

2021年8月16日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部

HIF-1 α /BNIP3 経路阻害がもたらす網膜神経保護作用

— 緑内障新規治療ターゲットへの期待 —

慶應義塾大学医学部眼科学教室の栗原俊英専任講師、國見洋光特任助教、李徳鎬（大学院医学研究科博士課程2年生）らの研究グループは、網膜虚血再灌流マウスモデル（注1）において、転写因子である低酸素誘導因子1 α （HIF-1 α ）の発現を遺伝子改変によって抑制することで、網膜神経細胞死の抑制効果を確認しました。

さらに、HIF-1 α の転写調節を受ける数十種類の遺伝子から、BCL2 19 kDa 関連タンパク3（BNIP3）が網膜神経細胞死の責任遺伝子であることを解明しました。

今回の研究成果は、本邦で失明原因第1位にもかかわらず根治治療が困難である緑内障における網膜神経細胞死のメカニズムの一端を解明し、緑内障に対する新規治療法開発へつながることが期待されます。

この研究成果は、2021年7月27日（グリニッジ標準時）に学際的総合ジャーナル『The FASEB Journal』（オンライン版）に掲載されました。

1. 研究の背景と概要

眼疾患の中でも緑内障や網膜虚血では、網膜神経細胞、とりわけ網膜内層における神経細胞障害が引き起こされます。これらの疾患では、網膜神経細胞に回復困難な障害が生じるため視機能障害が残り、最悪の場合は失明に至ります。現状、この網膜内層の神経細胞障害に対しては、悪化を抑制するための治療に頼らざるを得ず、その病態メカニズムの解明と新規治療法の開発が待たれています。

本研究グループは、以前から網膜虚血再灌流マウスモデルを用いて、網膜内層神経障害への新規治療ターゲットを研究してきました。このモデルでは、網膜内層神経細胞が障害され細胞死が引き起こされますが、その際に網膜内で HIF-1 α の発現が増加していることに着目しました。そこで、既知の HIF 阻害剤であるトポテカン（注2）をマウスに投与すると、同モデルにおける網膜神経細胞障害が軽減されました（参考文献1）。さらに同グループは、新規に HIF-1 α を阻害する薬剤としてハロフジノン（注3）を見出し、同薬剤がトポテカンと同様に網膜内層神経細胞に対して保護作用があることを報告しました（参考文献2）。これらの結果から、網膜内層神経障害に HIF-1 α が関与していることが示唆されました。

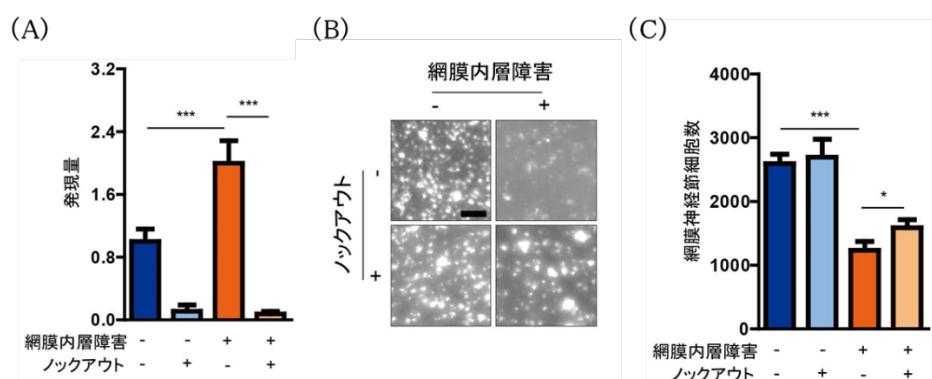
本研究では、*Hif-1a* 遺伝子欠失マウスを用いて、網膜内層神経障害に HIF-1 α が関与しているかを検討しました。また、転写因子である HIF-1 α の調節を受ける多数の遺伝子の中か

ら、網膜神経細胞死を引き起こす責任遺伝子を究明することを目的としました。

2. 研究の成果と意義・今後の展開

今回の研究により、①マウス網膜虚血再灌流モデルにおいて網膜神経細胞障害に HIF-1 α が関与していること、②網膜神経細胞で HIF-1 α の下流遺伝子である *Bnip3* の発現が増加していること、③細胞実験で HIF-1 α および BNIP3 が網膜細胞死に関与していること、④網膜内層神経細胞で BNIP3 の発現を抑制すると神経保護作用を示すことを見出しました。

