

2023 年 10 月 24 日

各 位

会 社 名 株式会社 坪田ラボ
代表者名 代表取締役社長 坪田 一男
(コード番号：4890 東証グロース市場)
問合せ先 執行役員管理本部長 清水 貴也
(TEL 03-6384-2866)

研究論文「バイオレットライトはマウス網膜において OPN5 を介して EGR-1 の発現を亢進する」
の掲載につきまして

このたび当社代表（CEO）、坪田一男（慶應義塾大学名誉教授）が慶應義塾大学医学部と実施する共同研究において、オプシン5がマウス網膜におけるバイオレットライトによる EGR-1^(※1) の発現を亢進する可能性があることを発見し、その結果及び考察が学術誌『Scientific Reports』に掲載されましたので、お知らせ致します。

タイトル: Opsin 5 mediates violet light-induced early growth response-1 expression in the mouse retina
著 者 名: 丁憲煜、李德鎬、姜効炎、根岸一乃、坪田一男、栗原俊英
掲 載 誌: Scientific Reports
U R L: <https://www.nature.com/articles/s41598-023-44983-x>

【研究の背景】

近視は、アジア諸国だけでなく欧米諸国でも公衆衛生上の問題となっています。

当研究グループは以前、ニワトリとマウスの近視実験モデルにおいて、バイオレットライト（VL、波長 360-400nm）の照射が近視の進行を効果的に抑制することを発見しました。

網膜特異的オプシン5（OPN5）^(※2) ノックアウトマウス^(※3)では、近視進行に対する VL の抑制効果が減少し、また VL 曝露はニワトリの脈絡膜組織における EGR-1 の発現を上昇させました。EGR-1 遺伝子の活性化は、眼軸の伸びをおさえて近視進行を抑える働きを持つといわれています。

しかし、VL 曝露後のマウスにおける EGR-1 の発現と OPN5 の役割については不明な点が多く、本研究では VL 曝露による EGR-1 の発現上昇が、マウス網膜における OPN5 の発現に依存するかどうかを検討しました。

【結果】

① OPN5 ノックアウトマウスの 661W 細胞では、VL による EGR-1 発現誘導が減少

マウス網膜由来細胞株 661W 細胞と OPN5 ノックアウト 661W 細胞を $280 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ の VL (360–400nm) に 2 時間曝露し、その後暗所で培養しました。指定した時点で、細胞内の *Egr-1* mRNA とタンパク質レベルを、それぞれウェスタンブロット^(※4)とリアルタイム PCR で評価したところ、*Egr-1* の発現は、VL 曝露の 1 時間後に有意に増加した一方で、OPN5 ノックアウト 661W 細胞では、*Egr-1* 発現の劇的な増加は検出されませんでした。

次にタンパク質の発現を調べたところ、661W 細胞では VL 曝露 1 時間後に有意な増加が検出されたのに対して、OPN5 ノックアウト 661W 細胞では、VL 曝露 0.5 時間後に EGR-1 発現はわずかに上昇したものの、対照群の 661W 細胞と比較して、VL 曝露 1 時間後に劇的な発現誘導は認められませんでした。

② VL による EGR-1 発現誘導をマウス網膜で観察

野生型マウスを 12:12 時間の明暗サイクル (00:00 から 12:00) で飼育し、 $400 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ の VL (360–400 nm) を 3 時間 (9:00 から 12:00) 照射しました。VL 曝露前、曝露後 3、5、7、12、24 時間 (9 時、12 時、14 時、16 時、21 時、翌日 9 時) にマウス網膜を採取し、*Egr-1* の mRNA 発現を評価しました。

その結果、*Egr-1* の網膜発現は VL 曝露後 5–7 時間で劇的に増加しました。

そこで、この *Egr-1* 発現の増加が VL 曝露によるものか、内因性の *Egr-1* 発現リズムによるものかを確認するため、1 週間暗室で飼育したマウスの網膜における *Egr-1* の mRNA 発現と VL 曝露 7 時間後の網膜における *Egr-1* の mRNA 発現を比較しました。

その結果、*Egr-1* の発現は、VL に曝露した網膜では暗所にある網膜に比べて有意に高いことが観察されました。

また VL 曝露後、EGR-1 の発現は網膜神経節細胞層と内核層で観察され、VL 曝露後の網膜における EGR-1 発現の増加が示されました。

③ マウス網膜における VL で誘導される EGR-1 発現亢進は OPN5 の発現に依存

OPN5 がマウス網膜における VL 誘発 EGR-1 発現を亢進するかどうかを調べました。コントロールマウスと OPN5 コンディショナルノックアウトマウスを 12:12 時間の明暗サイクル (00:00 から 12:00) で飼育し、 $400 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ の VL (360–400nm) を 3 時間 (9:00–12:00) 照射し、VL 曝露前、曝露後 3 時間および 7 時間 (9 時、12 時、16 時) にマウス網膜を採取し、EGR-1 の mRNA およびタンパク質の発現を評価しました。

その結果 mRNA 発現に関しては、網膜特異的 OPN5 ノックアウトマウスで 7 時間の VL 曝露後、VL 曝露による *Egr-1* 発現の有意な低下が観察されました。そしてこの現象は、VL 曝露 7 時間後のタンパク質発現においても一貫して検出されました。また OPN5 ノックアウトマウスでは、VL 曝露後に発現が増加したものの、対照群に比べ発現量は低いことが観察されました。

【今回の研究成果】

本研究では、遺伝子工学的手法を用いて、VL 曝露がマウス網膜およびマウス網膜細胞における EGR-1 発現を亢進すること、および VL 曝露による EGR-1 発現亢進が網膜 OPN5 経路を介していることを示しました。

これまで実験的近視の進行における EGR-1 と OPN5 の関連性は明確に報告されていなかったところ、当研

究グループは、これらの遺伝子が相互作用的に関連していることを見出しました。

【当社にとっての意義】

本研究の結果から、OPN5 はマウス網膜およびマウス網膜細胞における VL 誘発 EGR-1 発現を亢進することが判明しました。またこれまで「VL が OPN5 を介して近視進行を抑制する」、「VL により網膜の EGR-1 が上昇する」と個別に検証してきたことを本研究の結果によりつなぐことができました。

こうした分子標的は、今後の近視予防および治療に新たな可能性を開くものとして注目されるところと考へております。その意味で、当社が保有する近視領域での既存パイプラインの深化や新たなパイプラインの発掘に繋がるものとして期待されるものです。

(※1) EGR-1

哺乳類の転写因子。転写因子とは、DNA に結合して遺伝子の活性を調節（DNA から mRNA への転写量を調節する）するタンパク質で、地球上に存在するすべての生物に共通する根源的な生命活動を担っており、その作用により、個々の細胞で必要な時に遺伝子が活性化され、細胞は分化し、環境に適応することができる。

(※2) オプシン 5 (OPN5)

ニューロプシン (Neuroopsin) といわれる非視覚系光受容体の一つ。380nm にその吸収スペクトルのピークを持つ。

(※3) ノックアウトマウス

遺伝子操作により 1 つ以上の遺伝子を欠損させたマウス。

(※4) ウェスタンブロット

目的タンパク質の検出や発現量の評価、分子量の推定を可能にするための手法。

以上