

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592661

研究課題名(和文) アラキドン酸によるMNU誘発網膜色素変性症動物モデルの病態制御とその分子機構

研究課題名(英文) Disease control of MNU-induced animal models for retinitis pigmentosa by arachidonic acid and its molecular mechanisms

研究代表者

螺良 愛郎 (TSUBURA, Airo)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：90098137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アラキドン酸(AA)のMNU誘発網膜変性症モデルに対する疾病制御成果を妊娠期から授乳期ならびに離乳直後の1週間という若年期に限定して検討した。雌親は0.1、0.5、2.0%AA食又は基礎食(<0.01%AA)を摂餌させ21日齢の乳仔に50mg/kg・MNUを投与し、さらに雌親と同じ食餌を7日間与えた。MNU投与後24時間で視細胞アポトーシスを評価し、7日後の網膜を形態的に比較した。基礎食あるいは0.1%AA食群では後極部にアポトーシスに起因する網膜変性をみたが、0.5AA食群ではその限りではなく、用量依存性に病態抑制をみたことから、富AA食の若齢ラットの網膜変性制御作用を実証した。

研究成果の概要(英文)：The effects of arachidonic acid (AA) on N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-induced retinal degeneration was investigated in Lewis rats during the gestational, lactational and post-weaning periods. Dams were fed 0.1, 0.5 or 2.0% AA diets or a basal (< 0.01% AA) diet. On day 21, pups received 50 mg MNU/kg or vehicle, and were fed the same diet as their mother for 7 d. Retinal apoptosis was analyzed by the TUNEL assay 24 h after the MNU, and retinal morphology was examined 7 d post-MNU. Histologically, all rats that received MNU and were fed the basal and 0.1% AA diets developed photoreceptor cell loss in the central retina. The 0.5 and 2.0% AA diets rescued retinal damage. In parallel with the increase in serum and retinal AA levels, the apoptotic index in the central retina was dose-dependently decreased in rats fed the 0.5 and 2.0% AA diets. Therefore, an AA-rich diet rescued young Lewis rats from MNU-induced retinal degeneration via suppression of photoreceptor apoptosis.

研究分野：実験病理学

キーワード：アラキドン酸 網膜変性症 視細胞 アポトーシス ラット MNU 網膜色素変性症

1. 研究開始当初の背景

ヒト網膜色素変性症(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る。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、その分子機構を明らかにすることにより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、Caspaseファミリーの活性化に加えて、PARPの活性化、JNK、c-Junならびにc-Fosの活性化、NF- κ Bの発現低下が関与することを解明した(Yoshizawa et al., 2005; Uehara et al., 2006)。なお、細胞内カルシウム増加によるCalpain活性化の関与を見るとともに、病態の進展に伴い基底レベルのオートファジーの減衰をみとめ、オートファジーの復旧が病態を軽減することから、オートファジーは網膜視細胞を生存に向かわせていることを実証した(Kuro et al., 2011)。これらをふまえ、Caspase-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Calpain阻害剤(SNJ-1945)の有効性を実証するとともに視細胞に豊富なn-3系多価不飽和脂肪酸(PUFA)である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)。

アラキドン酸(AA)はn-6系PUFAのひとつで4つの二重結合を含む20個の炭素鎖からなるカルボン酸に分類され20:4、n-6と略称され、細胞膜中のリン脂質としてDHAとともに脳や

網膜に多く含まれている。AAは母乳に含まれていることから乳児の精神発育、学習の記憶能力とともに視覚機能の向上に関与するとされている。AAはリノール酸を原料として体内で産生されるが、中枢神経系が著しいスピードで発達する乳児期においては重要な成分であり、成人と異なりこの時期DHAやAAの合成能力は弱く体内蓄積量も少なく、食餌として摂取する必要がある。近年、コーデックス委員会[FAO(国連食糧農業機関)とWHO(世界保健機関)により設置された国際的な政府間機関]でベビーミルクの規格において、DHAを配合する場合、同量以上のAAの配合を推奨することが合意され、欧米では乳児用調製乳に添加されている。但し、DHAとは異なりAAは体内で必須の役割りを果たすものの、過剰になれば癌をはじめとして多くの病気の原因となる。そこで我々は、妊娠期・新生児期のAA摂取に注目し、網膜変性症動物モデルでのAA摂取の影響につき明らかにすることを着想した。なお、成人期における効果についても比較を行う。DHAの研究成果を基盤としてAAの重要性に思い至ったが、ヒトRP患者へのAAの食品添加あるいはサプリメントの有効性・リスク評価に貢献することが本研究の目的である。

我々が確立したMNU誘発網膜色素変性症モデルはヒトRPとはその発症機構は異なるものの、視細胞アポトーシスという共通機構を介して病態が進行することから、ヒトのRP疾患モデルとして、RP治療あるいは予防の開発に有用である。本モデルにおける新たな治療標的を同定できれば、失明予防策の樹立に寄与するとともに治療法の提言も可能となり、臨床応用にも資するところが大きいと考え、本実験を立案した次第である。

2. 研究の目的

我々が確立したMNU誘発網膜変性症はヒトRPの恰好の動物モデルであり、これを駆使

して病態発現の分子機構の解明とそれに伴う治療標的を同定してきた。AA は DHA とともに PUFA の主体を占め、胎児では母体から胎盤経由で、乳児では母乳から供給される。近年、未熟児や成熟児での AA と DHA の役割に関する研究が精力的に進められ、乳幼児の脳・精神発達に重要であることが臨床的にも実験的にも報告されてきた。これに対し、乳幼児の視覚機能に対しては、機能亢進という報告や有意な変化をみなかったという報告があり、一定の見解が得られていないのが現状である(Koo, 2003; Lien and Clandinin, 2009)。一方、RP と難聴を合併する常染色体劣性遺伝病であるアッシャー症候群(日本の患者数 900~9000 名; 難病情報センター <http://www.nanbyou.or.jp/kenkyuuhan/>) では血清 AA 濃度の減少が報告されており(Bazan et al., 1986; Williams et al., 1989)、我々は妊娠期・新生児期から AA を補給することにより、RP 発症予防や遅延効果を期待できるのではないかと推察している。そこで MNU 投与ラットを被験動物として AA の胎仔/乳仔期暴露群、成体期暴露群を作製し、各々の同齢の AA 非暴露群と網膜変性の程度を形態計測により定量的に比較するとともに AA の効果を暴露量に加えて暴露時期も視野に入れて明らかにするとともに、その分子機構についても解明したい。AA は DHA とともに胎児期から新生児期にかけて脳神経系や網膜組織に多く蓄積される脂肪酸で、乳児の正常な発育と機能の発達に重要な役割りを果たしている。DHA が網膜組織にとどまらず癌をはじめとした種々の生活習慣病に対する予防に有効であるのに対して、AA の成人期における過剰摂取は成体に好ましくない作用をもたらす。よって AA は発育段階の違いによって二相性の作用を発揮する可能性がある。DHA に比して AA はあまり重要視されていない傾向にあったが、我々は網膜変性に的を絞り、我々の確立した網膜色素変性動物モデ

ルを駆使して個体発生的に AA の効果をみたり、その結果、有効性あるいは発達段階の違いにより毒性をみれば。直ちにヒトに外挿しうる AA の用量・用法、投与計画が作成可能となり、ヒト RP の予防/治療法樹立に有用な情報を提供できる意義ある研究と確信している。

3. 研究の方法

AA 食摂取の MNU 誘発網膜変性症に対する影響をみるため雌雄の Sprague-Dawley(S-D)ラットに AA 量の異なる食餌(対照食, 0.008%AA; 低 AA 食, 0.13%AA; 中等 AA 食, 0.50AA; 高 AA 食, 2.01AA)を交配 2 週間前に開始し、妊娠期(3 週間)、授乳期(3 週間)と離乳後 1 週間継続し、生後 21 日齢の離乳時雄ラットに 50mg/kg・MNU を腹腔内投与し、28 日齢時に屠殺して血清ならびに網膜の AA 量を計測し網膜を観察した。

4. 研究成果

血清 AA 組成は対照群(20.03mol%)、低 AA 群(22.66mol%)、中等 AA 群(33.37mol%)、高 AA 群(40.48mol%)であり(中等ならびに高 AA 群対対照群は各の $p < 0.01$)、網膜 AA 組成は対照群(6.61mol%)、低 AA 群(7.58mol%)、中等 AA 群(7.36mol%)、高 AA 群(8.85mol%)であった(高 AA 群対対照群は $p < 0.05$)。いずれの食餌を摂取した群とも毒性はみられず、体重増加は AA 食餌群が軽い傾向ではあったが有意差はみなかった。形態計測にて視細胞比率(視細胞厚/全網膜厚)と網膜傷害率(視細胞層が 4 層の網膜長/全網膜長)をみたところ、対照群(19.4%、39.5%)、低 AA 群(32.0%、21.2%)、中等 AA 群(46.7%、2.7%)、高 AA 群(43.6%、6.1%)となり、対照群と比較すると中等ならびに高 AA 群では有意な傷害の軽減をみた。よって、周生期の 0.5%の AA 食餌添加は MNU 誘発網膜変性を有意に抑制した。しかし、10 週齢の雄 S-D ラットに 6 週間上記の AA 含有食を摂取させ、15 週齢時に

60mg/kg・MNUを投与し16週齢時に屠殺して網膜を比較したところ、病態抑制はみなかった。よってAAの網膜に対する有効性は作用時期が重要と考えられた。

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 4件)

Emoto Y, Yoshizawa K, Kinoshita Y, Yuri T, Yuki M, Sayama K, Shikata N, Tsubura A. Green tea extract suppresses

N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in Sprague-Dawley rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 252(9):

1377-1384, 2014. 査読有

DOI: 10.1007/s00417-014-2702-7

Yoshizawa K, Emoto Y, Kinoshita Y, Kimura A, Uehara N, Yuri T, Shikata N, Hamazaki K, Tsubura A.

