

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592570

研究課題名(和文) DNA塩基除去修復欠損マウスを用いた網膜光障害の分子病態解明

研究課題名(英文) Study of Pathological Mechanism in Light Induced Retinal Damage using DNA Base Excision Repair Gene Knockout Mice

研究代表者

大平 明弘(Ohira, Akihiro)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：00169054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：8-オキソグアニンDNAグリコシラーゼ(OGG1)、酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素(MTH1)、アデニン/2-ヒドロキシアデニンDNAグリコシラーゼ(MUTYH)遺伝子欠損マウスを用い、網膜光障害の発生機序の解明を試みた。波長350-385 nmの光を網膜曝露量が75 J/cm²となるようにマウスに照射して網膜に障害を起こしたところ、MUTYH遺伝子欠損マウスで野生型マウスと比較して障害が軽減されており、障害の発生機序にMUTYHが関与していることが明らかとなった。神経変性を誘導するMUTYHの作用を制御する事により、効率的に網膜光障害を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to elucidate the pathological mechanism in light induced retinal damage using 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1), human MutT Homolog 1 (MTH1) and MutY glycosylase homologue (MUTYH) knockout mice. Mice were exposed to 350-385 nm wavelengths light, and retinal radiant exposure was 75 J/cm². Retinal light damage was reduced in MUTYH knockout mice, indicating that MUTYH involved in the pathological mechanism of light damage. Our results show the possibility that the suppression of neurodegeneration by control of MUTYH may effectively protect retinal light damage.

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：酸化ストレス OGG1 MUTYH MTH1 網膜光障害

1. 研究開始当初の背景

ヒトの眼では、紫外線や赤外線のひとつは角膜・水晶体に吸収されるため、網膜に到達する光は可視光線である。網膜に生じる様々な疾患が、この可視光線(環境光)の長期間暴露により生じる事は広く知られているが、光受容器である網膜に何故光で障害が起きるかという点についてはこれまであまり議論されて来なかった。また、障害の原因についても諸説ある。現在のところ最も有力なものは活性酸素による細胞障害説である。

活性酸素は、蛋白質や脂肪、核酸等の生体分子と反応し、酸化的化学修飾を引き起こすため、細胞内外の活性酸素レベルの過度の上昇は生命にとって極めて有害である。我々がこれまで行ってきた網膜光障害モデルを用いた研究でも、障害の過程で視細胞の核にグアニン塩基の酸化体である8-オキソグアニンが蓄積し、続いて視細胞のアポトーシスが生じる事が確認された。これは活性酸素による細胞障害説を支持する結果である。同時に我々は、障害を受けた視細胞の中に「生き残る細胞」と「アポトーシスに至る細胞」がある事に注目し、障害過程において生き残る細胞には自己修復能力があるのではないかと考えるに至った。

活性酸素による酸化あるいは脱アミノ化で生じた異常塩基、異常ヌクレオチドの細胞内蓄積により引き起こされる「視細胞死」あるいはその前段階の「視細胞の機能障害」の発生機序を解析することにより、網膜視細胞の維持における核酸の酸化損傷防御機構の解明が進むと期待される。加齢により発症する「加齢黄斑変性」の原因の一つとして「活性酸素による核酸の酸化損傷」の関与の実態と意義が明らかになるとともに、「核酸の酸化損傷防御に関わる分子」を標的とした網膜変性疾患の新しい予防法、治療法の開発が可能になると予想される。

そこで我々は、活性酸素によるDNAやヌクレオチドの酸化で最も高頻度に生じる酸化塩基「8-オキソグアニン」と「2-ヒドロキシアデニン」の修復・排除に酸化プリンヌクレオチド三リン酸分解酵素(MTH1)、8-オキソグアニンDNAグリコシラーゼ(OGG1)、アデニン/2-ヒドロキシアデニンDNAグリコシラーゼ(MUTYH)の3つの酵素が不可欠であることに注目した。8-オキソグアニンDNAグリコシラーゼ(OGG1)、MUTYH、MTH1の単独欠損マウス、二重欠損マウス、三重欠は既

に樹立されており、脳・神経変性疾患発症における核酸の酸化損傷の防御機構の役割の解明を進められているが、これらのマウスを用いた眼の解析はまだ行われていない。さらに網膜におけるMUTYH、MTH1の研究もこれまで全く行われていない。

