

## 222. 分岐鎖アミノ酸による網膜色素変性の新規治療薬の開発

長谷川 智子

\*京都大学 医学部附属病院 眼科

Key words : 分岐鎖アミノ酸, 網膜色素変性, 神経細胞変性, 細胞内エネルギー, グルコーストランスポーター

### 緒言

日本における中途失明の主要な原因である網膜色素変性や緑内障では網膜の神経細胞が変性する。網膜色素変性は網膜の視細胞が徐々に変性し、視野狭窄や視力低下が進行する難病であり、日本では視覚障害原因の第2位、60歳未満では第1位の原因疾患である [1]。遺伝子治療、再生医療、薬物療法、人口網膜等、多方面から研究が行われているが、視細胞の変性を防ぐ有効な治療法は確立されていない。一方、緑内障は日本の視覚障害の第1位の原因疾患であり、網膜の神経節細胞が変性し視野狭窄が進行するが、標準治療である眼圧下降治療を行っても視機能の悪化が進行する例が少なくない [2]。これら疾患に対して、網膜の神経細胞の変性を抑制する新たな治療法が求められている。

著者らは、現在までに、細胞内のエネルギー (ATP) 不足が神経細胞の細胞死を引き起こすとの仮説に基づき、『細胞内のエネルギーを保持することで細胞死を抑制する』という斬新な可能性に着目し、検討を行ってきた。まず、細胞内 ATP の消費の抑制という観点から、生体内に豊富に存在する ATPase である Valosin-containing protein の ATPase 活性を抑制する新規化合物の投与により、神経細胞変性を抑制できることを報告した [3~5]。次に、著者らは、細胞内エネルギー源としての分岐鎖アミノ酸に着目し、分岐鎖アミノ酸が小胞体ストレスや電子伝達系阻害ストレス下の培養細胞で、細胞内 ATP 濃度低下を抑制し、細胞死を抑制することを明らかにした。さらに、網膜変性モデルマウスである rd10 や rd12 に対して、分岐鎖アミノ酸が視細胞の変性脱落を抑制し、網膜機能の低下を抑制すること、緑内障モデルマウスにおいては網膜神経節細胞の変性を抑制することを、初めて明らかにした [6, 7]。著者らは、網膜色素変性患者に対する分岐鎖アミノ酸の視機能低下抑制効果を検討するため、2019年3月より医師主導治験を実施した (jRCT2051180072、結果は解析中)。

本研究の目的は、分岐鎖アミノ酸による神経細胞保護効果の詳細なメカニズムを解明し、また、次相試験への準備として、網膜色素変性の進行および進行抑制効果を鋭敏にとらえることができるバイオマーカーを開発することで、分岐鎖アミノ酸による網膜色素変性の新規進行抑制治療薬を開発することである。

### 方法および結果

#### 1. エネルギー産生各段階の阻害下での分岐鎖アミノ酸の効果の検討

アミノ酸飢餓下の HeLa 細胞に、ヘキソキナーゼ阻害剤であるロニダミン (300  $\mu$ M)、GAPDH 阻害剤である heptelidic acid (0.6  $\mu$ M)、およびピルビン酸キナーゼ M2 阻害剤であるシコニン (3  $\mu$ M) の添加により解糖系を阻害した。また、ミトコンドリア Mitochondrial Pyruvate Carrier の阻害剤である UK5099 (5  $\mu$ M) の添加によりクエン酸回路を阻害した。40 mM の分岐鎖アミノ酸 (L-イソロイシン : L-ロイシン : L-バリン = 1 : 2 : 1.2) を添加し、細胞内 ATP レベルを測定した。

