

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10883

研究課題名(和文) ラパマイシンによる網膜色素変性症モデルラット網膜の外顆粒層細胞死抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of suppression of outer nuclear layer cell death of retinitis pigmentosa model rat retina by rapamycin.

研究代表者

西沢 祐治 (NISHIZAWA, Yuji)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：80252229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は網膜色素変性症(RP)モデルラットであるロドプシンP347Lトランスジェニックラット(Tgラット)の眼球へラパマイシンを微量注入することにより、視細胞死を一過性に抑制することに成功した。ラパマイシン注入によって、Tgラット網膜のBipとCHOPのmRNA発現量が一過性に有意に低下した。一方でAtg5のmRNA発現量は一貫してTgラットで有意に増加していた。また、ラパマイシンの注入後の視細胞でLC3の蛍光強度が大きく増強していた。以上の結果から、Tgラット眼球へのラパマイシン注入により、オートファジーが一過性に亢進し、小胞体ストレス応答が改善してアポトーシスが遅延したことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We successfully transiently suppressed visual photoreceptor death by microinjecting rapamycin to the eyeball of rhodopsin P347L transgenic rat (Tg rat), a retinal pigmentosa (RP) model rat. By rapamycin injection, mRNA expression levels of Bip and CHOP of the Tg rat retina were transiently and significantly decreased. On the other hand, mRNA expression level of Atg5 consistently increased significantly in Tg rats. Also, the fluorescence intensity of LC3 was greatly enhanced in visual cells after injection of rapamycin. From the above results, it was suggested that autophagy was transiently enhanced by injection of rapamycin into the Tg rat eyeball, and the ER stress response improved and apoptosis was delayed.

研究分野：網膜色素変性症の病態解析と治療の研究

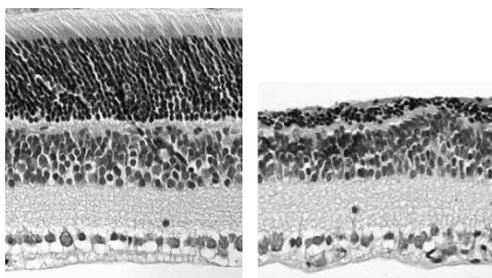
キーワード：網膜色素変性症 網膜 視細胞 ロドプシン トランスジェニックラット ラパマイシン アポトーシス オートファジー

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 網膜色素変性症は遺伝性疾患であり、発症頻度は本邦では 4,000~8,000 人に一人、患者数は 2 万人から 3 万人存在し、世界中では約 150 万人と見積もられている。原因遺伝子として、ロドプシン、ペリフェリン/RDS、PDE $\beta$  など、多数が同定されている。申請者と連携研究者が開発した P347L 変異ロドプシン遺伝子を導入したトランスジェニックラットは生後の視細胞外節形成時期に網膜色素変性症を発症するため、外節が形成されずに視細胞層 (外顆粒層) がアポトーシスで変性消失し、生後 14 日 (2 週齢) でほぼ完全に外顆粒層が消失することが明らかになっ

図 1. 正常ラット(2 週齢)と P347L ラット

#### (2 週齢)の網膜



正常ラット

P347L ラット

た (図 1. コ・メディカル形態機能学会第 12 回学術集会 (広島市) 発表、2013 年)。生後 9 日目のアポトーシス開始直前の P347L ラット眼球内にラパマイシンを注入したところ、生後 14 日目で外顆粒層の減少が大幅に抑えられていたため、この間の変性を抑制することができれば網膜色素変性症の治療に大きな展望が開けることが明らかであった。