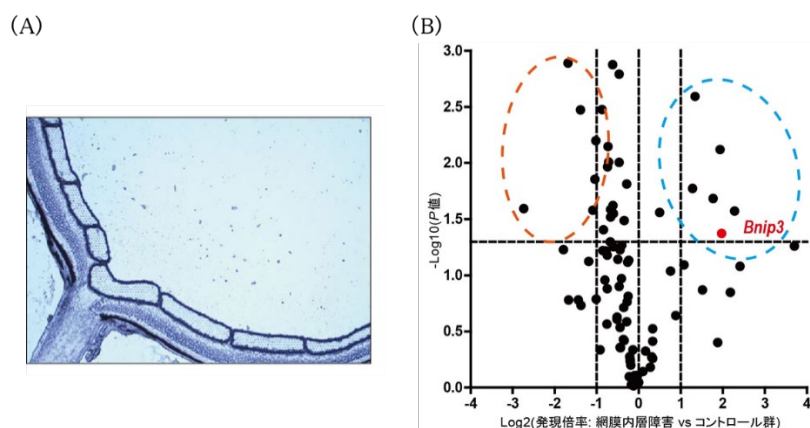
(1) 前述のように異なる 2 種の HIF 阻害剤が網膜神経保護作用を示すことから、遺伝子改変により網膜特異的に *Hif-1a* 遺伝子を欠失したマウス(ノックアウトマウス)を用いて網膜虚血再灌流を施行したところ、コントロール群に比べて有意に網膜内層神経細胞の障害が軽減していました (図 1)。



【図 1】 *Hif-1a* 欠失マウスの網膜神経保護作用

(A) ノックアウトマウスでは網膜の HIF-1 α の発現が減少していた ($p < 0.001$)。 (B, C) 網膜内層障害によって減少した神経細胞がノックアウトマウスで改善していた ($p < 0.05$)。

(2) HIF-1 α は転写因子であるため、転写調節を受ける数十種類の遺伝子が存在し、今回の網膜障害による網膜神経細胞死がどの遺伝子によって引き起こされているかを解明する必要がある。今回のマウスモデルで障害される網膜内層の神経細胞のみをレーザーで切り出して集め、その遺伝子発現を網羅的に調べたところ、数種類の遺伝子発現が増加しており、その中から細胞死に直結する BNIP3 を見出しました (図 2)。

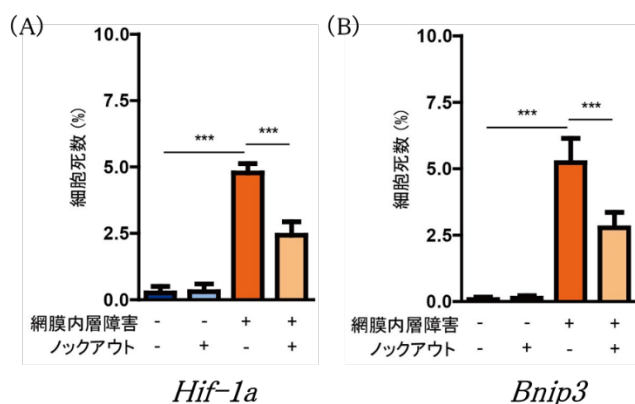


【図 2】 マウス網膜内層障害における遺伝子発現解析

(A) マウス網膜内層のみをレーザーを用いて抽出し、網膜内層障害によって網膜神経細胞で *Bnip3* 遺伝子発現が増加していた。

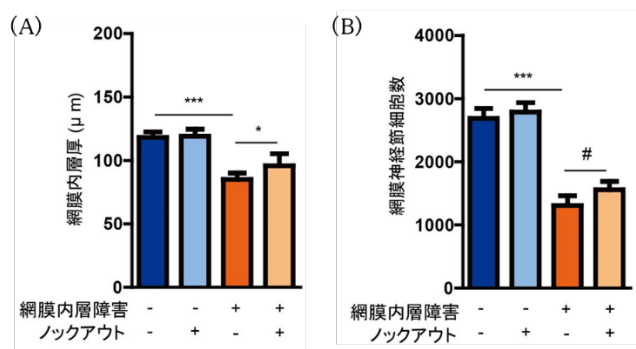
(3) ここまでの結果で、網膜内層の神経細胞死に HIF-1 α およびその下流遺伝子の *Bnip3* が関与している可能性が高いことがわかりました。本研究グループは、マウス網膜由来培養細