#### 2. 細胞内へのグルコースの取り込みへの分岐鎖アミノ酸の効果の検討

アミノ酸飢餓下の HeLa 細胞およびマウス視細胞由来細胞株である 661W 細胞に、蛍光標識された 2-デオキ

シ-D-グルコース (2-DG) を取り込ませ、フローサイトメトリーを用いて蛍光量を測定することで、細胞内へのグルコースの取り込みを定量評価した。グルコーストランスポーター1、3 および 4 の阻害剤である WZB117 を添加し、分岐鎖アミノ酸を添加して、細胞内へのグルコースの取り込みを定量評価した。

### 3. グルコーストランスポーターのトランスロケーションへの分岐鎖アミノ酸の効果の検討

Enhanced green fluorescent protein (EGFP) 標識したグルコーストランスポーター1 およびグルコーストランスポーター3 を HeLa 細胞およびマウスの視細胞由来細胞株である 661W 細胞に強制発現させ、蛍光顕微鏡を用いてグルコーストランスポーターの動態を経時的に観察し、分岐鎖アミノ酸によるグルコーストランスポーターのトランスロケーションへの影響を経時的に評価した。

### 4. 網膜色素変性の進行の各種指標による検出感度の検討

京都大学医学部附属病院において 12 か月間隔で 4 回以上の静的量的視野検査 (ハンフリー10-2) および光干渉断層計検査 (Spectralis, Heidelberg Engineering) を施行した定型網膜色素変性患者を対象とした。ハンフリー10-2 視野検査での Mean deviation (MD) 値および total point score、光干渉断層計での Ellipsoid zone 可視範囲長、中心窩網膜厚、中心窩外顆粒層厚、中心窩外節厚、および視力 (logMAR) について、線形回帰を用いて進行検出率を評価した。また、各検査項目での測定値を標準化した上で各検査項目での進行速度と検査間変動を評価した。

## 結 果

### 1. エネルギー産生の各段階の阻害下での分岐鎖アミノ酸の効果

アミノ酸飢餓下の HeLa 細胞において、ロニダミン、heptelidic acid、シコニンによる解糖系の阻害、および UK5099 の添加によるクエン酸回路の阻害により、細胞内 ATP レベルは有意に低下した。低下した細胞内 ATP レベルは、40 mM の分岐鎖アミノ酸添加により、有意に回復した (図 1) [8]。

### 2. 分岐鎖アミノ酸による細胞内へのグルコース取り込み増強

分岐鎖アミノ酸投与により、HeLa 細胞において細胞内へのグルコースの取り込みが有意に増強した (図 2a)。WZB117 によってグルコーストランスポーターを阻害した HeLa 細胞および 661W 細胞においては、分岐鎖アミノ酸は細胞内へのグルコース取り込みを増強せず、細胞死も抑制しなかった (図 2b) [8]。

### 3. 分岐鎖アミノ酸によるグルコーストランスポーターのトランスロケーション促進

分岐鎖アミノ酸投与により、HeLa 細胞および 661W 細胞において、グルコーストランスポーターの細胞膜へのトランスロケーションが増強した (図 3) [8]。

### 4. 網膜色素変性の進行および進行抑制効果の検出感度

網膜色素変性 22 例での進行検出率は Ellipsoid zone 可視範囲長で 22 眼中 12 眼と最も高かった。標準化後の進行速度は、Ellipsoid zone 可視範囲長で最も速く、検査間変動 (最小絶対値) は Ellipsoid zone 可視範囲長で最も小さかった [9]。