パーキンソン病の慢性患者では、OGG1の発現が顕著に低下し、ミトコンドリアDNAに8-オキソグアニンが蓄積しているが、これはOGG1が酸化やニトロソ化により失活することから、長期的な酸化ストレスに暴露されていた結果と考えられる。網膜光障害でもOGG1は失活し、網膜の萎縮に関与すると予測される。また、MTH1は正常脳では検出されないが、パーキンソン病患者では生存しているドパミン神経細胞で顕著に発現し、細胞死を抑制しているようである。光障害でも視細胞死の抑制にMTH1の誘導発現が関与する可能性が示唆される。中別府は、MTH1、OGG1が欠損すると神経細胞が酸化ストレスに高感受性になることを見出している。これらの欠損マウスでは光に対する抵抗性が低いことが予測される。またMUTYHの欠損はむしろ酸化ストレスに抵抗性になる。したがってMUTYHは積極的に細胞死の誘発にも関与するものと予測する。

紫外線によるDNA損傷はよく研究されており、8-オキソグアニンが核やミトコンドリアに蓄積して細胞死の原因の一因になることが明らかにされている。しかし可視光線でも同様の酸化損傷が起きる事を、我々はラット網膜光障害モデルを用いた実験で明らかにし、世界で初めて報告した(2002)。これに遅れてルイジアナ州立大学のBazanのグループが視細胞のDNA断片化に対し、修復に関わる酵素の研究を発表している。その後は、2005年に我々と同様の動物実験方法を用い、光障害により視細胞シナプスのミトコンドリアに8-オキソグアニンの蓄積を報告したのが唯一の報告である。DNA損傷の研究分野では国内外ともに脳・神経細胞での研究はアルツハイマー病やパーキンソン病などの研究が進んでいるが、網膜の酸化ストレスの研究分野では非常に少ない。海外の研究者とも連携して更なる解析を進め、網膜視細胞の維持における酸化損傷の防御機構の役割について解明する事は、網膜変性疾患の新しい予防法・治療法開発のために重要である。

2. 研究の目的

光による網膜光障害が生じる際の細胞内外の特異的なシグナル伝達経路を同定し、そ

の経路をコントロールする事ができれば、網膜光障害の抑制が可能となる。そこで、我々は、先に述べた MTH1, OGG1, MUTYH の3つの酵素に注目した。本研究では、網膜光障害モデルにおける「視細胞死」あるいはその前段階の「視細胞の機能障害」の発生機序を解明するため、野生型マウス, *Mth1*, *Ogg1*, *Mutyh* 遺伝子欠損マウスおよび細胞を用い、視細胞の維持における核酸の酸化損傷防御機構の全容を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子欠損マウス

実験には九州大学生体防御医学研究所より提供された OGG1 ノックアウト (KO) マウス, *Mutyh* KO マウス, *Ogg1*/*Mth1* ダブル (D) KO マウス, および *Ogg1*/*Mutyh* DKO マウス(いずれも雌雄混合)を使用した。コントロール群としては野生型マウスである C57BL6/J(チャールスリバー)を使用した。実験に使用するまでマウスは明期 12 時間(約 30 ルクス, 7:00~19:00), 暗期 12 時間(19:00~7:00)の環境で飼育した。

(2) 網膜光障害モデルの作製

8 週齢のマウスに光を照射して網膜に障害を起こした。照射光の波長は 350~385 nm とし、網膜への照射エネルギー量が 75 J/cm² となるように照射時間を調節した。また、照射は麻酔下 (Ketamine 100 mg/ml, Xylazine 20 mg/ml 混合液) で行い、左眼のみに照射を行った。右眼は対照眼として遮蔽して光が当たらないようにした。

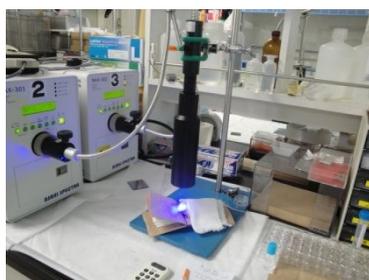


図 1 照射中のマウス

(3) 網膜の機能評価

照射後 1 週間目に網膜電図 (ERG) の測定を行い、網膜の機能評価を行った。麻酔下のマウス角膜にコンタクトレンズ型 LED 電極を接触させ、10000 カンデラ、5 ミリ秒の光を一回照射し、波形の変化を測定した。

