

研究種目: 若手研究(B)

研究期間: 2007~ 2008

課題番号: 19791260

研究課題名(和文)  $\beta$  B2-クリスタリンによる網膜神経節細胞死制御機構の解明研究課題名(英文)  $\beta$  B2-crystallin regulated the retinal ganglion cell death after ischemia-reperfusion injury

研究代表者

新井 郷子(ARAI SATOKO)

信州大学・医学部・助教

研究者番号: 30377626

研究成果の概要: 神経細胞死(アポトーシス)のモデルである網膜虚血-再灌流障害において発現する $\beta$  B2-クリスタリンの局在と機能について検討した。 $\beta$  B2-クリスタリン蛋白および遺伝子は12時間後にピークをもって発現していることを確認した。そのタイミングでアポトーシスを起こすことが知られている網膜神経節細胞と内顆粒層の神経細胞に発現が見られたことから、 $\beta$  B2-クリスタリンがアポトーシスと深く関与していることが推測された。RNA干渉を行って $\beta$  B2-クリスタリンの発現を抑制したところ、アポトーシスを起こす細胞の減少が認められた。このことから、 $\beta$  B2-クリスタリンはアポトーシス誘導に深く関与していると考えられた。

交付額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野: 医化学

科研費の分科・細目: 外科系臨床医学・眼科学

キーワード: 網膜虚血-再灌流障害、アポトーシス、 $\beta$  B2-クリスタリン

## 1. 研究開始当初の背景

当教室では網膜神経細胞死(アポトーシス)のモデルであるラット網膜虚血-再灌流障害を用いてDNAマイクロアレイ解析を行い、細胞死に関わる遺伝子群、生体防御に関わる遺伝子群に属する様々な遺伝子に変化がみられることを報告した。その中で、水晶体の構造蛋白として知られるクリスタリンファミリーの発現が認められたことに着目した。

$\beta$ クリスタリンは $\alpha$ 、 $\gamma$ クリスタリンと共に哺乳類の水晶体の主な構成蛋白質であり、その中でも主要成分とされている $\beta$  B2クリスタリンの役割は、水晶体の透明性を維持するものと考えられている。

その一方で、1998年にPiatigorskyが“Gene sharing”という概念を提唱した。それは、水晶体以外の組織に、様々な種類のクリスタリンが発現し、代謝酵素などの役割として働いているという概念である。

$\beta$  B2-クリスタリンが網膜、大脳、精巣といった水晶体以外の組織に発現することが報告されているが、その機能に関しては未だ明らかとされていないのが現状である。

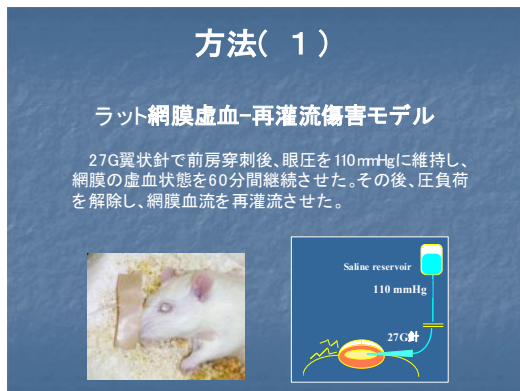
## 2. 研究の目的

網膜神経細胞死（アポトーシス）のモデルであるラット網膜虚血-再灌流障害を用いて、クリスタリンファミリーに属する $\beta$  B2-クリスタリンの網膜での発現および局在を明らかとする。また、 $\beta$  B2-クリスタリン蛋白の発現を抑制することで、アポトーシスとの関与を検討し、網膜における $\beta$  B2-クリスタリンの機能を解明する。

## 3. 研究の方法

### (方法 1)

SD ラット (200-300 g) に対してペントバルビタール腹腔内投与後、前房に 27G 針を刺入して 110mmHg まで眼圧を上昇させる圧負荷法により、60 分間網膜虚血後再灌流を行うラット網膜虚血再灌流障害モデルを作成する。

