

機関番号：15201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20791252

研究課題名（和文） レーザーマイクロダイセクションを用いた

網膜内発現タンパク質の局在及び定量解析

研究課題名（英文） Localization and quantitative analysis of retinal protein  
by lasermicrodissection

研究代表者

海津 幸子 (Kaidzu Sachiko)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：00325052

研究成果の概要（和文）：レーザーマイクロダイセクションを用いて網膜を色素上皮層，視細胞外節～外網状層，内顆粒層～内網状層，ガングリオン細胞層～神経線維層に分けて抗酸化酵素類の発現量変化を調べた。ラットに光を照射して網膜に障害を起こしたところ、網膜内で抗酸化酵素類が増加し、その局在と量的変化は免疫組織化学的に観察された変化とほぼ同様であった。レーザーマイクロダイセクションを使用することにより、網膜内でのタンパク質の局在や発現量の変化を層、あるいは細胞単位でとらえる事が可能となった。

研究成果の概要（英文）：To study the change of antioxidants in retinal layers, we used lasermicrodissection. Light damaged rat retina were divided into 4 segments; retinal pigment epithelium, rod outer segments ~ outer plexiform layer, inner nuclear layer ~ inner plexiform layer, ganglion cell layer ~ nerve fiber layer. Antioxidants were increased in each layer, particularly in rod outer segments ~ outer plexiform layer, and the change of localization and expression were almost similar to the results by immunohistochemical method. Lasermicrodissection is useful to study the localization and quantitative change of protein at cellular levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：組織学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼組織学・網膜光傷害

## 1. 研究開始当初の背景

光は網膜を含む眼組織に酸化ストレス等の障害を与える要因である。様々な疫学調査から光が加齢黄斑変性や網膜色素変性等の疾患の増悪因子であることが明

らかにされて来ている。網膜は「物を見る」という機能を持つ以上、光暴露から逃れる事はできない。このため、網膜には様々な生体防御因子が存在し、光によるストレスから網膜を保護している。我々はこれまでラットやマウスを用いた

実験で、一定の強さの光を照射して網膜に障害（網膜光障害）を起こすと、網膜に含まれる Glutathione peroxidase (GPX) や Manganese superoxide dismutase (MnSOD), Copper-Zinc superoxide dismutase (CuZn-SOD) 等の抗酸化酵素やThioredoxin (TRX)と言ったレドックス関連タンパク質を始めとする種々のタンパク質発現が変化することを報告してきた。

しかし、我々の報告を含むこれまでの網膜に関する研究は、生体内におけるタンパク質の発現変化を網膜全体として捉えたものにしか過ぎない。ストレス等の外部刺激に対するタンパク質発現の変化は本来細胞単位で生じるイベントであり、それが集合する事で最終的に網膜組織全体の反応として観察される。従って、細胞単位、また細胞の集まった層の単位でタンパク質の発現を調べなければ生体反応を正確に捉えたとは言いがたい。これまでにタンパク質・遺伝子の発現量を定量する手技の一つとして主にWestern blot や RT-PCR 等がしばしば用いられてきたが、これらの手技では網膜層全体をサンプルとして用いる為にどの層、或いはどの細胞で発現が変化しているかを捉えることができないという欠点があった。また一方で、タンパク質の発現部位を特定するために免疫染色が行われるが、この手技では局在を特定することは出来てもその発現量を定量することはできないという欠点がある。染色強度で発現量の増減を見る事はできてあくまで半定量的なものであり、必ずしも正確な発現量を反映したものではない。これまで、網膜研究で層単位、或いは細胞単位でタンパク質の局在と同時に発現を定量化することは極めて困難であった。

そこで我々はこれらの問題を解決するためにレーザーマイクロダイセクションという手技を用いる事を考えた。この手法では、組織を免疫染色することで特定タンパク質の網膜内発現部位（局在）を特定すると同時に、発現が特定された細胞或いは層を切り出してWestern blot や

RT-PCR 等の定量化に用いることができる。即ち、タンパク質あるいはそれらを規定するRNAが発現している部位のみを切り出し、その部位での正確なタンパク質・RNA発現量を定量化することができる事になる。

## 2. 研究の目的

### (1) 網膜を細胞単位・層単位で捉える

網膜は網膜色素上皮細胞を含む全10層から成る。各層はある特定の細胞により構成されているため、レーザーマイクロダイセクションにより特定の細胞画分を回収することが可能である。その画分中でのタンパク質の発現を定量化する事でこれまで網膜全体で捉えられていた変化を細胞の種類毎に詳細に捉えることが可能となる。

### (2) 網膜内でのタンパク質の発現部位を特定し、なおかつ定量化する

これまでの手法では不可能であったタンパク質の発現部位（局在）の特定とその定量化を同時に行う。即ち標的とするタンパク質が網膜内のどの部位で、どの程度発現しているかを数値化する。

## 3. 研究の方法

### (1) レーザーマイクロダイセクションを用いた網膜内タンパク質発現の局在及び定量解析手技の確立

正常ラット (Sprague-Dawley 系, ♂, 6-8 週齢) を安楽死させた後、眼球を摘出した。摘出した眼球はコンパウンド中で凍結し、レーザーマイクロダイセクション用に厚さ約 50  $\mu\text{m}$  の連続した凍結切片を 10~15 枚程度作製した。比較のための免疫組織用凍結切片の厚さは 20  $\mu\text{m}$  とした。網膜をレーザーマイクロダイセクション用染色液で染色し、各層を

認識できるようにした後、色素上皮層、視細胞外節～外網状層、内顆粒層～内網状層、ガングリオン細胞層～神経線維層に分け、各々陽性反応が見られた部位をレーザーマイクロダイセクション法により切り出した。回収した画分よりRNAを抽出し、RT-PCRを行って抗酸化酵素であるManganase Superoxide Disumutase, Copper-Zinc Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidaseの発現を確認した。また、免疫染色を行って各酵素の網膜内での局在を確認し、レーザーマイクロダイセクションで切り出した各層における発現量を比較した。

#### (2) ラット網膜光障害モデルを用いた網膜内タンパク質の発現変化

正常ラット (Sprague-Dawley 系, ♂, 6 - 8 週齢) に白色光を照射 (3,000 lux, 24時間) して網膜光障害モデルを作製した。照射中のラットは餌と水を自由に採取できるようにした。照射終了直後と照射後1日目、7日目にラットから眼球を摘出して凍結切片を作製した。

その後のレーザーマイクロダイセクションによる切り出し・RT-PCR、免疫染色の手法は(1)と同様に行った。

#### 4. 研究成果

網膜層を色素上皮細胞層、視細胞外節～外網状層、内顆粒層～内網状層、ガングリオン細胞層～神経線維層に分け、レーザーマイクロダイセクション法により切り出した。当初は、回収した各画分を用いてウェスタンブロッティングを試みたが、回収できるタンパク量が少なかったためにデータを得る事ができなかった。このため、タンパク質量そのものではなく、RT-PCRによる遺伝子の発現量変化を調べる事とした。また、色素上皮細胞層は、他の層よりも薄く、面積が小さいため、

十分な量を回収することができず、今回の分析からは除外した。

光を照射していない正常網膜では視細胞外節～外網状層、内顆粒層～内網状層、ガングリオン細胞層～神経線維層の全てでManganase Superoxide Disumutase, Copper-Zinc Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidaseが発現しており、その量に差は見られなかった。切片の免疫染色の結果も同様であった。

光を照射したラット網膜では上記抗酸化酵素が全て増加しており、Manganase Superoxide Disumutase と Copper-Zinc Superoxide Dismutase では、発現量は視細胞外節～外網状層>内顆粒層～内網状層>ガングリオン細胞層～神経線維層の順におおかつた。Glutathione Peroxidaseでは、視細胞外節～外網状層とガングリオン細胞層～神経線維層がほぼ同程度で、内顆粒層～内網状層はやや発現が少なかった。発現量の増加は光照射後1日目で最も顕著であった。また、これらの発現量の変化は免疫染色の結果とほぼ一致していた。

免疫組織学的結果とRT-PCRの結果はほぼ一致していたことから、網膜内でのタンパク質の局在や発現量の変化を層、あるいは細胞単位の詳細レベルでとらえるために、レーザーマイクロダイセクションが非常に有効なツールであることが明かとなった。一方で、必要なRNA量を回収するためにはかなりの労力が必要であり、色素上皮細胞については分析に必要な量を回収することができなかった。また、RNAによる発現変化と合成されるタンパク質量は必ずしもイコールではないため、実際に網膜内に存在するタンパク質量の定量も行う事が望ましい。そのため、今後はウェスタンブロッティングを行う事もできるようなより効率的な組織の回収方法を検討する必要がある。

#### 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)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Sachiko Kaidzu: Action Spectrum of Retinal Light Damage in Albino Rats. ARVO. May 3 - 7, 2009. USA (Fort Lauderdale, FL).
- ② 海津幸子: 可視光によるラット網膜障害の波長依存性, 第 113 回日本眼科学会総会, 2009 年 4 月 16 日-19 日, 東京 (東京)
- ③ 海津幸子: ラット網膜光傷害の波長特性, 第 10 回島根県眼科冬期学術講演会・第 27 回島根大学眼科同窓会学会, 2009 年 2 月 15 日, 出雲 (島根)

[図書] (計 0 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 0 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

海津 幸子 (Kaidzu Sachiko)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 00325052

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: