障に対する世界初の神経保護療法を開発することを本研究の目的とする。著者らは、網膜の神経細胞死を誘導するミトコンドリアカルパイン-1 を特異的に阻害するペプチドを発見し、点眼による網膜への送達や網膜色素変性モデル動物に対する効果、緑内障モデル動物に対する効果を明らかにした。これらの知見より、ミトコンドリアカルパイン-1 の標的妥当性が実証されたため、本研究では、それを標的とした新たな低分子化合物の探索を行うことを目的とした。
【方法】本研究では、PDI 阻害剤であるシスタミンならびにシスタミン類縁化合物を候補化合物として薬効を評価した。マウス由来神経細胞 HT22 細胞および正常眼圧緑内障モデルマウスを用いて、各候補化合物の薬理作用を調べた。
【結果】HT22 細胞を用いた試験では、シスタミンはカルパイン活性を阻害するだけでなく、細胞死抑制効果を有することが明らかになった。さらに、免疫細胞染色法による HT22 細胞の形態観察を行った結果、シスタミンがグルタミン酸誘導性細胞死を抑制することが示された。次に、NMDA 眼内投与によって作製した緑内障モデルマウスを用いた試験により、網膜神経節細胞死に対するシスタミンの抑制効果を検証した。網膜内網状層の厚さおよび神経節細胞数を計測したところ、シスタミン点眼群で神経節細胞が有意に保護されていることが明らかになった。以上の結果から、シスタミンならびにシスタミン類縁化合物が神経細胞のグルタミン酸誘導性細胞死を抑制することが示されたことから、それらの低分子化合物が正常眼圧緑内障の新たな治療薬となる可能性が見出された。

新規低分子化合物の標的分子



207. 正常眼圧緑内障に対する神経保護療法の創出

尾﨑　拓

岩手大学 理工学部 化学・生命理工学科 生命コース

Key words：正常眼圧緑内障，網膜神経節細胞，ミトコンドリア，カルパイン，点眼薬

緒　言

人生 100 年時代を迎える日本において、加齢に伴う神経変性疾患に対する治療薬の開発が急がれる。失明原因の第 1 位である緑内障の約 7 割は、眼圧が正常値でも進行することから、正常眼圧緑内障に対する世界初の神経保護療法を開発することを本研究の目的とする。著者らは、網膜の神経細胞死を誘導するミトコンドリアカルパイン-1 を特異的に阻害するペプチドを発見し［1］、点眼による網膜への送達や網膜色素変性モデル動物に対する効果、緑内障モデル動物に対する効果を明らかにした。これらの知見より、ミトコンドリアカルパイン-1 の標的妥当性が実証されたため、本研究では、それを標的とした新たな低分子化合物の探索を行うことを目的とした。

著者らは、世界に先駆けてミトコンドリアにおいてカルパイン-1、-2 がミトコンドリア内に存在していることを明らかにした［1〜3］。タンパク質分解酵素であるミトコンドリアカルパイン-1 を発見し、アポトーシス誘導因子（AIF）依存的な細胞死を誘導する重要な酵素であることを証明した［2］。次に、ミトコンドリアカルパイン-1 とそれに結合する分子シャペロン ERp57 との結合を競合的に阻害することにより細胞死を抑制するペプチドを同定した［4］。本ペプチドは、網膜色素変性モデルラットに対して視細胞保護効果と視機能保護効果を認め、点眼により網膜へ送達されることが証明された［4，5］。また、緑内障モデルラットの神経節細胞死に対して保護効果が認められ、緑内障モデルマウスに対しても有意な薬理効果が認められた［6］。本ペプチドはマウス由来神経細胞である HT22 細胞のグルタミン酸障害に対して保護効果を有することが示され［7］、ウイルスベクターを用いて HT22 細胞へ遺伝子導入することで細胞死を阻害することも分かった［8］。一方で、ミトコンドリアカルパイン-5 と-13 についても細胞死と関連することが示されたため［9，10］、これらを標的とした創薬の可能性も見出された。そこで本研究では、当該ペプチドの低分子化を試みることを目的として、新たな低分子化合物を探索および同定することにより、正常眼圧緑内障に対する網膜神経保護療法を確立することを目指して本研究を実施した。

方　法

1. HT22 細胞を用いた薬理作用の評価

HT22 細胞を 96well plate（DMEM：100 μl/well）に 1.2×10^4 cells/ml で播種し、24 時間で前培養した。その後、DMEM にシスタミンおよびシステアミン（和光純薬）を終濃度が 0、1、2、5、10、50、100、200、400 μM になるように加え、前処理を 4 時間行った。このとき、コントロールとしては 1×PBS（−）を、ブランクとしては細胞を播種せずに DMEM のみを添加したものを使用した。次に DMEM にグルタミン酸が終濃度 4 mM になるように加えると同時に、前処理と同様の濃度のシスタミン及びシステアミンを添加し、培地を調製した。この調製した培地を既存の培地と交換し、37℃、5%CO_2インキュベーター内で 20 時間反応させた。細胞培養後、細胞毒性試験、ミトコンドリアの単離、タンパク質定量、カルパイン活性測定、免疫細胞染色、データの統計解析を行った。

2. 正常眼圧緑内障モデルを用いた薬理作用の評価

本実験では、7～8 週齢の雌の C57BL/6J マウス（日本クレア）を使用し、飼育室において 12 時間の照明と 12 時間の暗闇のサイクル下で飼育した。全身麻酔下のマウスにおいて、カテーテル（SP28 チューブ、夏目製作所）を介して 33G 針（ニプロ）を連結させた 10μl マイクロシリンジ（伊藤製作所）を用いて、40 mM NMDA を 2μl ずつ硝子体内に角膜輪部の強膜から投与した。投与後、直ちにレボフロキサシン点眼液クラビット（参天製薬）を点眼した。マウスが麻酔から覚醒するのを確認した後に飼育ゲージへと戻し、7 日間飼育した。このとき、眼内への感染を防ぐため、投与液は 0.2μm フィルター（Sartorius）により濾過滅菌、使用機器は 70%エタノールにより滅菌してから使用した。0.1、1、10 mM システミン、システアミンをそれぞれ調製し、0.2μm フィルター（Sartorius）により濾過滅菌し、分注して 4℃の冷蔵庫で保管した。

結果および考察

1. HT22 細胞におけるシスタミンの神経細胞保護効果

グルタミン酸誘導性神経細胞死を抑制するシスタミンおよびシステアミン濃度を検討するために細胞生存率を求めた結果、シスタミンおよびシステアミンともに 5～200μM の濃度で有意な細胞保護効果が見られた（図 1）。

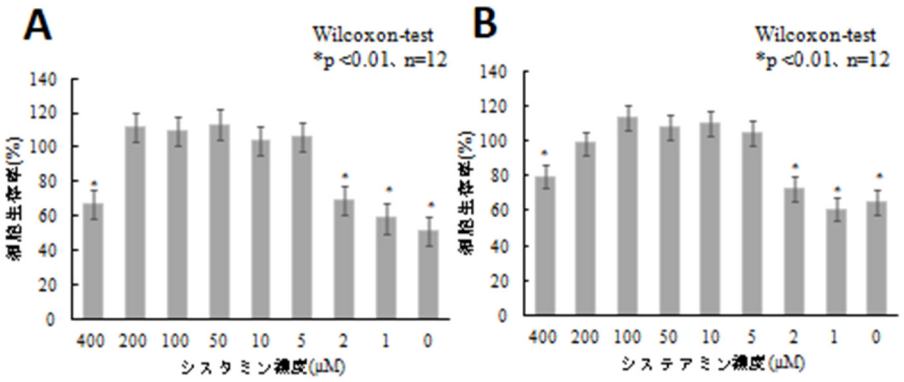


図 1. HT22 細胞のグルタミン酸に対する細胞毒性試験

A) システミン添加時のグルタミン酸処理 HT22 細胞の細胞生存率。

B) システアミン添加時のグルタミン酸処理 HT22 細胞の細胞生存率。システミンおよびシステアミンともに 5～200μM の濃度で Glu 誘導性神経細胞死の抑制効果を示した。データは平均±標準偏差として表記した。統計解析は Wilcoxon-test により実施した。n＝12、　*p＜0.01。

2. 細胞死抑制効果を持つシスタミン類縁化合物の探索

シスタミン類縁化合物がグルタミン酸誘導性神経細胞死を抑制するかを評価した結果、N-アセチルシステアミンは 25μM 以上の濃度でグルタミン酸誘導性神経細胞死の抑制効果があった（図 2A）。1-プロパンチオールは 100μM から細胞生存率の上昇が見られたが、システミンより細胞保護効果が低かった（図 2B）。3-アミノプロパンチオールは細胞生存率の上昇が見られなかった（図 2C）。2-アミノエタンスルホン酸はどの濃度においても同様の細胞生存率を示したが、システアミンより細胞保護効果が低かった（図 2D）。

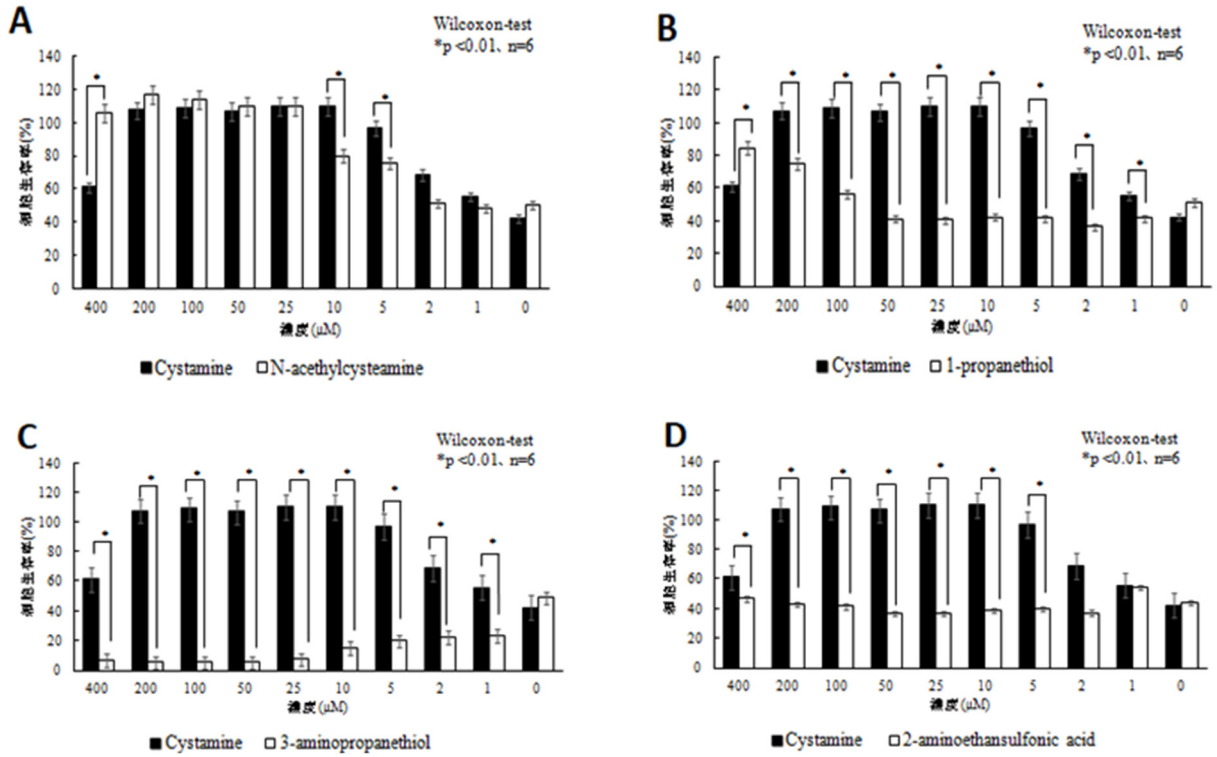


図 2. シスタミン類縁化合物処理 HT22 細胞のグルタミン酸に対する細胞毒性試験

A) N-アセチルシステアミン添加時の Glu 酸処理 HT22 細胞の細胞生存率。

B) 1-プロパンチオール添加時の Glu 酸処理 HT22 細胞の細胞生存率。

C) 3-アミノプロパンチオール添加時の Glu 酸処理 HT22 細胞の細胞生存率。
細胞生存率の上昇は見られず、どの濃度においても 0μM よりも細胞生存率が低下した。

D) 2-アミノエタンスルホン酸添加時の Glu 酸処理 HT22 細胞の細胞生存率。

データは平均±標準偏差として表記した。統計解析は Wilcoxon-test により実施した。n＝6、*p＜0.01。

3. 正常眼圧緑内障モデルマウスにおけるシスタミンの神経細胞保護効果

正常眼圧緑内障モデルマウスを作製し、シスタミンの網膜神経節細胞死に対する抑制効果の検証を行った結果、10 mM シスタミン点眼群と 10 mM システアミン点眼群において、生理食塩水点眼群と比較して、神経節細胞の脱落および網膜中心部および周辺部の内網状層の薄層化が抑制された（図 3A）。さらに、神経節細胞数（図 3B）、網膜中心部および周辺部の内網状層の厚さ（図 3C）において統計的な有意差が見られた。これらの結果より、シスタミン点眼およびシステアミン点眼では、神経節細胞ならびに内網状層に存在する神経細胞に対して、有意な保護効果を有することが見出された。

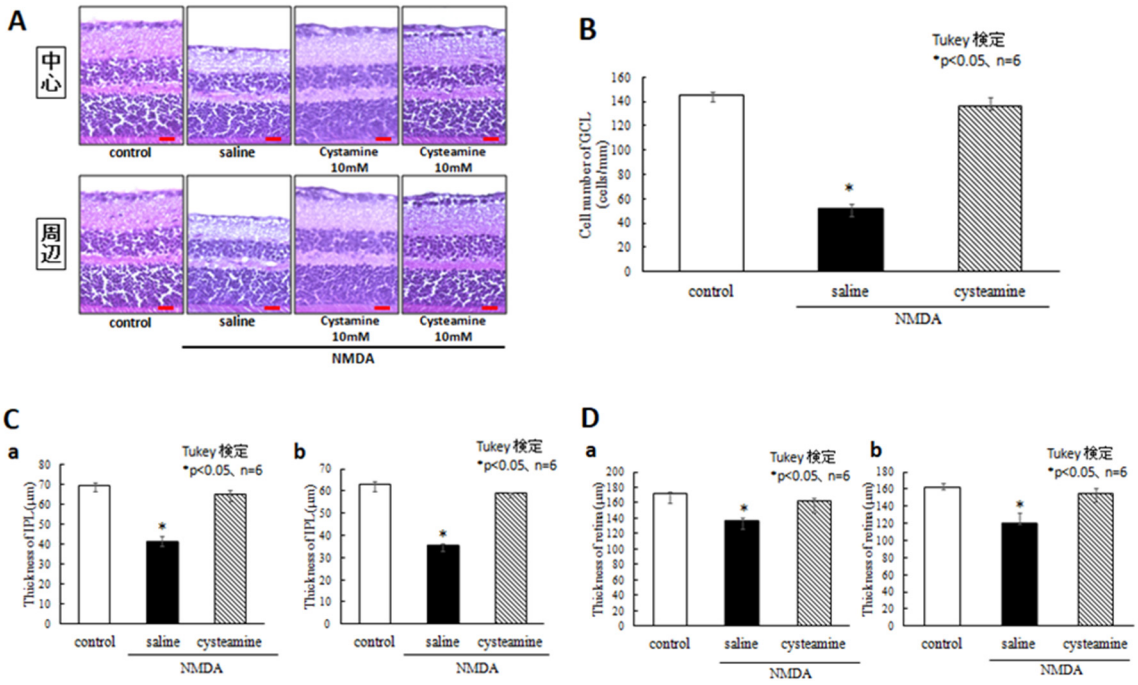


図 3. 正常眼圧緑内障モデルマウスに対するシステアミンの効果

A） NMDA硝子体内投与およびシステアミン点眼7日後の網膜組織標本。Scale bar＝20μm。

B） GCLの細胞数。

C） 中心部のIPLの厚さ（a）と周辺部のIPLの厚さ（b）。

D） 中心部の網膜全体の厚さ（a）と周辺部の網膜全体の厚さ（b）。

網膜中心部、周辺部両方のIPLの厚さとGCL細胞数において統計的な有意差が見られた。データは平均±標準偏差として表記した。統計解析はTukey-testにより実施した。n=6、*p＜0.05。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者である岩手大学農学部生化学研究室の山下哲郎教授に心より感謝を申し上げます。

文　献

1） Ozaki T, Tomita H, Tamai M, Ishiguro S. Characteristics of mitochondrial calpains. J Biochem.2007 Sep;142(3):365-76. Epub 2007 Jul 23. PMID: 17646173 DOI: 10.1093/jb/mvm143

2） Ozaki T, Yamashita T, Ishiguro S. ERp57-associated mitochondrial μ-calpain truncates apoptosis-inducing factor. Biochimi Biophys Acta. 2008 Oct;1783(10):1955-63. PMID: 18559257 DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.05.011

3） Ozaki T, Yamashita T, Ishiguro S. Mitochondrial m-calpain plays a role in the release of truncated apoptosis-inducing factor from the mitochondria. Biochim Biophys Acta. 2009 Dec;1793(12):1848-59. Epub 2009 Oct 13. PMID: 19833151 DOI: 10.1016/j.bbamcr.2009.10.002

4) Ozaki T, Nakazawa M, Yamashita T, Sorimachi H, Hata S, Tomita H, Isago H, Baba A, Ishiguro S. Intravitreal injection or topical eye-drop application of a μ-calpain C2L domain peptide protects against photoreceptor cell death in Royal College of Surgeons' rats, a model of retinitis pigmentosa. Biochim Biophys Acta. 2012 Nov;1822 (11):1783-95, 2012. Epub 2012 Aug 3. PMID: 22885154 DOI: 10.1016/j.bbadis.2012.07018
5) Ozaki T, Ishiguro S, Hirano S, Baba A, Yamashita T, Tomita H, Nakazawa M. Inhibitory Peptide of mitochondrial μ-calpain protects against photoreceptor degeneration in rhodopsin transgenic S334ter and P23H Rats. PLoS ONE. 2013 Aug 9;8(8):e71650. eCollection 2013. PMID 23951212 DOI: 10.1371/journal.pone.0071650
6) Ozaki T, Yamashita T, Tomita T, Sugano E, Ishiguro S. The protection of rat retinal ganglion cells from ischemia/reperfusion injury by the inhibitory peptide of mitochondrial μ-calpain. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Sep 30;478(4):1700-1705. Epub 2016 Sep 3. PMID: 27596965 DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.006
7) Sugawara M, Abe T, Kasai S, Itoh K, Ozaki T., Calpain-1 C2L domain peptide protects mouse hippocampus-derived neuronal HT22 cells against glutamate-induced oxytosis. Biochem Biophys Rep. 2021 Aug 12;27:101101. eCollection 2021 Sep. PMID: 34430716 DOI: 10.1016/j.bbrep.2021.101101
8) Oikawa T, Fukuda T, Yamashita T, Tomita H, Ozaki T. Lentiviral expression of calpain-1 C2-like domain peptide prevents glutamate-induced cell death in mouse hippocampal neuronal HT22 cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2022 Apr 25. PMID:35469046 DOI: https://doi.org/10.1007/s11626-022-00683-w
9) Chukai Y, Ito G, Konno M, Sakata Y, Ozaki T. Mitochondrial calpain-5 truncates caspase-4 during endoplasmicreticulum stress. Biochemi Biophys Res Commun. 2022 Mar 31;608:156-162. PMID: 35185293 DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.03.156
10) Funajima E, Ito G, Ishiyama E, Ishida K, Ozaki T. Mitochondrial localization of calpain-13 in mouse brain. Biochem Biophys Res Commun. 2022 Apr 4;609:149-155. PMID: 35429682 DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.04.002. PMID: 35429682 DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.04.002