(4) 網膜の構造評価

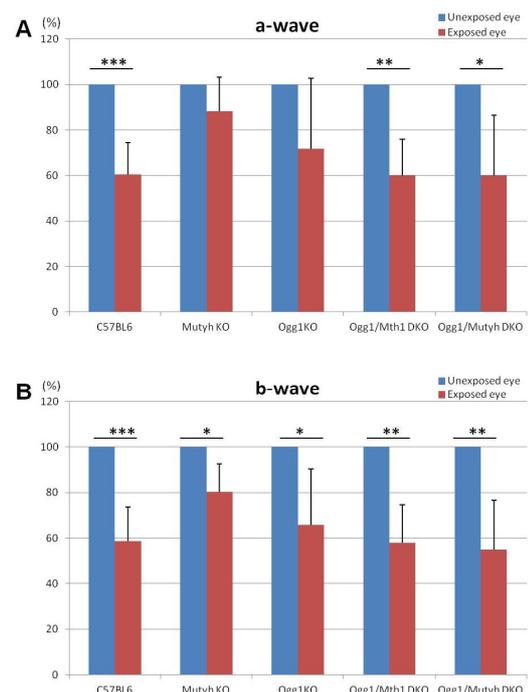
ERG を測定した後、麻酔下でマウスを安楽死させ、眼球を摘出した。摘出した眼球を固定後にパラフィン包埋し、厚さ 4 μm の切片を作成して HE 染色を行った。切片の画像を

撮影し、視細胞の核により構成される外顆粒層 (ONL) の厚さ (図 2 両矢印) を測定 (ImageJ 1.32, National Institute of Health, Bethesda, MD) して網膜の構造を評価した。測定は視神経乳頭より上下それぞれ 100, 600, 1100, 1600 μm 離れた箇所と辺縁部より 100 μm 離れた箇所の合計 10 カ所で行った。

(4) 免疫染色

厚さ 4 μm の切片を作成して免疫染色を行った。脱パラフィン処置を行った後、3%過酸化水素水に浸漬して内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。室温で 30 分間ブロッキング (Protein Block Serum-Free Ready-to-Use; Dako Cytomation, Ca, USA) を行った後、酸化ストレスマーカーである 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) に対する抗体 (日本油脂;x100) と 4 で 1 晩反応させた。二次抗体 (EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Mouse; Dako Cytomation) と反応させた後、ジアミノベンジジン (DAB) で発色させ、脱水後封入した。*Ogg1* KO マウスと C57BL6/J マウスに関しては照射後 1 日目の眼球より切片を作成し、4-ヒドロキシヘキサナール (4-HHE), 4-ヒドロキシノネナール (4-HNE), 8-オキソグアニン (8-OxoG) に対する抗体を用いて同様に染色を行った。

4. 研究成果



The mean (±SD) of a and b-wave amplitudes (% of amplitudes in unexposed eye) for exposed eyes are shown. n = 7 in C57BL6, n=5 in *Ogg1*/*Mth1* DKO and n=6 in another groups. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001, by paired t-test.

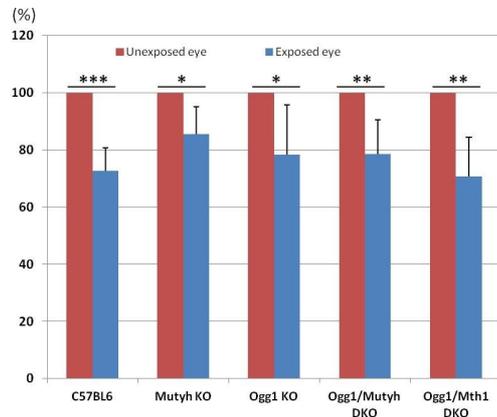
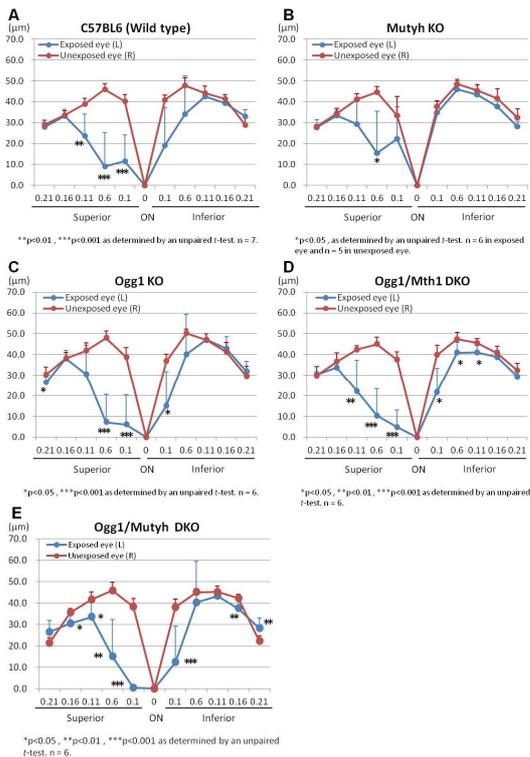
図 2 光照射による網膜電図の変化

(1) 網膜の機能評価

網膜電図は全ての群で a-wave, b-wave 共に振幅が減弱していた。照射を行っていない対照眼の振幅を 100%とした場合、照射眼の a-wave は C57BL6/J 群が $60.6 \pm 13.8\%$, Mutyh KO 群が $88.2 \pm 15.1\%$, Ogg1 KO 群が 71.8 ± 31.0 , Ogg1/Mth1 DKO 群が $60.0 \pm 15.9\%$, Ogg1/Muthy DKO 群が $60.1 \pm 26.4\%$ であった。しかし, Mutyh KO 群と Ogg1 KO 群は対照眼と比較して有意差が見られなかった (図 2A)。同様に, b-wave は, C57BL6/J 群が $58.6 \pm 15.0\%$, Mutyh KO 群が $80.4 \pm 12.2\%$, Ogg1 KO 群が 65.8 ± 24.6 , Ogg1/Mth1 DKO 群が $57.8 \pm 16.8\%$, Ogg1/Muthy DKO 群が $55.0 \pm 21.7\%$ であった。また, b-wave は全ての群で対照眼と比較して振幅が有意に減少していた (図 2B)。以上の事から, Mutyh KO 群と Ogg1 KO 群はコントロール群である C57BL6/J 群よりも振幅の減弱が少なく, 完全ではないものの障害が抑制されていると考えられた。

(2) 網膜の構造評価

全ての群で外顆粒層 (ONL) は光照射によって薄くなっていった (図 3) 特に, 視神経乳頭に近い部分で顕著であり, 下方よりも上方で ONL が薄くなっていった。しかし, Mutyh KO 群では下方では ONL の厚さは対照眼とほぼ同程度に維持されており, 上方の菲薄化も他の群と比較すると軽度であった (図 3B)。



The mean (±SD) of ONL area (% of ONL area in unexposed eye) for exposed eyes are shown. n = 7 in C57BL6, n = 5 in Ogg1/Mth1 DKO and n = 6 in another groups. *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001, by paired t-test.

図3 外顆粒層の厚さ

また, 図 3 のグラフより ONL の面積を算出した (図 4)。未照射の対照眼の面積を 100%とした場合, C57BL6/J 群が $72.6 \pm 8.0\%$, Mutyh KO 群が $85.4 \pm 9.7\%$, Ogg1 KO 群が 78.3 ± 17.4 , Ogg1/Mth1 DKO 群が $70.8 \pm 13.6\%$, Ogg1/Muthy DKO 群が $78.5 \pm 12.1\%$ であった。いずれの群も対照群と比較すると有意に面積が減少していた。

図4 外顆粒層の面積

ERG の結果と同様, Mutyh KO 群では C57BL6/J 群と比較して ONL の菲薄化が抑制されており, 面積の減少も少なかった。一方, Ogg1 KO 群も面積の減少は抑制される傾向があったものの, 網膜上方の ONL 菲薄化は Mutyh KO 群ほど抑制されておらず, 両群を比較した場合, Mutyh KO 群の方が障害は抑制されていると考えられた。

(3) 免疫染色

未照射の網膜では, いずれの群でも外顆粒層に著明な 8-OHdG 陽性細胞は観察されなかったが, Ogg1 KO 群と Ogg1/Mth1 KO 群のガングリオン細胞が一部陽性反応を示した (図 5A)。照射後 7 日目の下方網膜では, Mutyh KO 群以外の群で未照射網膜と比較してガングリオン細胞, 内顆粒層, 外顆粒層が強く染色されていた (図 5B) が, 網膜の構造は比較的維持されていた。一方, 上方網膜では C57BL6/J 群, Ogg1 KO 群, Ogg1/Mth1 DKO 群で網膜が菲薄化していた。特に Ogg1 KO 群と Ogg1/Mth1 DKO 群では ONL が完全に消失しており, 残った内網状層の細胞が強陽性を示していた (図 5C)。しかし, 網膜の菲薄化があまり見られなかった Mutyh KO 群と Ogg1/Muthy DKO 群では ONL はあまり染色されず, 未照射網膜と同程度であった。

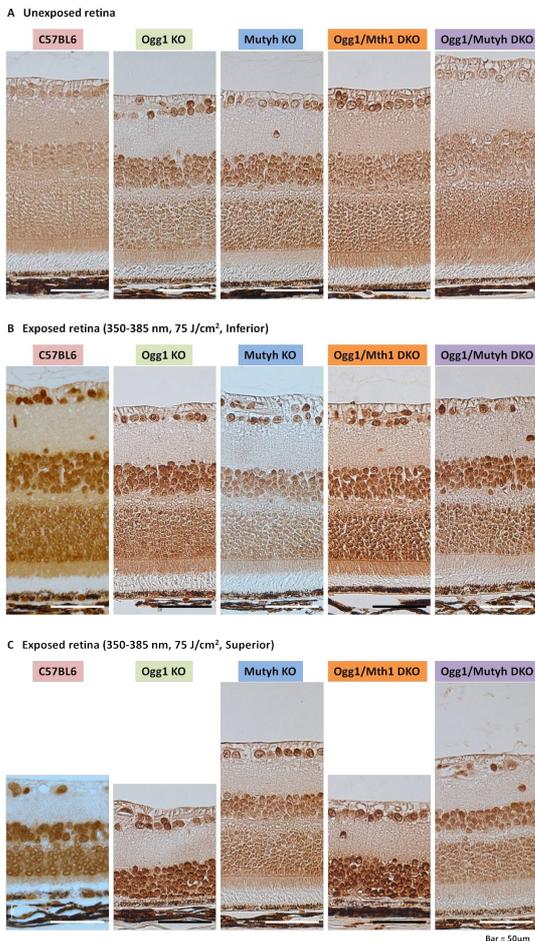


図5 照射後7日目の網膜の免疫染色像(8-OHdG)
照射後1日目のOgg1 KO群およびC57BL6/J群では、網膜の菲薄化は観察されず、また、照射による染色性や局在の著明な変化も観察されなかった。

(4) 障害発生メカニズム

Ogg1とMth1が酸化塩基である8-oxoGの蓄積を抑制するのに対し、Mutyhは8-oxoGに誤って取り込まれたアデニンの除去修復を介して神経細胞死とミクログリオシスを誘導することが既に中別府らのグループにより報告されている。本研究データからも、網膜光障害の発生にMutyhが深く関与している事が明らかとなった。これは、酸化塩基の蓄積を除去するよりも神経細胞死やグリオシスによる神経変性を抑制する方がより効率的に網膜光障害を抑制する可能性を示唆する初めての知見である。現在、網膜光障害抑制のため抗酸化作用を持つ様々な薬剤が研究されているが、加えてMutyhが関与する神経変性経路を抑制する事がより効率的な保護作用に繋がるものと考えられる。

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0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大平 明弘 (OHIRA, Akihiro)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：00169054

(2) 研究分担者

谷戸 正樹 (TANITO, Masaki)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：30284037

海津 幸子 (KAIDZU, Sachiko)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：00325052

中別府 雄作 (NAKABEPPU, Yusaku)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：30180350

奥野 勉 (OKUNO, Tsutomu)

労働安全衛生研究所・人間工学・リスク研究グループ・部長

研究者番号：90332395

(3) 連携研究者

なし