胞を用いて、*Hif-1a* と *Bnip3* をそれぞれノックアウトした細胞を作成しました。これらの細胞をコントロール細胞とともに低酸素環境に置くことで細胞死を誘導し、その細胞障害を比較しました。すると、*Hif-1a* ノックアウト細胞、*Bnip3* ノックアウト細胞ともに細胞死が抑制されました (図 3)。この結果から、細胞実験でも網膜細胞死に HIF-1 α と下流遺伝子 *Bnip3* が関与していることが示唆されました。



【図 3】 *Hif-1a*、*Bnip3* ノックアウト細胞による細胞死抑制効果
(A) *Hif-1a* および (B) *Bnip3* それぞれのノックアウト細胞が、低酸素環境で細胞死が抑制された ($p < 0.001$)。

(4) HIF-1 α /BNIP3 経路が網膜内層の細胞障害に関与していることをさらに検証するため、本研究グループは CRISPR/Cas9 システム (注 4) を用いて、マウスの網膜神経細胞における *Bnip3* の発現を抑制しました。同様に網膜虚血再灌流による傷害を与えた場合、このマウスはコントロール群に比して、網膜神経障害が軽減されていました (図 4)。またマウスの視機能を測定したところ、*Bnip3* 発現抑制群で有意に視機能が保たれていました。



【図 4】 *Bnip3* ノックアウトマウスにおける網膜神経保護作用
Bnip3 を発現抑制したマウスでは (A) 網膜内層厚の減少および (B) 網膜神経細胞数減少が有意に抑制された ($p < 0.05$)。

これらの結果をふまえ、マウス網膜内層神経障害による神経細胞死には HIF-1 α /BNIP3 経路が直接関与していることが解明されました。この分子メカニズムの発見により、今まで対症療法でしか治療できなかった緑内障をはじめとする網膜内層の疾患において、より病態生理に即して障害を抑制する新規治療へつながる可能性があります。

3. 特記事項

本研究は JSPS 科研費 (JP15K10881、JP18K09424、JP20K22692) の支援によって行われました。

4. 論文

英文タイトル: Inhibition of the HIF-1 α /BNIP3 pathway has a retinal neuroprotective effect

タイトル和訳: HIF-1 α /BNIP3 経路の抑制が網膜神経保護効果を持つ

著者名: 國見洋光、李德鎬、伊吹麻里、堅田侑作、根岸一乃、坪田一男、栗原俊英

掲載誌: The FASEB Journal

DOI: 10.1096/fj.202100572R

【参考文献】

1. タイトル: HIF inhibitor topotecan has a neuroprotective effect in a murine retinal ischemia-reperfusion model

掲載誌: Peer J

DOI: 10.7717/peerj.7849

2. タイトル: A Novel HIF Inhibitor Halofuginone Prevents Neurodegeneration in a Murine Model of Retinal Ischemia-Reperfusion

掲載誌: International Journal of Molecular Sciences

DOI: 10.3390/ijms20133171

【用語解説】

(注 1) 網膜虚血再灌流マウスモデル: 一時的にマウスの眼圧を上昇させて網膜への血流を途絶させることで網膜内層の神経細胞を傷害する動物モデル。

(注 2) トポテカン: 抗腫瘍薬の一種であり、HIF-1 α の阻害作用が報告されている。

(注 3) ハロフジノン: 紫陽花に含まれる薬理活性物質フェブリフジンから嘔吐作用を除外した人工化合物。

(注 4) CRISPR/Cas9 システム: 任意の遺伝子を削除したり追加したりできる新規の遺伝子改変技術。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、各社科学部等に送信しております。

【本発表資料のお問い合わせ先】

慶應義塾大学医学部 眼科学教室

専任講師 栗原 俊英 (くりはら としひで)

TEL: 03-5363-3204 FAX: 03-5363-3274 E-mail: kurihara@z8.keio.jp

<http://lab.ophtal.med.keio.ac.jp/program/kuriharas-lab>

【本リリースの配信元】

慶應義塾大学

信濃町キャンパス総務課: 山崎・飯塚・奈良

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35

TEL: 03-5363-3611 FAX: 03-5363-3612

E-mail: med-koho@adst.keio.ac.jp

<http://www.med.keio.ac.jp>

※本リリースのカラー版をご希望の方は【本リリースの配信元】までご連絡ください。