Arachidonic acid supplementation does not affect

N-methyl-N-nitrosourea-induced renal preneoplastic lesions in young Lewis rats. *Oncol Lett* 5(4): 1112-1116, 2013. 査読有

DOI: 10.3892/ol.2013.1162

Yoshizawa K, Sasaki T, Kuro M, Uehara N, Takada H, Haramura A, Ohara N, Moriguchi T, Tsubura A.

Arachidonic acid supplementation during gestational, lactational and post-weaning period prevents retinal degeneration in a rodent model. *Br J Nutr* 109(8): 1424-1432, 2013. 査読有

DOI: 10.1017/S0007114512003327

Emoto Y, Yoshizawa K, Uehara N, Kinoshita Y, Yuri T, Shikata N, Tsubura A. Curcumin suppresses

N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in

Sprague-Dawley rats. *In Vivo* 27(5):

583-590, 2013. 査読有

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23988891>

〔学会発表〕(計 6件)

榎本祐子, 義澤克彦, 浜崎 景, 木下 勇一, 結城美智子, 垾 貴司, 河島 洋, 螺良愛郎. MNU誘発白内障ならびに網膜変性症モデルに対するミード酸補給の効果. (日病会誌 104(1): 461,

2015) 第104回日本病理学会 4月30日, 2015. 名古屋国際会議場(名古屋)

榎本祐子, 義澤克彦, 結城美智子, 木下 勇一, 垾 貴司, 四方伸明, 螺良愛郎. MNU誘発ラット網膜色素変性症

モデルに対する緑茶抽出物の有用性. (日病会誌 103(1): 321, 2014) 第103回日本病理学会 4月24日, 2014.

広島国際会議場(広島)

義澤克彦, 榎本祐子, 木下 勇一, 垾 貴司, 結城美智子, 吉川 豊, 茶山和敏, 螺良愛郎. 緑茶抽出物によるラット肝臓毒性. (日病会誌 103(1): 303,

2014) 第103回日本病理学会 4月24日, 2014. 広島国際会議場(広島)

榎本祐子, 義澤克彦, 上原範久, 木村 彩子, 木下 勇一, 垾 貴司, 四方伸明, 螺良愛郎. MNU誘発ラット網膜色素変性症モデルに対するクルクミンの

有用性. (日病会誌 102(1): 360, 2013) 第102回日本病理学会 6月6日, 2013. ロイトン札幌(札幌)

義澤克彦, 上原範久, 榎本祐子, 木下 勇一, 守口 徹, 浜崎 智仁, 螺良愛郎. N-methyl-N-nitrosourea誘発ラット膵臓腺房過形成: その特徴とアラキドン酸投与によるプロモーション効果. (抄録集: 198, 2012) 第154

回日本獣医学会 9月14日, 2012.
岩手大学(盛岡)
Yoshizawa K, Sasaki T, Kuro M,
Uehara N, Takada H, Harauma A,
Ohara N, Moriguchi T, Tsubura A.
Arachidonic acid supplementation
during gestational, lactational and
post-weaning periods prevents
retinal degeneration induced by
N-methyl-N-nitrosourea in young
Lewis rats. (抄録集: 68, 2012) The
6th Int Cong Asian Soc Toxicol /
第39回日本毒性学会, July 17, 2012.
Sendai International Center
(Sendai)

〔図書〕(計 3件)

Yoshizawa K, Emoto Y, Tsubura A.
N-Methyl-N-nitrosourea-induced retinal
degeneration in rats: A reliable animal
model of retinitis pigmentosa for the
development of new therapeutic strategies.
In: Recent Advances in Eye Research,
Hogarth A (ed), Nova Science Publishers,
Hauppauge, pp.53-97, 2015.

Tsubura A, Yoshizawa K, Sasaki T.
Methylnitrosourea. In: Encyclopedia
of Toxicology, 3rd Ed. vol. 3, Wexler P
(Ed.), Elsevier, Academic Press,
Oxford, pp.321-323, 2014.

Tsubura A, Yoshizawa K, Kuro M.
N-Methyl-N-nitrosourea animal
models for retinitis pigmentosa, In:
Animal Models for the Study of
Human Disease. Conn PM Ed.,
Academic Press / Elsevier, Oxford,
pp.117-142, 2013.

〔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
<http://www3.kmu.ac.jp/pathol2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

垓 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
2012年分担削除

(3) 連携研究者

なし