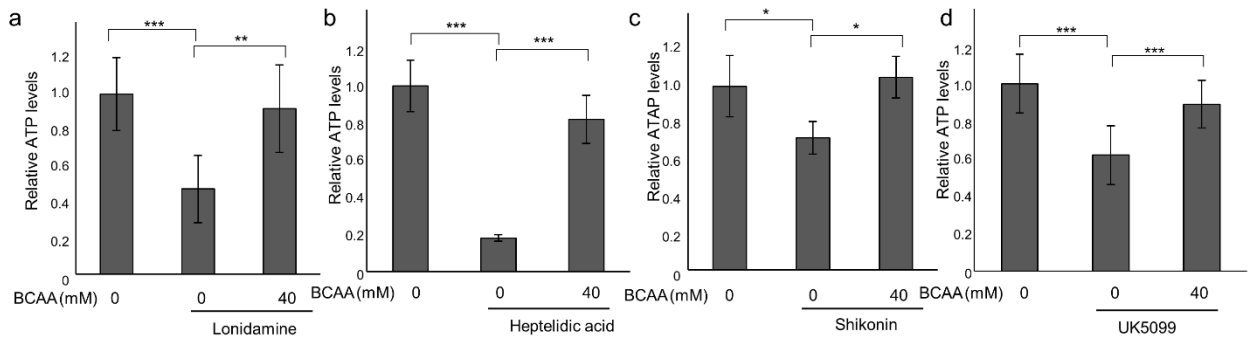


図 1. 分岐鎖アミノ酸による細胞内へのグルコース取り込み促進 ([8] より改変)

アミノ酸飢餓下の HeLa 細胞に、分岐鎖アミノ酸 (BCAA、40 mM)、lonidamine (300  $\mu$ M)、heptelidic acid (0.6  $\mu$ M)、Shikonin (3  $\mu$ M)、UK5099 (5  $\mu$ M) を添加し、細胞内 ATP レベルを測定した。

- lonidamine 添加により細胞内 ATP レベルは低下したが ( $***P < 0.005$ , Tukey HSD)、分岐鎖アミノ酸投与により回復した ( $**P < 0.01$ , Tukey HSD)。
- Heptelidic acid 添加により細胞内 ATP レベルは低下したが ( $***P < 0.005$ , Tukey HSD)、分岐鎖アミノ酸投与により回復した ( $***P < 0.005$ , Tukey HSD)。
- Shikonin 添加により細胞内 ATP レベルは低下したが ( $*P < 0.05$ , Tukey HSD)、分岐鎖アミノ酸投与により回復した ( $*P < 0.05$ , Tukey HSD)。
- UK5099 添加により細胞内 ATP レベルは低下したが ( $***P < 0.005$ , Tukey HSD)、分岐鎖アミノ酸投与により回復した ( $***P < 0.005$ , Tukey HSD)。

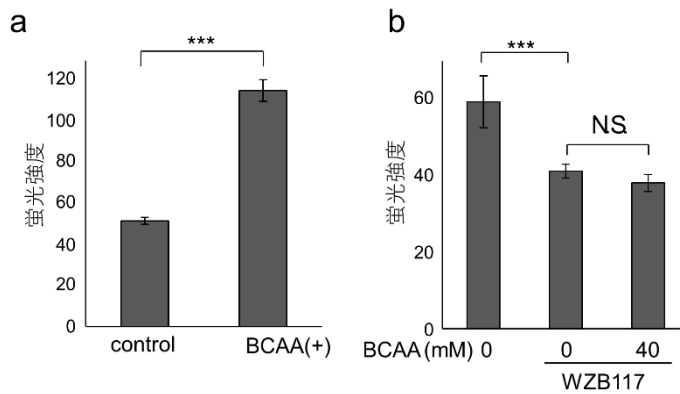


図 2. 分岐鎖アミノ酸による細胞内へのグルコース取り込みの増強 ([8] より改変)

アミノ酸飢餓下の HeLa 細胞に分岐鎖アミノ酸 (40 mM) およびグルコーストランスポーター阻害剤である WZB117 (250  $\mu$ M) を添加した。蛍光標識されたデオキシグルコースの取り込みを評価することで、グルコースの細胞内取り込みを定量評価した。

- 分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 添加により、細胞内へのグルコース取り込みが有意に増強した ( $***P < 0.0001$ , unpaired t-test)。
- WZB117 添加により細胞内へのグルコース取り込みが有意に減少した ( $***P < 0.001$ , Tukey HSD)。WZB117 添加下では、分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 添加はグルコースの取り込みを変化させなかった (N.S. :  $P = 0.99$ , Tukey HSD)。

