

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月1日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591954

研究課題名（和文） MNU誘発網膜色素変性症動物モデルにおけるオートファジーの関与とその分子制御

研究課題名（英文） Involvement of autophagy in MNU-induced retinal degeneration model and its molecular control

研究代表者

義澤 克彦（YOSHIZAWA KATSUHIKO）

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：70548396

研究成果の概要（和文）：

オートファジー（AP）は真核細胞に普遍的に備わる細胞内蛋白分解経路であり、神経変性疾患や、加齢性黄斑変性症や緑内障などの眼科疾患での関与が注目されている。我々はMNU誘発マウス網膜変性症モデル並びに遺伝性網膜変性症マウスにおいて、その発症に網膜でのAP抑制の関与を明らかにした。さらに、カルパイン阻害剤によるMNU誘発視細胞死の抑制には基底レベルのAP保持が関係することを見出した。以上の結果から、網膜でのAP発現調整による網膜色素変性症の病態抑制が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Autophagy (AP) is intracellular protein degradation pathway that eukaryote universally possesses, and AP contributes to neuronal degenerative diseases and eye diseases such as age-related macular degeneration and glaucoma. In our research, MNU-induced and genetic retinal degeneration mouse models were related to the inhibition of AP in retina. Calpain inhibitor successfully ameliorated photoreceptor cell death in MNU-induced mouse model, which restored basal level of AP in retina.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：アポトーシス、オートファジー、カルパイン阻害剤、眼病理学、視細胞、実験動物学、毒性、網膜色素変性症、

1. 研究開始当初の背景

ヒト網膜変性症（RP）は視細胞の進行性の変性・消失を特徴とし、失明を来す遺伝性疾患で未だ治療法のない難病であり、日本では中途失明の3大原因の一つに数えられており、その病態の理解と治療法の開発には動物モデ

ルの存在が必須である。我々は、*N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU)によるヒトRPの動物モデルを確立し、その病態制御を試みてきた。MNUはげっ歯類を始め様々な動物種にヒトRPと同様に視細胞アポトーシスに起因した網膜変性症を誘発することができる。その

発症機序はBcl-2の発現抑制、Baxの発現亢進、カスパーゼファミリーの活性化に加えて、PARPの活性化、JNK、c-Jun並びにc-Fosの活性化、NF- κ Bの発現低下、カルパイン活性化やカルシウム増加なども関与することを解明した (Yoshizawa et al., 2005; Uehara et al., 2006)が、さらに、カスパーゼ3阻害剤 (Ac-DEVD-CHO)、アポトーシス実行因子であるCaspase-3に対し抑制的に働くPARP阻害剤 (ニコチン酸アミド、3-アミノベンザマイド) あるいはドコサヘキサエン酸 (DHA) を併用することにより、MNU誘発網膜変性症の病態制御が可能であることを明らかにした (Yoshizawa et al., 2000; Kiuchi et al., 2002; Moriguchi et al., 2004; Miki et al., 2007)。

近年、遺伝性ならびに光傷害性網膜変性症モデルにおいてカスパーゼ非依存性のオートファジー (自食現象) 性細胞死 (autophagic cell death, autophagic degeneration, type 2 programmed cell death) の関与が報告された (Lohr et al., 2006)。さらに、インシュリン/ラパマイシン (TOR, target of rapamycin) の哺乳類標的経路においてインシュリンレベルの増加が視細胞の生存を延長しインシュリンの欠乏が視細胞の生存を短縮することから、視細胞変性には少なくともその代謝変化による飢餓が関与することが示唆されている (Punzo et al., 2009)。オートファジー (AP) は、ユビキチン-プロテアソーム系と並び、全ての真核細胞に普遍的に備わる細胞内蛋白分解経路であり、正常細胞での細胞内成分の新陳代謝 (細胞内浄化) に寄与する他、栄養飢餓、一部の神経変性疾患、抗がん剤などの強いストレスによる細胞死に関与することが知られており (Shimizu et al., 2009)、加齢性黄斑変性症 (Wang et al., 2008) や緑内障 (Liton et al., 2009) などの様々な眼科疾患での関与が注目されている。

我々が確立したMNU網膜色素変性症モデルや遺伝性網膜変性症モデルは、ヒトのRP疾患モデルとして、RP治療薬あるいは予防薬の開発に有用である。MNU誘発網膜変性症モデルならびに遺伝性網膜変性症モデルにおけるAPを介する視細胞の死滅機構を明らかにし、網膜でのAP発現を調整することにより、より有効なヒトRPの治療法の確立を目指すことが本研究の目的である。本研究で得られる成果は、基礎的興味にとどまらず、臨床にも直ちに活用できる意義深いデータを提供できるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、下記の3種の実験を実行し、MNU誘発網膜変性症モデルならびに遺伝性網膜変性症モデルにおけるAPを介する視細胞の死滅機構を明らかにする。さらに、網膜でのAP発現調整による網膜色素変性症の病態

抑制効果の可能性を探索する。

- (1) MNU誘発網膜変性症モデルでの病態形成における網膜でのAP機構の関与について、MNUをBALB/cマウスに単回腹腔内投与後、眼球の病理組織学的検査・画像解析検査、網膜の電子顕微鏡学的検査、網膜の免疫組織学的検査、網膜の分子生物学的検査 (AP関連遺伝子蛋白の発現) を実施し、これらのパラメーターの推移を経時的に観察した。
- (2) MNU誘発網膜変性症モデルでの病態形成における網膜でのAP機構の関与について、Retinal degeneration (rd) 遺伝子を有する遺伝性網膜変性症 rdマウスを用いて同様の解析を行う。さらに、網膜でのAP機構についてMNU誘発網膜変性症と遺伝性網膜変性症の異同を考察した。
- (3) MNU網膜色素変性症モデルや遺伝性網膜変性症モデルで、その病態抑制効果が既に報告されているカルパイン阻害剤を用いて、網膜でのAP発現調整による網膜色素変性症の病態抑制の可能性を評価した。

3. 研究の方法

- (1) MNU誘発網膜変性症マウスにおけるAP機構の解析実験

・MNU誘発網膜変性症の作成方法：7週齢BALB/c系雌マウスにMNU 60 mg/kg または生理食塩液を単回腹腔内投与した。

① 実験群

- ・対照群 (生食)：処置後24時間屠殺
- ・対照群 (生食)：72時間屠殺
- ・対照群 (生食)：7日屠殺
- ・MNU投与群：6時間屠殺
- ・MNU投与群：12時間屠殺
- ・MNU投与群：24時間屠殺
- ・MNU投与群：72時間屠殺
- ・MNU投与群：7日屠殺

② 検査項目

- ・眼球の病理組織学的検査・画像解析検査：左側をメタカルン液で、右側を10%中性緩衝ホルマリン液で24時間固定し、定法によりパラフィンブロックを作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を鏡検する。NDP.scan U10074-01 (浜松ホトニクス) を用いて、全ての標本をスキャンし、デジタル画像データを作成する。NDP.view (浜松ホトニクス) を用いて、網膜厚 (末梢網膜、中心網膜)、網膜全周ならびに網膜傷害領域の長さを計測し、視細胞比率ならびに網膜傷害率を算出した (Yoshizawa et al., 1999; Yoshizawa et al., 2000)。
- ・網膜の電子顕微鏡学検査：網膜をカルノフスキー液・オスニウム酸液に浸漬し、定法によりエポキシ樹脂包埋ブロック並びに超薄切片を作製し、鏡検した。
- ・網膜の免疫組織学的検査：下記の抗体を用

いて実施し、各々の陽性率を算出し、網膜視細胞の細胞死、増殖活性、AP 関連蛋白の発現について経時的に観察した。

- Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-digoxigenin nick-end labeling (TUNEL) 法

- Activated Caspase-3 抗体

- 網膜の分子生物学的検査：実体顕微鏡下で両側網膜を摘出し、蛋白サンプルを抽出し、ウェスタンブロット法を用いて、AP 関連遺伝子蛋白である Atg5, Atg6 (beclin-1), Atg12 並びに AP 関連蛋白である LC3 の発現を経時的に観察した。

(2) 遺伝性網膜変性症 rd マウスにおける AP 機構の解析実験

- C3H 系雌妊娠マウスを出産させ、7, 11, 14, 20 日齢時の新生仔マウスについて、眼球の病理組織学的検査・画像解析検査に、LC3-II 蛋白の網膜での発現をウェスタンブロット法で観察した。対照として、rd 遺伝子を有さない BALB/c マウス (14 日齢) の網膜について同様に検索した。C3H マウスの網膜変性症は7日齢から始まり20日齢には完成することを我々は以前報告している (Nambu et al., 1996; Yoshizawa et al., 2002)。

(3) MNU 誘発マウス網膜変性症モデルでのカルパイン阻害剤による視細胞死抑制と AP 機構の関連性

- 7 週齢 BALB/c 雌マウスに 60mg/kg MNU を腹腔内投与 (ip) した。カルパイン阻害剤である SNJ-1945 80mg/kg を MNU 投与3時間前、以後毎日1回 ip し、MNU 投与後24時間の網膜 α -spectrin と LC3-II の蛋白発現をウェスタンブロット法で観察し、7日の網膜傷害の抑制効果につき、病理組織学的検査・画像解析検査によって検証した。

4. 研究成果

(1) MNU 誘発網膜変性症マウスにおける AP 機構の解析実験

- MNU 投与群では時間経過とともに視細胞アポトーシスによる網膜変性症が進行し、7日後では網膜外層が完全に消失した。ウェスタンブロット法による解析では、病態の進行とともに LC3-II 発現減少と Caspase-3 発現増加を認め、24 時間目では Atg5 減少をみた。以上の結果から、MNU 誘発網膜変性には AP 抑制が関与することがわかった。

(2) 遺伝性網膜変性症 rd マウスにおける AP 機構の解析実験

- C3H マウスでは視細胞アポトーシスによる網膜変性症が進行し、後極部の視細胞比率の減少や網膜傷害率の増加を見た。さらに、ウェスタンブロット法による解析では、網

膜での LC3-II 発現が対照に比べて減少した。以上の結果から、MNU 誘発マウス網膜変性症と同様に、遺伝性網膜変性症 rd マウスにおいても、その病態発生に AP 機構の抑制が関与することが明らかとなった。

(3) MNU 誘発マウス網膜変性症モデルでのカルパイン阻害剤による視細胞死抑制と AP 機構の関連性

- SNJ-1945 併用群では、MNU 単独投与群に比べて、 α -spectrin 発現減少と LC3-II 発現増加が観察された。さらに、後極部の視細胞比率の回復や網膜傷害率の減少がみられ、網膜障害が改善された。以上の結果から、MNU 誘発網膜変性におけるカルパイン阻害剤による視細胞死抑制には基底レベルの AP 保持が関与することが示唆された。

以上、MNU 誘発マウス網膜変性症モデル並びに遺伝性網膜変性症マウスにおいて、その発症に網膜での AP 抑制の関与を明らかにした。さらに、カルパイン阻害剤による MNU 誘発視細胞死の抑制には基底レベルの AP 保持が関係することを見出した。これらの結果から、網膜での AP 発現調整による網膜色素変性症の病態抑制が期待できると考えられた。

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5件)

① Yoshizawa K, Sasaki T, Uehara N, Kuro M, Kimura A, Kinoshita Y, Miki H, Yuri T, Tsubura A. *N*-Ethyl-*N*-nitrosourea Retinal induces retinal photoreceptor damage in adult rats. *J Toxicol Pathol* 25, 27-35, 2012.

査読あり

DOI:10.1293/tox.25.27

② Yoshizawa K, Sasaki T, Kuro M, Miki H, Kimura A, Uehara N, Yuri T, Tsubura A. Corneal damage induced in adult mice by a single intraperitoneal injection of *N*-ethyl-*N*-nitrosourea. *In Vivo* 25, 609-616, 2011.

査読あり

<http://iv.iiarjournals.org/content/25/4/609.abstract>

③ Yoshizawa K, Kuro-Kuwata M, Sasaki T, Lai C, Kanematsu S, Miki H, Kimura-Kawanaka A, Uehara N, Yuri T, Tsubura A. Retinal degeneration induced in adult mice by a single intraperitoneal injection of *N*-ethyl-*N*-nitrosourea. *Toxicol Pathol* 39, 606-613, 2011.

査読あり

- DOI:10.1177/0192623311402221
- ④ Kuro M, Yoshizawa K, Uehara N, Miki H, Takahashi K, Tsubura A. Calpain inhibition restores basal autophagy and suppresses MNU-induced photoreceptor cell death in mice. In *Vivo* 25, 617-623, 2011.
査読あり
<http://iv.iiarjournals.org/content/25/4/617.abstract>
- ⑤ Yoshizawa K, Nakao K, Habiro M, Hayashi K, Kuwata M, Uehara N, Yuri T, Nakamura K, Tsubura A. Cerebromalacia with epilepsy and cortical blindness in a laboratory Japanese maraque (*Macaca fuscata*). *Toxicol Pathol* 38, 1058-1063, 2010.
査読あり
DOI: 10.1177/0192623310382561

[学会発表] (計7件)

- ① Kuro M, Yoshizawa K, Uehara N, Miki H, Takahashi K, Tsubura A. Calpain inhibition restores basal autophagy and suppresses apoptosis on MNU-induced photoreceptor cell injury in mice. Association for Research in Vision and Ophthalmology. 米国フロリダ 5月3日, 2011. Greater Fort Lauderdale Convention Center.
- ② Yoshizawa K, Sasaki T, Kuro M, Miki H, Kimura A, Uehara N, Yuri T, Tsubura A. Retinal degeneration induced in adult mice by a single intraperitoneal injection of *N*-ethyl-*N*-nitrosourea. D 第30回米国毒性病理学会総会 米国デンバー6月19-23日, 2011. Hyatt Regency Denver.
- ③ 義澤克彦, 畔満喜, 佐々木朋, 三城弥範, 木村彩子, 上原範久, 垾貴司, 螺良愛郎. エチルニトロソ尿素によるマウス網膜変性症の病理学的特徴. 第100回日本病理学会 横浜 4月28日, 2011. パシフィコ横浜.
- ④ 畔満喜, 義澤克彦, 上原範久, 頼彦長, 兼松清果, 三城弥範, 木村彩子, 垾貴司, 高橋寛二, 螺良愛郎. MNU 誘発マウス網膜変性におけるカルパイン阻害剤によるオートファジーの保持と視細胞死の抑制. 第100回日本病理学会 横浜 4月28日, 2011. パシフィコ横浜.
- ⑤ 義澤克彦, 桑田満喜, 頼彦長, 兼松清果, 三城弥範, 川中彩子, 上原範久, 垾貴司, 螺良愛郎. 皮質盲ならびに癲癇症状を示した実験用ニホンザルの一剖検例. 第99回日本病理学会 東京 4月28日, 2010年. 京王プラザホテル.

- ⑥ 桑田満喜, 上原範久, 義澤克彦, 頼彦長, 兼松清果, 三城弥範, 川中彩子, 垾貴司, 螺良愛郎. MNU マウス誘発網膜変性におけるオートファジーの関与とその制御. 第99回日本病理学会 東京 4月28日, 2010年. 京王プラザホテル.
- ⑦ 義澤克彦, 螺良愛郎. 動物モデルを用いたヒト眼科疾患の予防・治療法開発への応用. 第16回日本食品化学学会 大阪 6月8日, 2010年. 大阪国際交流センター.

[図書] (計1件)

- ① 畔満喜, 義澤克彦, 螺良愛郎. 薬剤誘発網膜変性. モノグラフ 病気の分子形態学. 日本臨床分子形態学会 (編集) 学際企画, 東京, 370 ページ (pp. 354-356), 2011.

[その他]

ホームページ

<http://www3.kmu.ac.jp/pathol2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

義澤 克彦 (YOSHIZAWA KATSUHIKO)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70548396

(2) 研究分担者

螺良 愛郎 (TSUBURA AIRO)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90098137

垾 貴司 (YURI TAKASHI)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50330212

上原 範久 (UEHARA NORIHISA)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号: 30368211

木村 彩子 (KIMURA AYAKO)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80548397

(3) 連携研究者

該当なし