(2) 変異ロドプシンを発現するトランスジェニック動物では、先に杆体視細胞が変性し、それに伴って本来異常の無い錐体視細胞も変性する。その中でも、P347L ロドプシン変異と密接に関係するものに、ロドプシンの異所性蓄積が細胞死を引き起こすという報告がある (Tsuji-kawa M, Malicki J. PNAS 104:14819, 2007.)。申請者は P347L ラット網膜を抗ロドプシン抗体とタネル法を用いて染色し、ロドプシンが外顆粒層の全ての視細胞の細胞質へ異所性に蓄積することと、外顆粒層の下層の視細胞核から上層に向かって経時的に DNA の断片化が生じていることを確認した (コ・メディカル形態機能学会第 13 回学術集会 (北九州市) 発表、2014 年)。また P347L ウサギでは杆体視細胞の変性過程で生じた小胞が視細胞周囲に蓄積している (Kondo M. et al, 2009.) が、申請者はこれらの小胞にロドプシンが含まれていることを免疫細胞化学によって確かめている (未発表)。主に杆体視細胞の変性死に伴って錐体視細胞の細胞死が誘発される以上、杆体視細胞のアポトーシスシグナルを遮断して、さらに変性過程の杆体視細胞を効果的に除去で

きれば、錐体視細胞の細胞死を阻止できるはずである。そのためには、変性後も視細胞周囲に留まっている杆体細胞由来のデブリ小胞を効果的に除去する抗体の開発が必要であると考えた。

### 2. 研究の目的

網膜色素変性症を発症する遺伝子変異の内 10%を占めるロドプシン遺伝子変異では、変異ロドプシンが小胞体内に蓄積し、小胞体ストレス応答の破綻によるアポトーシス誘導によって視細胞の細胞死が生じると考えられている。アポトーシスを阻止すれば視細胞死による網膜変性を抑制または遅延させることが可能であるが、未だ効果的な方法は発見されていない。本研究では、変異ロドプシン発現トランスジェニック動物 (ラットおよびウサギ) を利用し、網膜色素変性症発症過程で生ずるアポトーシスによる視細胞死がラパマイシン投与によって抑制される仕組みを解明する。さらに、P347L 変異ロドプシン特異的モノクローナル抗体によって抗体依存性細胞介在性障害 (ADCC) 作用による杆体外節由来の変性小胞の除去および変性した杆体視細胞の除去によって錐体視細胞の細胞死を阻止する。最終的には我々のモデル動物の視細胞の長期機能維持を達成することによって、可能な限り侵襲の少ない網膜色素変性症治療法の確立を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) トランスジェニック動物の網膜色素変性症における小胞体ストレス関連試薬の効果を解析する。

P347L ラットを用い、ラパマイシンとその他の小胞体ストレス関連試薬をそれぞれ眼内に注射し、経時的に網膜組織の構造を調べる。P347L ラットの外顆粒層は、生後 10 日から急速に厚みが減少することが分かっているため、生後 9 日以前からラパマイシンの投与を開始して網膜の構造変化を調べる。解析には免疫組織化学を用い、網膜の構造の変化、視細胞内のロドプシンおよび小胞体ストレスタンパク質の局在について詳細に調べる。ラパマイシンの投与によって変異ロドプシンの発現量に変化があると考えられるので、リアルタイム PCR によって mRNA レベルをモニターしていく。

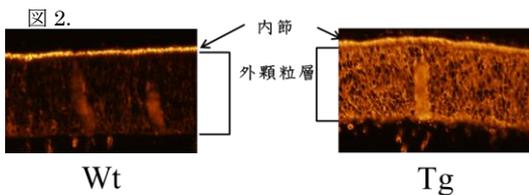
(2) P347L 変異ロドプシンに特異的に反応するモノクローナル抗体を作製する。

P347L 変異ロドプシンに特異的に反応するモノクローナル抗体を作製するための戦略の要は、ハイブリドーマのスクリーニング方法にある。ロドプシンの 347 番目のプロリンをロイシンに置換した合成ペプチド (以下、P347L ペプチド) とワイルドタイプの正常ロドプシンペプチド (以下、WT ペプチド) の両方を用いて、ELISA 法を使ってハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることにより、P347L ペプチドとのみ反応する抗体産生

ハイブリドーマを選択できる。さらに免疫抗原と同じエピトープを持つ変異ロドプシンを発現している P347L ウサギの網膜を用いて間接蛍光抗体法とウエスタンブロットによってスクリーニングを行う。

