

平成21年 4月20日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790271
 研究課題名 (和文) 網膜視細胞生存に必要な *Nnal* 遺伝子機能の解明
 研究課題名 (英文) Analysis of *Nnal* gene function : Is it necessary for Survival of the neuroepithelial layer of retina?
 研究代表者
 荒木 亜寿香 (ARAKI ASUKA)
 島根大学・医学部・助教
 研究者番号：80403442

研究成果の概要：

Ataxia and Male Sterility(AMS)マウスは自己免疫疾患モデルマウスである *MRL/lpr* に自然発症した失調症と雄性不妊を二大症状とするミュータントである。その病変責任遺伝子である *Nnal* 遺伝子機能発現が、細胞の生死にどのように係っているのかを、網膜に光傷害を意図的に加え、視細胞死のあり方を検討した。TUUNEL 法、ssDNA 免疫染色、走査電子顕微鏡の結果より、視細胞死がアポトーシスであることが明らかとなった。このことは *ams* 変異の効果は、光傷害で誘導されるアポトーシスの感受性を亢進させるように表れているのではないかと思われる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	0	0	0
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	300,000	2,400,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：①疾患モデル ②網膜

③光傷害 ④アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

Ataxia and Male Sterility(AMS)マウスは自己免疫疾患モデルマウスである *MRL/lpr* に自然発症した失調症と雄性不妊を二大症状とするミュータントであり、これらの責任病変は小脳プルキンエ細胞の生後6週齢までの完全脱落、および精細管での精子形成過程の異状に基づく高度の乏精子症である。これら

に加えて脾臓においてリンパ球亜群の割合の変化などマイナーな変化も認められ、それらの形質が常染色体劣勢遺伝形式を示すことから病変の責任遺伝子を *ams* と名づけた。これまでの実験において、古典的疾患モデルマウス・Purkinje cell degeneration(PCD)マウスの病変責任遺伝子である *Nnal* のアレルであることが、AMS と PCD のヘテロ接合体

どうしの交配によりわかった。*Nna1*は軸索損傷神経細胞の再生の際に活性化する遺伝子として見つかった。*Nna1*は25個のエクソンを含み、cDNAは3480bp、*Nna1*蛋白は1160aa(約138kDa)から構成されATP/GTP binding site motif及びzinc-carboxypeptidase domainを有している。しかし*Nna1*蛋白の生化学的機能はまだわかっていないが、ミュータントの病変から明らかなように、細胞の生死にかかわっていて、細胞の種類によりその関わり方が異なっていることが予想される。AMSマウスの*ams*変異の効果は、小脳プルキンエ細胞の急激な全細胞死と網膜・嗅球など緩徐な部分的細胞死などとして表れている。今回AMSマウスと対照マウスとしてAMSマウスの母系であるMRL/+マウスを用いて、網膜に光傷害を意図的に加え、視細胞死のあり方を検討した。さらに光傷害を受けた視細胞と*Nna1*遺伝子との関連について考えていきたい。

2. 研究の目的

*Nna1*遺伝子機能発現が、細胞の生死にどのように係っているのかを組織・細胞・分子病理学的に明らかにすることを大目的とし、AMSマウスで慢性的、部分的な脱落がみられる網膜視細胞を対象にして、①その死が古典的なアポトーシスであるか否か ②外的要因による細胞傷害が促進されるか否か ③アポトーシスをはじめ細胞死を調節する分子群を同定し、それらと*Nna1*が機能上どのように係りを持つものかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウスの維持と光傷害

マウスは12-12時間明暗サイクル、10-12luxの環境下で維持した。光傷害はAMS、MRLマウスとも6-7週齢のマウスを実験に用いた。20W蛍光灯を用いて、周囲にアルミホイルを巻いた小型ケージ内に、照度5000klxの光をケージ直上から24時間照射した。照射後は再び10-12luxの環境下に戻し、24時間光照射直後、1時間後、2時間後、6時間後、1週間後の各段階で、マウスを安楽死させた後に眼球を摘出した。

(2) 標本の作製

眼球摘出時には眼球上極にマーキングを行った。20%イソプロパノール、2%トリクロロ酢酸、2%塩化亜鉛を加えた4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて、摘出した眼球を室温にて24時間固定し、パラフィンブロックとした。HE標本作製時にはoptic nerve head (ONH)をはさんで網膜上極側と下極側を観察できるよう包埋し、厚さ4μmで連続切片を作成した。TUNNEL法及び免疫組織化学は凍結切片(厚さ8μm)を用いた。

(3) アポトーシスの観察

TUNNEL法、免疫組織化学、走査電子顕微鏡を用いた。

① TUNNEL法は凍結切片を1%パラホルムアルデヒドとエタノール酢酸(2:1)で固定し蛍光染色キット(ApopTag®Red In Situ Apoptosis Detection Kit, CHEMICON®)を使用した。対比染色にはYOYO®-1(Molecular Probes®)を用いた。

② 免疫組織化学は酵素抗体法で行い、1次抗体としたそれぞれ抗single-strand DNA(ssDNA)抗体(1:200, Dako)、抗cleaved caspase 3抗体(1:100, Cell Signaling TECHNOLOGY®)を用いた。メタノール含有3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼを阻害したのち、1次抗体を添加し4℃で24時間反応させた。1次抗体を添加する前後には内因性マウス免疫グロブリンとの反応を阻害するためにブロッキング試薬(ヒストファイン マウスウテインキット、ニチレイ)を添加した。アルカリフォスファターゼ標識2次抗体アミノ酸ポリマー(ヒストファイン シンプルステイン AP(MULTI)、ニチレイ)にて反応したのち基質発色、ヘマトキシリンにて対比染色を行った。

③ 走査電子顕微鏡用の標本作製には、マウスを4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定したのち摘出した眼球の一部に26G針で穴をあけ、1%グルタルアルデヒドを加えた2%パラホルムアルデヒド溶液に入れ、4℃24時間固定した。

(4) 形態観察と計測

まずAMSマウスとMRL/+マウスとにおける、月齢1ヵ月、2ヵ月及び3ヵ月各段階での網膜外顆粒層 outer nuclear layer (ONL)の厚さを計測した。次に光照射後直後、1時間後、2時間後、1週間後の各群でも同様に計測した。計測位置は optic nerve head (ONH)より 500 μm 上極あるいは下極側の網膜外顆粒層とし、OLYMPUS社FLOVEL Filing Systemを使用した。



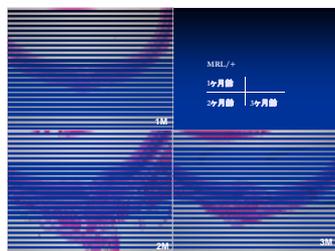
各群の分散の値は Mann-Whitney 検定を用いて比較した。各群における網膜外顆粒層の厚さの平均値の差を1元配置分散分析と多重比較により検定した。P値0.05未満のものを有意差ありとした。

蛍光染色標本はAxioVisiono 3.0, ZEISSを用いて観察、画像処理した。

4. 研究成果

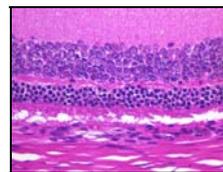
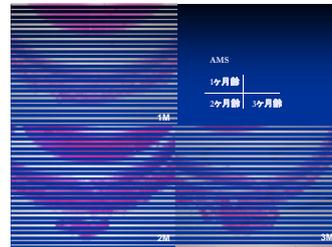
(1)各マウスのHE標本における月齢ごとの網膜外顆粒層 (ONL)の比較

①まず初めにMRL/+マウスにおける、月齢1ヵ月、2ヵ月及び3ヵ月各段階でのONLを示す。対照MRL/+マウスのONLの厚さの平均値は月齢1ヵ月(n=4)で $51.89 \pm 2.90 \mu\text{m}$ 、月齢2ヵ月(n=6) $53.07 \pm 3.60 \mu\text{m}$ 、月齢3ヵ月(n=8)では $64.00 \pm 17.34 \mu\text{m}$ であった。多重比較においてこれらの群に有意差は認められなかった。



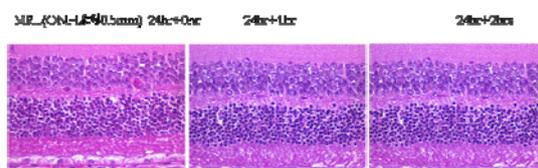
②AMSマウスでのONLの厚さの平均値は、月齢1ヵ月(n=4) $44.25 \pm 2.64 \mu\text{m}$ 、月齢2ヵ月(n=6) $40.39 \pm 2.12 \mu\text{m}$ 、月齢3ヵ月(n=8)では $29.53 \pm 7.48 \mu\text{m}$ であった。AMSマウスでは

