

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791259  
 研究課題名（和文） hPEDF（ヒト色素上皮由来因子）による視細胞保護効果の分子メカニズム解析  
 研究課題名（英文） Analysis of the molecular mechanism for human pigment epithelium-derived factor (hPEDF) mediated photoreceptor cell neuroprotection  
 研究代表者 池田 康博（IKEDA YASUHIRO）  
 九州大学 大学病院 助教  
 研究者番号 20380389

研究成果の概要（和文）：血清除去刺激により、アポトーシス誘導因子（AIF）がミトコンドリアから核内へ移行することが明らかとなった。また、ヒト色素上皮由来因子（hPEDF）はミトコンドリア膜の安定化させることで、AIF のミトコンドリアからの放出を抑制しており、この作用によりアポトーシスが抑制されていることが明らかとなった。さらに、網膜変性モデル動物である RCS ラットでも同様に、アポトーシスを生じた視細胞において AIF の核内移行が生じており、hPEDF の遺伝子導入により、視細胞における AIF の核内移行が抑制され、最終的にアポトーシスが抑制されていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The key observations made in this study are as follows: 1) PEDF efficiently rescued apoptosis induced by serum starvation in R28 cells derived from rat retina; 2) AIF but not caspases was a key effector of the serum starvation-induced apoptosis, and PEDF prevented AIF from translocating into the nucleus after serum starvation; 3) Nuclear translocation of AIF was also observed in apoptotic photoreceptors of RCS rats, and was significantly inhibited by retinal gene transfer of PEDF *in vivo*, resulting in a substantial delay in retinal degeneration; and 4) PEDF prevented the AIF release through upregulation of Bcl-2.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：眼科学、網膜色素変性、神経保護、遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は先天性遺伝性の疾患で、夜盲よりはじまり、徐々に視機能が低下して最終的には失明に至る。これまでに多くの治療的試みがなされているものの、有効性を示し得たものは存在せず、眼科領域において未だ有効な治療法が確立されていない難治性疾患のひとつである。近年注目されているアプローチが、網膜色素変性の最終的な病態である視細胞死(アポトーシス)をコントロールする方法、すなわち「視細胞保護」療法である。

我々は、サル由来レンチウイルス(SIV)ベクターを用いた網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療の臨床応用を目指した研究を進めてきた。これまでに、神経栄養因子のひとつであるヒト色素上皮由来因子(human pigment epithelium-derived factor: hPEDF)を搭載したSIVベクター(SIV-hPEDF)を用いて、網膜変性モデル動物(RCSラットやrdsマウス)に対する遺伝子治療の効果を明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでに得られた知見をさらに発展し、国産遺伝子治療用ベクターによる網膜色素変性に対する視細胞保護療法における、神経栄養因子(hPEDF)による視細胞死(アポトーシス)に対する保護効果の分子機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 組換えhPEDFタンパクを用いたin vitro系を用いた保護効果とメカニズムの検証・・・網膜構成細胞由来の培養細胞(R28細胞)を用いて、血清除去刺激やグルタミン酸毒性などによる細胞死(アポトーシス)に対するhPEDFの抑制効果を検討し、細胞内シグナルや転写因子についての候補を絞り込む。

各種刺激に対し、hPEDFタンパクを0-100 nMの各濃度加え、hPEDFの中和抗体の有無によるcell viabilityの変化をMTT assayを用いて定量する。

血清除去刺激に対し、の実験で得られた至適濃度のhPEDFを加え、TUNEL染色を用いてアポトーシスに陥った細胞を同定し、定量する。また、それぞれのアポトーシスがcaspase依存性経路を介するものか否かを、caspaseのinhibitorであるZ-VAD-fmk等を用いて検証する。

血清除去に対する保護効果が確認できた条件でR28細胞を培養し、血清除去刺激によるアポトーシス誘導因子(apoptosis inducible

factor: AIF)の局在変化をAIFに対する免疫染色で確認する。また、AIFとTUNEL染色を同時に行い、AIFとアポトーシスの関連を検討する。

RNA干渉を用いてAIFの発現を抑制することで、血清除去刺激における細胞死への影響を検討する。

組換えhPEDFタンパクにより、アポトーシス抑制に関連する因子(bcl-2など)の遺伝子発現の変化をReal-time PCR法を用いて検討する。

(2) SIV-hPEDF 遺伝子導入によるin vivo系を用いた保護効果の検証・・・既に保護効果が確認できているRCSラットを用いる。RCSラットは生後3週の時点より外顆粒層が視細胞のアポトーシスにより減少し、生後7週にはほぼ消失してしまう。本研究では、SIV-hPEDFを3週令RCSラットの網膜下に注入し、2週間後に眼球を摘出して、以下の研究を行う。

摘出した眼球をパラホルム固定し、切片をTUNEL染色する。In vitroの系にて候補となったシグナル分子(AIF)を免疫組織化学的に染色し、TUNEL陽性(陰性)細胞との関連を検討する。

網膜組織より抽出したmRNAを用いて、アポトーシス抑制に関連する因子(bcl-2など)の遺伝子発現の変化をReal-time PCR法にて検討する。

## 4. 研究成果

### (1)

R28細胞に対する血清除去刺激において、hPEDFタンパクは100 ng/mlから容量依存的に有意な神経保護効果を示し、hPEDFに対する中和抗体を同時に添加することで、その保護効果が抑制された(図1)。

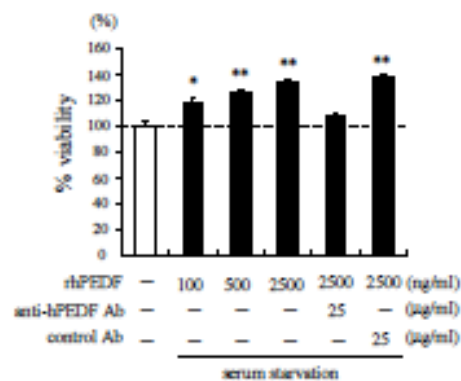


図1

hPEDF タンパクにより、血清除去刺激により生じる TUNEL 陽性細胞数が有意に減少することから、アポトーシスが抑制されていることが示された。また、caspase の阻害剤である Z-VAD-fmk における神経保護効果が確認されなかったことなどから、血清除去刺激によるアポトーシスには、caspase 非依存的な経路が関与していることが示された。

血清除去刺激により生じるアポトーシスを生じた細胞の核内に AIF が局在していることが免疫染色にて確認された。また、この AIF の核内への局在が hPEDF を添加した細胞では、減少していた (図 2)。これらの結果より、血清除去刺激により生じるアポトーシスに AIF の核内移行が関与しており、これを hPEDF が抑制している可能性が示唆された。

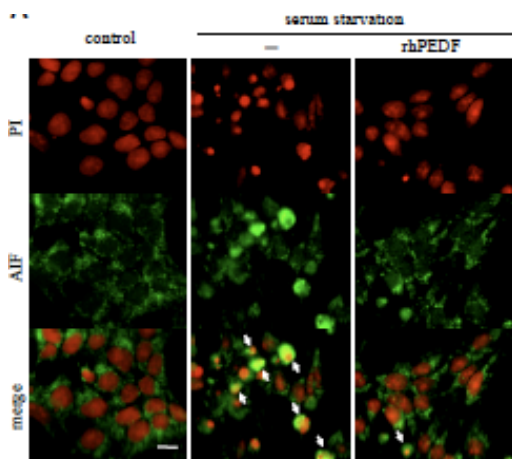


図 2

AIF に対する siRNA により、R28 細胞の AIF 発現量を減少させることで、血清除去刺激により生じるアポトーシスが有意に抑制された。

hPEDF タンパクにより、R28 細胞の bcl-2 発現が有意に増加することが示された (図 3)。hPEDF により誘導された bcl-2 がミトコンドリア膜の安定化させることで、AIF のミトコンドリアからの放出を抑制している可能性が示唆された。

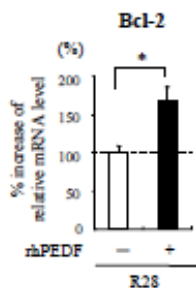


図 3

(2)

5 週齢の RCS ラット網膜において、未処置ならびに遺伝子を搭載していないベクター投与群では、外果粒層に AIF (赤色) ならびに TUNEL 染色 (緑色) が陽性となる細胞が認められ、これらで染色される細胞は同一であったが、hPEDF を搭載したベクター投与群では、これらに陽性となる細胞が減少していた (図 4)。hPEDF の遺伝子導入により、視細胞における AIF の核内移行が抑制されることで、アポトーシスが抑制されていることが示唆された。

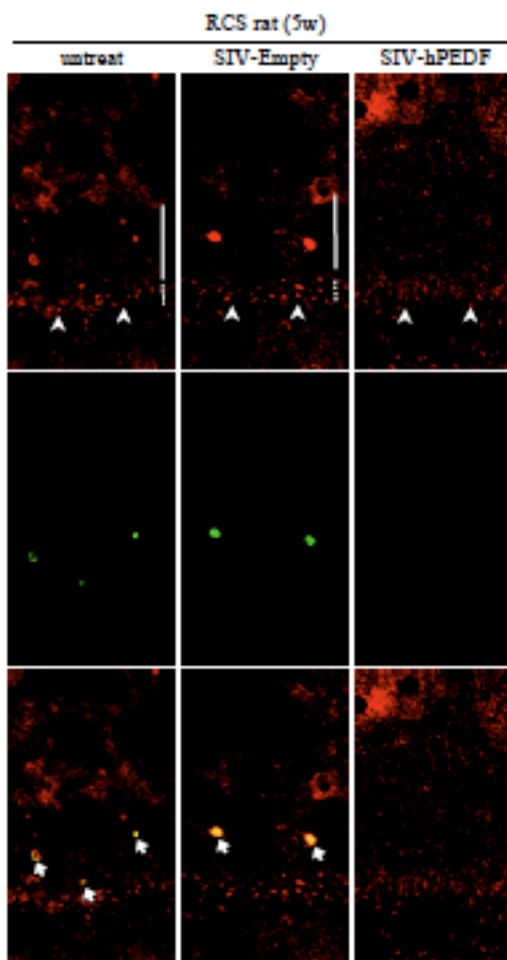


図 4

in vitro での結果と同様に、hPEDF が遺伝子導入された網膜において、bcl-2 の遺伝子発現が有意に増加していた。

## 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 1 件)

Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Miyazaki M, Inoue M, Hasegawa M,

Sueishi K, Ishibashi T. Inhibition of choroidal neovascularization via brief subretinal exposure to a newly developed lentiviral vector pseudotyped with Sendai virus envelope proteins. *Hum Gene Ther.* **21**: 199-209, 2010.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0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

池田 康博 (IKEDA YASUHIRO)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：20380389

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：