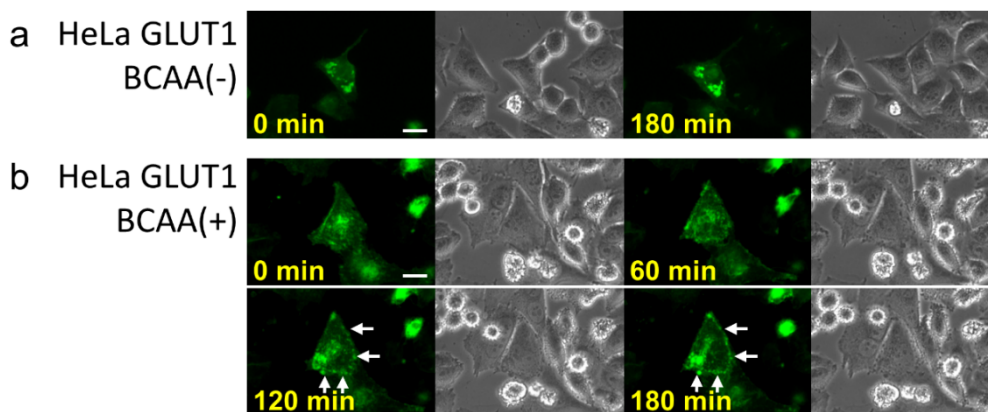


図 3. 分岐鎖アミノ酸によるグルコーストランスポーターのトランスロケーション促進 ([8] より改変)  
Enhanced green fluorescent protein (EGFP) にて蛍光標識したグルコーストランスポーター1 を強制発現させた HeLa 細胞をアミノ酸飢餓下で培養し、分岐鎖アミノ酸 (80 mM) を添加し、蛍光顕微鏡を用いてグルコーストランスポーターの動態を経時的に観察した。

- a) 分岐鎖アミノ酸無添加の HeLa 細胞ではグルコーストランスポーターの細胞膜へのトランスロケーションは増強しなかった。
- b) 分岐鎖アミノ酸を添加した HeLa 細胞では、グルコーストランスポーターの細胞膜へのトランスロケーションが増強した (白矢印)。スケールバー：20  $\mu$ m。

## 考 察

著者らは現在までに、分岐鎖アミノ酸が小胞体ストレスや電子伝達系阻害ストレス下の培養細胞で、細胞内 ATP 濃度低下を抑制し、細胞死を抑制することを明らかにしている [6, 7]。本研究ではさらに、分岐鎖アミノ酸が解糖系の阻害下やクエン酸回路阻害下であっても細胞内 ATP 濃度低下を抑制する一方、分岐鎖アミノ酸はグルコーストランスポーターの阻害下では細胞内 ATP 濃度低下を抑制しないことを明らかにした。さらに、蛍光標識したグルコーストランスポーターを強制発現させた培養細胞を用いて、分岐鎖アミノ酸がグルコーストランスポーターの細胞膜へのトランスロケーションを増強することを明らかにした [8]。

また、著者らは現在までに、網膜変性モデルマウスである rd10 や rd12 に対して、分岐鎖アミノ酸が視細胞の変性と網膜機能の低下を抑制することを明らかにしている [6]。著者らは、網膜色素変性患者に対する分岐鎖アミノ酸の視機能低下抑制効果を検討するため、2019 年 3 月より医師主導治験を実施した (jRCT2051180072、結果は解析中)。網膜色素変性は進行の経過に個人差が大きい疾患であり、今後の治療開発の上では、疾患進行や進行抑制効果を鋭敏に検出できるバイオマーカーの開発が必須である。本研究では網膜色素変性患者の視野検査や視力検査、網膜光干渉断層計検査の各項目での進行を比較検討し、光干渉断層計検査での Ellipsoid zone 可視範囲長測定が、網膜色素変性の進行を鋭敏に検出できることを明らかにした [9]。