月齢1ヵ月と月齢2ヵ月の間ではONLの厚さの平均値に差はないが、月齢3ヵ月では前2群と比較して有意に菲薄化していた。HE標本では外顆粒層の神経細胞に、アポトーシスと思われる濃縮した核を認めた。

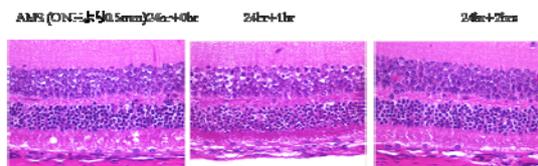


(2)24時間光照射後の各マウスでの網膜外顆粒層 (ONL)の比較

①対照マウスにおける光刺激後のONLの厚さの平均値は、光刺激直後(n=6) $49.12 \pm 2.11 \mu\text{m}$ 、1時間後(n=7) $46.22 \pm 6.00 \mu\text{m}$ 、2時間後(n=8) $48.59 \pm 3.49 \mu\text{m}$ 、1週間後(n=8) $28.67 \pm 9.50 \mu\text{m}$ であった。



②AMSマウスでは光刺激後のONLの厚さの平均値は、光刺激直後(n=10) $34.92 \pm 4.97 \mu\text{m}$ 、1時間後(n=7) $31.79 \pm 1.45 \mu\text{m}$ 、2時間後(n=12) $32.20 \pm 2.73 \mu\text{m}$ 、1週間後(n=12) $29.16 \pm 3.06 \mu\text{m}$ であった。



③光照射後各時間経過後のONLの厚さの平均値に、マウス種の違いが関係しているかどうか、多重解析したところ、光照射後2時間まではONLの厚さに有意な減少を認めなかった。

しかし光刺激後1週間経過すると対照マウスと比較してAMSマウスではONLの厚さが有意に減少していた。

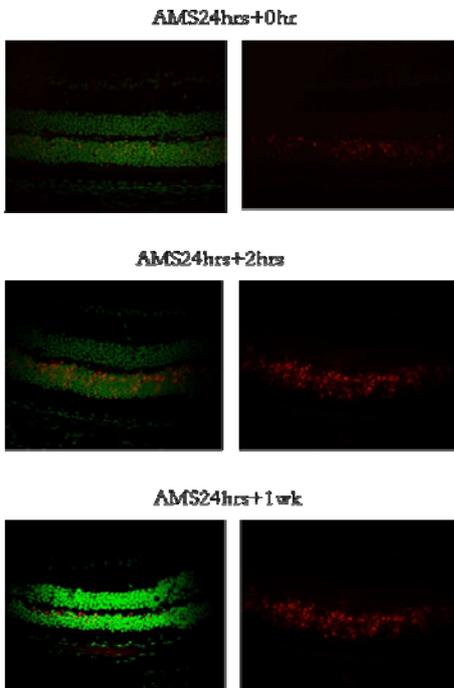
(3)24時間光照射を行わない場合と光照射を行った後での各マウスでの網膜外顆粒層(ONL)の比較

無照射マウスとして月齢2ヵ月の各マウスのONLの厚さの平均値を基準として、光照射後のONLの厚さの平均値を比較した。対照マウスでは光照射後0-2時間までは、ONLの厚さの平均値に光照射を行わない場合のONLの厚さと差はなかった。一方AMSマウスでは光照射を行わなかった月齢2ヵ月のマウスと比較して、光刺激直後からONLの厚さの平均値が有意に減少していた。

(4)TUNNEL 蛍光染色

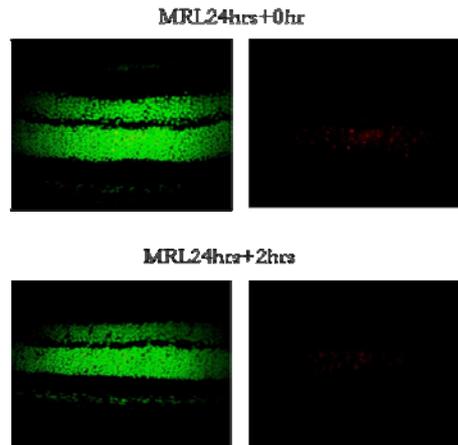
AMSマウスでは光刺激直後、1時間後、2時間後と経過するにつれてONLにTUNNEL陽性細胞が増加していた。AMSマウスでは光刺激2時間後の陽性細胞が対照マウスに比べて多く認められる。