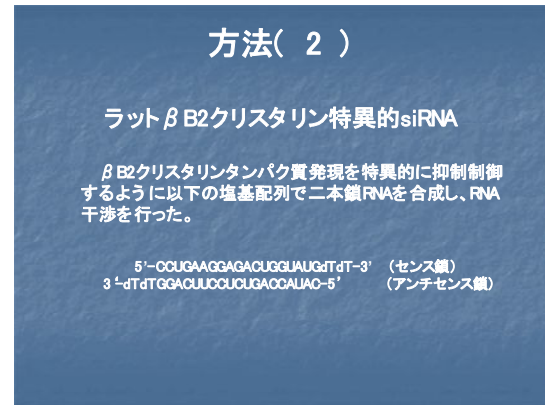


虚血後 6, 12, 24 時間後に眼球を摘出し、パラホルムアルデヒド固定後、凍結切片を作成し、この切片に対して蛍光免疫組織染色を行い、組織学的な変化を検討する。また、摘出眼球より網膜のみ分離してウエスタンブロッティング法により蛋白発現量、リアルタイム PCR 法により遺伝子発現量の経時変化を解析する。蛋白発現量は $\beta$  アクチンとの比較、遺伝子発現量は GAPDH との比較をすることで発現量の変化を明らかにする。

### (方法 2)

次に、網膜虚血前にラット $\beta$  B2-クリスタリン特異的 siRNA を硝子体注入することで RNA 干渉を行い、 $\beta$  B2-クリスタリンの発現を抑制した状態で、方法 1 と同様にラット網膜虚血再灌流障害モデルを作成する。

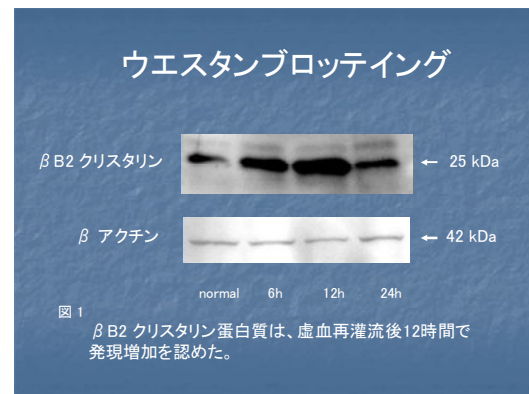
比較対象としては Silencer® Negative Control siRNA を硝子体注入する。



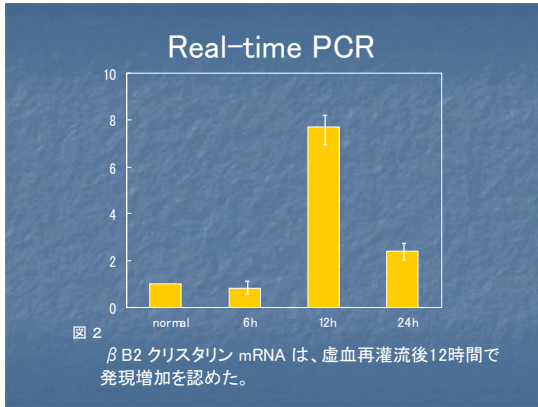
再灌流後 12 時間および 24 時間で眼球を摘出し、パラホルムアルデヒド固定後、凍結切片を作成する。アポトーシス細胞を検出するために TUNEL 染色を行い、ラット $\beta$  B2-クリスタリン特異的 siRNA 硝子体投与群 (siRNA 群) と Silencer® Negative Control siRNA 硝子体投与群 (コントロール群) とで TUNEL 陽性細胞数を計測し、比較検討する。

## 4. 研究成果

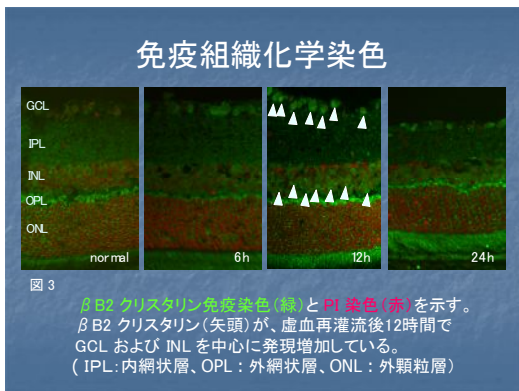
ウエスタンブロッティングの結果、 $\beta$  B2-クリスタリン蛋白の発現は再灌流後 12 時間でピークを示した (図 1)。



また、リアルタイム PCR の結果でも $\beta$  B2-クリスタリン遺伝子発現量が再灌流後 12 時間でピークを示した (図 2)。

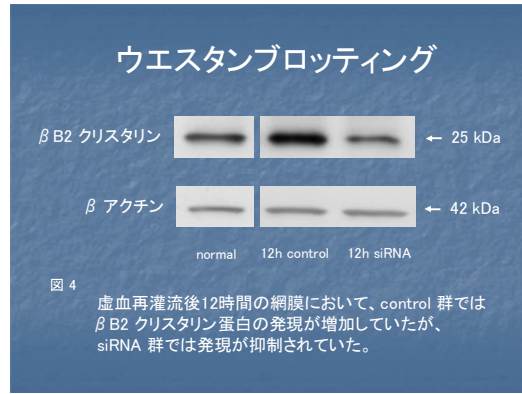


さらに、免疫組織学的には、再灌流後6~24時間で網膜神経節細胞層および内顆粒層の細胞を中心に $\beta$ B2-クリスタリンの発現増加を認めた(図3)。



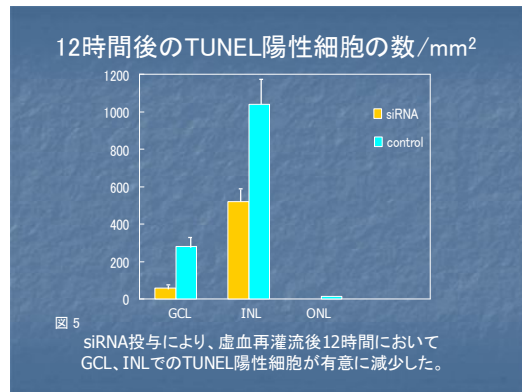
この結果と網膜神経節細胞のアポトーシスが再灌流後6~24時間にかけて起こることに何らかの関係があると考え、ラット $\beta$ B2-クリスタリン特異的siRNA硝子体投与によるRNA干渉を行い、 $\beta$ B2-クリスタリンの発現を抑制して組織学的な変化を検討した。

ウェスタンブロッティングで、 $\beta$ B2-クリスタリン蛋白の発現ピークである再灌流後12時間において、コントロール群が発現増加しているのに対してsiRNA群では発現が抑制されていることを確認した(図4)。

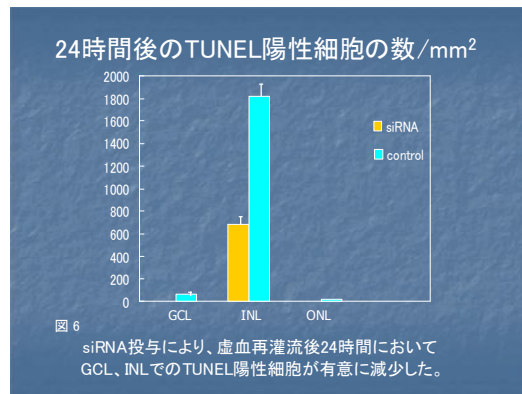


虚血再灌流後12時間および24時間において、網膜神経節細胞層(GCL)、内顆粒層(INL)、外顆粒層(ONL)それぞれの1mm<sup>2</sup>あたりのTUNEL陽性細胞数を計測し、siRNA群とコントロール群とで比較検討した。

再灌流後12時間におけるGCL, INL, ONLそれぞれのTUNEL陽性細胞数は、siRNA群で56±22, 522±69, 0±0であったのに対して、コントロール群では279±57, 1037±155, 12±7であった(図5)。



同様に再灌流後24時間におけるTUNEL陽性細胞数は、siRNA群が0±0, 683±54, 0±0であったのに対して、コントロール群が64±17, 1820±112, 19±13であった。siRNA群のTUNEL陽性細胞数はGCL, INLにおいてコントロール群に比べて有意に減少(p<0.01)していた(図6)。



以上の結果より、ラット網膜虚血-再灌流障害モデルにおいて発現した $\beta$ B2-クリスタリンは網膜神経細胞のアポトーシスを制御しているものと考えられた。

$\beta$ B2-クリスタリンについての報告は、国内海外ともに限られており、未だ $\beta$ B2クリスタリンの網膜における機能については定説がない。今回の研究成果を確証するためには、培養細胞などを用いて同様な結果を確認するなど、さらなるデータ蓄積の必要がある。

#### 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)

[学会発表] (計3件)

- ① 京本敏行、千田奈美、今井弘毅、柳平朋子、新井郷子、片井直達。虚血障害後の網膜に発現する $\beta$ B2クリスタリンの機能解析、第112回日本眼科学会総会、2008.4.18、横浜
- ② T. Kyomoto, H. Imai, N. Senda, T. Yanagidaira, S. Arai-Gaun, N. Katai.  $\beta$  B2-crystallin regulated the ganglion cell death after ischemia-reperfusion injury. ARVO, 2007. 5. 4、フロリダ (米国)
- ③ 京本敏行、今井弘毅、千田奈美、柳平朋子、新井郷子、片井直達。虚血障害後の網膜神経節細胞に発現する $\beta$ B2クリスタリンの機能解析、第111回日本眼科学会総会、2007.4.20、大阪

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

新井 郷子 (ARAI SATOKO)  
信州大学・医学部・助教  
研究者番号：30377626