本研究により、分岐鎖アミノ酸は、細胞内のグルコーストランスポーターの細胞膜へのトランスロケーションを増強し、細胞内へのグルコースの取り込みを増強することによって、細胞内の ATP 産生を増強することが示された。分岐鎖アミノ酸投与は、網膜神経細胞変性を抑制する治療法につながる可能性があると考えられる。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院医学研究科眼科学研究室の池田華子特定准教授である。本研究は上原記念生命科学財団の 2020 年度研究奨励金の助成をいただき、実施することができたことに御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Morizane Y, Morimoto N, Fujiwara A, Kawasaki R, Yamashita H, Ogura Y, Shiraga F. Incidence and causes of visual impairment in Japan: the first nation-wide complete enumeration survey of newly certified visually impaired individuals. *Jpn J Ophthalmol*. 2019 Jan;63(1):26-33. PMID: 30255397 DOI: 10.1007/s10384-018-0623-4. Epub 2018 Sep 25.
- 2) Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 1998 Oct;126(4):498-505. PMID: 9780094 DOI: 10.1016/s0002-9394(98)00272-4.
- 3) Hata M, Ikeda HO, Kikkawa C, Iwai S, Muraoka Y, Hasegawa T, Kakizuka A, Yoshimura N KUS121, a VCP modulator, attenuates ischemic retinal cell death via suppressing endoplasmic reticulum stress. *Sci Rep*. 2017 Mar 20;7:44873. PMID: 28317920 DOI: 10.1038/srep44873.
- 4) Hasegawa T, Muraoka Y, Ikeda HO, Tsuruyama T, Kondo M, Terasaki H, Kakizuka A, Yoshimura N. Neuroprotective efficacies by KUS121, a VCP modulator, on animal models of retinal degeneration. *Sci Rep*. 2016 Aug 9;6:31184. PMID: 27503804 DOI: 10.1038/srep31184.
- 5) Nakano N, Ikeda HO, Hasegawa T, Muraoka Y, Iwai S, Tsuruyama T, Nakano M, Fuchigami T, Shudo T, Kakizuka A, Yoshimura N. Neuroprotective effects of VCP modulators in mouse models of glaucoma. *Heliyon*. 2016 Apr 19;2(4):e00096. PMID: 27441270 DOI: 10.1016/j.heliyon.2016.e00096.
- 6) Hasegawa T, Ikeda HO, Iwai S, Muraoka Y, Tsuruyama T, Okamoto-Furuta K, Kohda H, Kakizuka A, Yoshimura N. Branched chain amino acids attenuate major pathologies in mouse models of retinal degeneration and glaucoma. *Heliyon*. 2018 Mar 1;4(2):e00544. PMID: 29560458 DOI: 10.1016/j.heliyon.2018.e00544.
- 7) Hasegawa T, Ikeda HO. Adenosine triphosphate maintenance by branched chain amino acids as a novel neuroprotective strategy for retinal neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*. 2019 Jan;14(1):82-84. PMID: 30531080 DOI: 10.4103/1673-5374.244788.
- 8) Iwai S, Hasegawa T, Ikeda HO, Tsujikawa A. Branched Chain Amino Acids Promote ATP Production Via Translocation of Glucose Transporters. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2022 Aug 2;63(9):7. PMID: 35930269 DOI: 10.1167/iovs.63.9.7.
- 9) Hasegawa T, Oishi A, Ikeda HO, Numa S, Miyata M, Otsuka Y, Oishi M, Tsujikawa A. Detection Sensitivity of Retinitis Pigmentosa Progression Using Static Perimetry and Optical Coherence Tomography. *Transl Vis Sci Technol*. 2021 Jul 1;10(8):31. doi: 10.1167/tvst.10.8.31. PMID: 34323953