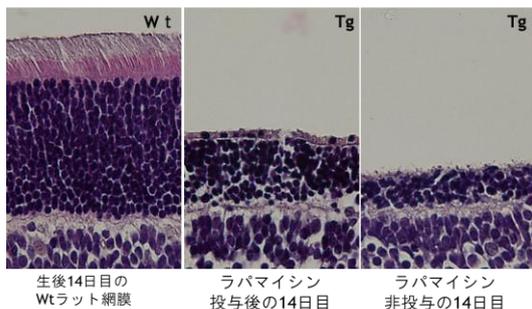
#### 4. 研究成果

(1) 本研究に用いた P347L ラット (Tg ラット) の網膜では、生後 9 日目に 13 から 15 層の外顆粒層が完成するが、その後外節が伸長することなくアポトーシスによって視細胞が変性消失し、生後 14 日目には 2~3 層にまで減少する。この網膜色素変性症 (RP) モデルラットの視細胞変性消失過程は、現在までに知られているどの RP モデル動物より急激な変化である。タネル法による DNA 断片化検出によると、減少した 2~3 層の細胞核に DNA 断片化が生じていたため、この時点で視細胞は死滅していると考えられた。Wt と Tg の両方のロドプシンと反応する抗体を用いた蛍光抗体染色観察を行ったところ、生後 8 日目で Wt の内節に蓄積するロドプシンが、Tg ラットでは視細胞の細胞質に蓄積していた (図 2)。



Wt では 10 日以降の外節形成と同時にロドプシンが外節に輸送されるが、Tg ラットでは外節が形成されずにロドプシンは視細胞の細胞質にとどまり続ける。次に、ラット網膜の外顆粒層が完成する前日の生後 8 日目の Tg ラット眼球へラパマイシンを微量注入した。経時的な形態変化の観察、およびタネル法によるアポトーシス細胞核数の定量的な変化を記録し統計処理を行ったところ、ラパマイシンを投与した Tg ラットでは未投与群と比較して外顆粒層の減少が 1 日 (24 時間) 遅延した。その後アポトーシスは再開し、この阻害効果は一過性であることが判明した (後述のリアルタイム PCR 参照) が、投与群の 14 日目で外顆粒層が 7~8 層も残っていて、更に非投与群と比較すると内節も残っていることがわかる (図 3)。本 RP モデルラットの

図 3.



網膜色素変性過程 (視細胞層の変性消失過

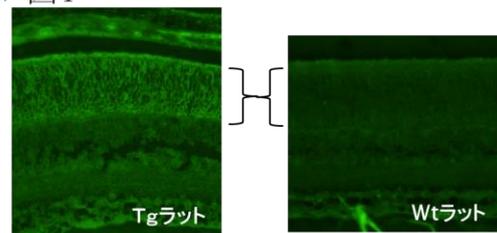
程) が極めて急激な変化であることを鑑みれば、ラパマイシンの微量注入によって外顆粒層の変性を丸 1 日遅延させた効果もまた極めて大きい。

(2) ラパマイシン投与後の視細胞内でのタンパク質発現レベルがどのようにしてアポトーシスを一過性に抑制したのかを解析するために、いくつかのタンパク質の mRNA レベルの変化をリアルタイム PCR によって詳細に解析した。まず Wt と Tg の外顆粒層における Bip と CHOP の mRNA 発現量を調べたところ、生後 7 日目では両者に差は無く、生後 13 日目の Tg ラットにおいて 3 倍以上に増加していた。これらの結果は Tg ラットの外顆粒層完成時期の 7-8 日目ではロドプシンが細胞質に蓄積しているがアポトーシスが生じておらず、外節が形成される時期からアポトーシスが生じて外顆粒層の変性消失が進行するという形態学的観察と良く一致した。次に、オートファジー関連因子である Atg5 の mRNA 発現量を調べたところ、生後 7 日以降一貫して Tg ラット外顆粒層での発現量が亢進しており、最大で Wt の 5 倍量に達していた。この時、オートファゴソーム局在分子である LC3 の分布を蛍光抗体染色によって調べたところ、ラパマイシン投与後では Wt と比較して Tg ラットの視細胞の細胞質で蛍光強度が大きく亢進していた。さらに細胞内の LC3 はロドプシンと共局在していた。このことはラパマイシン投与によってオートファジーが亢進したことを示している。

以上の結果から、Tg ラット眼球へのラパマイシン微量注入によって、オートファジーが亢進し、小胞体ストレス応答が一過性に改善してアポトーシスが遅延したと考えられる。

(3) 抗体依存性細胞介在性障害 (ADCC) 作用による杆体外節由来の変性小胞の除去および変性した杆体視細胞を除去し、錐体視細胞の細胞死を阻止するために P347L 変異ロドプシン特異的モノクローナル抗体を作製した。外注した P347L を含むペプチド抗原を BALB/c マウスに免疫し、その脾臓とミエローマ細胞を融合してハイブリドーマを作製した。スクリーニングには、Wt の網膜と Tg ラットの網膜を用いて、Tg ラット網膜のロドプシンとのみ反応する細胞株 5E10 を選別した。その結果 Tg ラットのロドプシンとのみ反応するモノクローナル抗体の作製に成功した (図 4)。

▶ 図 4



5E10 モノクローナル抗体は、図 4 に示すと

り Tg ラットの視細胞の細胞質に蓄積しているロドプシンとのみ反応し、Wt のロドプシンとは反応しない。

今後はこの抗体を用いて、P347L ラットおよびウサギへの薬剤投与後の変性杆体視細胞の除去による錐体視細胞の機能維持実験を行っていく。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Yuka Aoyama, Sayaka Sobue, Naoki Mizutani, Chisato Inoue, Yoshiyuki Kawamoto, Yuji Nishizawa, Masatoshi Ichihara, Mamoru Kyogashima, Motoshi Suzuki, Yoshinoti Nozawa, Takashi Murate. Modulation of the sphingolipid rheostat is involved in paclitaxel resistance of the human prostate cancer cell line PC3-PR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017 Apr 29;486(2):551-557. (査読有), doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.084.

② Ye F, Kaneko H, Hayashi Y, Takayama K, Hwang SJ, Nishizawa Y, Kimoto R, Nagasaka Y, Tsunekawa T, Matsuura T, Yasukawa T, Kondo T, Terasaki H. Malondialdehyde induces autophagy dysfunction and VEGF secretion in the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Free Radic Biol Med*. 2016 Feb 23;94:121-134. (査読有), doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.027. [Epub ahead of print] PMID: 26923802

③ Mineo Kondo, Gautami Das, Ryoetsu Imai, Evelyn Santana, Tomio Nakashita, Miho Imawaka, Kosuke Ueda, Hirohiko Ohtsuka, Kazuhiko Sakai, Takehiro Aihara, Kumiko Kato, Masahiko Sugimoto, Shinji Ueno, Yuji Nishizawa, Gustavo D. Aguirre, Keiko Miyadera. A Naturally Occurring Canine Model of Autosomal Recessive Congenital Stationary Night Blindness. *PloS One* 2015 Sep 10(9): e0137072. (査読有) doi:10.1371/journal.pone.0137072.

[学会発表] (計 2 件)

①井上千聖、西沢祐治「網膜色素変性症モデルラット網膜におけるラパマイシンの効果の解析」コ・メディカル形態機能学会 第16回学術集会、2017年

②西沢祐治、井上千聖「網膜色素変性症モデルラット網膜における小胞体ストレス応答の解析」コ・メディカル形態機能学会 第16回学術集会、2017年

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

西沢 祐治 (NISHIZAWA, Yuji)  
中部大学・生命健康科学部・教授  
研究者番号：80252229

##### (2) 研究分担者

竹内 環 (TAKEUCHI, Tamaki)  
中部大学・全学共通教育部・助教  
研究者番号：90392018

##### (3) 連携研究者

榊原 明 (SAKAKIBARA, Akira)  
中部大学・生命健康科学部・准教授  
研究者番号：20510217

平子 善章 (HIRAKO, Yoshiaki)  
名古屋大学・大学院理学系研究科・講師  
研究者番号：50377909

近藤 峰生 (KONDO, Mineo)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：80303642