TUNNEL 蛍光染色(ONHより0.5mm)
Green: Nucleus Red: TUNNEL positive

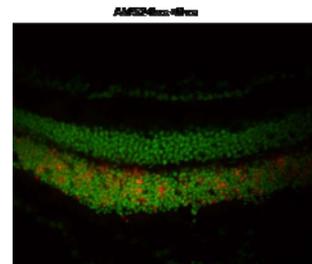


一方対照マウスでは光照射直後でTUNNEL陽性細胞をONLに確認したが、AMSマウスと比

較すると少数であった。さらに照射2時間後には陽性細胞がほとんど認められなかった。

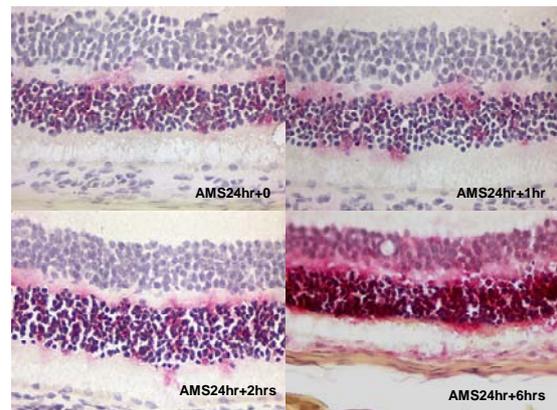


光照射後6時間におけるAMSマウス網膜ONLではさらに強弱様々なTUNEL陽性像がみられた。24時間では強弱様々で多数のTUNEL陽性像がみられた。

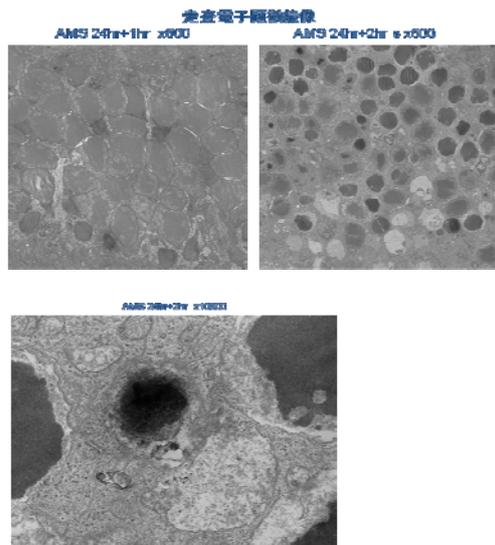


(5)抗 single-strand DNA(ssDNA)免疫染色

AMSマウスではONLにおいて、光照射後0時間から次第にssDNA陽性の細胞が増加して認められた。光照射6時間後ではONLの細胞のほとんど全体が染色されて見えた。



(6)走査電子顕微鏡では光照射後1時間よりも光照射後2時間の標本で多数の典型的なアポトーシス像が確認された。



(7)凍結切片を用いた cleaved caspase-3 の免疫組織化学的陽性像は現段階ではまだ得られなく、現在検討中である。

(8) 考察

AMS マウス網膜外顆粒層は月齢 3 ヶ月ごろまでにそれ以前よりも菲薄化することがわかった。網膜外顆粒層の菲薄化は視細胞死が生じていると考え、ams 変異の効果によるものと推測する。月齢 3 ヶ月以前の 6-7 週齢のマウスを用いて光傷害を加えたところ、光照射後 1 週間で有意に網膜外顆粒層の厚さが減少していた。TUNNEL 法と ssDNA 免疫染色では視細胞死の増加が光照射後早期より生じていることがわかる。また対照マウスと比べても視細胞死の数が多いことが覗える。走査電子顕微鏡の結果より、視細胞死がアポトーシスであることが明らかとなった。このことは *ams* 変異の効果は、光傷害で誘導されるアポトーシスの感受性を亢進させるように表れているのではないと思われる。

現在、視細胞死の増加を定量的に判定すべく試みている。しかし定量化には次に挙げる 3 種類の異なる陽性像をどのように数値化するかが課題と考える。TUNNEL 法、ssDNA 免疫染色ともに、陽性細胞像には 3 種類あるように思われる。第 1 に視細胞の核と重なって陽性となる像、第 2 に視細胞の核が核染色で染色されないが、核の存在する場所に一致して陽性となる像、第 3 に核周囲に広がるように

陽性となる像、の 3 種類である。当初は背景の共染色像かと考えて何度も再度染色して見たが、同様の結果であった。またブロッキング試薬を用いても染色態度に変化はなかった。このことがアポトーシス関連分子の活性化を示しているのか、*ams* 変異の影響なのかは、興味の持たれるところであり、今後の課題としたい。

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 2 件)

1. Li Zhou, Asuka Araki, Akinobu Nakano, Cem Sezeru and Takayuki Harada: Different types of neural cell death in the cerebellum of the ataxia and male sterility(AMS) mutant mouse. *Pathology International*. 56:173-180, 2006.
2. 周 麗, 張 傑, 荒木亜寿香, 中野晃伸, 原田孝之, 小野栄夫, 能勢真人: Ataxia and Male Sterility(AMS) ミュータントマウスの疾患責任遺伝子 *ams* の変異と異なる種類の細胞死 (優秀選抜論文). 日本疾患モデル学会記録. 22:19-25, 2006.

[学会発表] (計 11 件)

1. 荒木亜寿香: 第 4 回日本臨床細胞学会秋季大会. 2008 年 11 月, 東京.
2. 荒木亜寿香, 原田孝之, 中野晃伸, 荒木博子: Ataxia and Male Sterility ミュータントマウス責任遺伝子 *ams* の解析. : 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会. 2008 年 8 月, 東京.
3. 荒木亜寿香, 中野晃伸, 岸 浩史, 丸山理留敬, 荒木博子, 原田孝之: 病理組織学的に IgG4 関連病変が疑われた腎盂尿管周囲の炎症性偽腫瘍の 1 例. 第 97 回日本病理学会総会. 2008 年 5 月. 石川
4. T. HARADA, H. ARAKI, A. NAKANO, A. ARAKI, and A. NAGAI: Analysis of the level of importance of the *ams* mutation of the *aNunal* gene in different cell populations of the Ataxia and Male

- Sterility mouse. *Neuroscience*2007, 2007.11, San Diego.
5. 荒木 剛, 足立絵里加, 中村真由子, 吉田さおり, 藤原明美, 山本智彦, 荒木亜寿香, 中野晃伸, 原田祐治, 丸山理留敬: 胸壁に発生した Clear cell sarcoma の一例. 第46回日本臨床細胞学会秋期大会. 2007年11月, 仙台.
 6. 原田孝之, 中野晃伸, 荒木亜寿香: 神経・雄性生殖器系ミュータント *ams* マウス: 15. *ams* 変異と apoptosis 関連遺伝子の相互作用. 第96回日本病理学会総会, 2007年3月, 大阪.
 7. Takayuki Harada, Asuka Araki, Akinobu Nakano, Jie Zhang, Atushi Nagai and Masao Ono: The *ams* mutant in the Ataxia and Male Sterility mouse is a point mutation that affects expression of the protein but not transcription of the mRNA. *Neuroscience* 2006, 36th annual meeting of the Society for Neuroscience. Oct, 2006, Atlanta.
 8. Asuka Araki, Akinobu Nakano, Li Zhou, Riruke Maruyama, Akihiro Ohira and Takayuki Harada: Effect of the *ams* mutation in the Ataxia and Male Sterility (AMS) mouse on photic injury to photoreceptor cells. The Seventh Joint Meeting of the Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry and the US Histochemical Society. Aug. 2006, Waikoloa, Hawaii.
 9. 原田孝之, 荒木亜寿香, 周 麗, 張 傑, 中野晃伸, 小野栄夫, 能勢真人: Ataxia and Male Sterility (AMS) ミュータントマウス: 単一遺伝子 (*Nna1*) の機能欠損による多様な組織病理学的・細胞病理学的変化. 第3回日本病理学会カンファレンス. 2006年8月, 東京.
 10. 荒木亜寿香, 周 麗, 中野晃伸, 大平明弘, 原田孝之: 神経・雄性生殖器系ミュータント *ams* マウス: 14 網膜視細胞のアポトーシス感受性の亢進. 第95回日本病理学会総会. 2006年4月, 東京.
 11. 原田孝之, 張 傑, 荒木亜寿香, 中野晃伸, 周 麗, 小野栄夫, 能勢真人: 神

経・雄性生殖器系ミュータント AMS マウス: 13 病変責任遺伝子の *ams* 変異の同定. 第95回日本病理学会総会. 2006年4月, 東京.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 亜寿香 (ARAKI ASUKA)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 80403442

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: