

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861610

研究課題名(和文)酸化ストレスを指標とした網膜色素変性の新規治療法の評価

研究課題名(英文)Evaluation of new treatments for retinitis pigmentosa using indicators of oxidative stress

研究代表者

伊藤 忠 (Ito, Tadashi)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・その他

研究者番号：00431453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：網膜はつねに光にさらされており、光障害は酸化ストレスを介して視細胞障害に対して促進的に働く。網膜色素変性は本来視細胞に特異的に発現する遺伝子の変異を起源とする視細胞変性が疾患の本態であるが、その視細胞変性過程において酸化ストレスの関与が近年知られるようになってきた。酸化ストレスを指標とした治療法の評価は新規の視点として有効である可能性が高い。本研究では網膜色素変性に対する酸化ストレスを指標とした治療法評価の確立を目指した基礎的な研究を行い、眼内の酸化ストレスおよび抗酸化力について各種網膜硝子体疾患にて比較検討を行い、これが将来網膜色素変性診療に応用できるか否かの可能性を探ることを目的とした。

研究成果の概要(英文)：Retina is always illuminated by light, and light accelerates photoreceptor damage through oxidative damage. Retinitis pigmentosa (RP) that is primarily caused by one of photoreceptor-specific genes has been known to be influenced by light-induced oxidative damage. Therefore, a new treatment for RP using oxidative stress indicators may be effective as a new monitoring method. In this study, in order to establish a new treatment for RP using oxidative stress as an indicator, basic studies for evaluating intraocular oxidative stress and antioxidant potential in samples from patients with various vitreoretinal disorders. The aim of this study is whether or not the results from this study can be applied to the field of the research for RP.

研究分野：眼科学

キーワード：酸化ストレス 抗酸化力 網膜硝子体疾患 網膜色素変性 網膜剥離 糖尿病網膜症

## 1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性(RP)は遺伝性の視細胞変性を主体とする網膜変性疾患であり、これまでのところ有効な治療法は開発されていない。視細胞変性は多くの場合、視細胞に特異的に発現する遺伝子の変異によって、視細胞に変調をきたし、最終的に視細胞死機構が働くことにより網膜全体の変性へとつながることが判明している。視細胞死機構には様々な反応経路が存在することが分かかってきており、近年では酸化ストレスが修飾因子として関与することが知られるようになってきた。申請者らは網膜色素変性に対する新しい治療法開発を目指しているが、元々の遺伝子異常による影響が大きく、酸化ストレス除去がどの程度効果があるのかについては大きな謎である。今回の研究においては網膜色素変性モデルラットを用いて酸化ストレスを視標とした新規の治療法の開発を最終目標として、各種遺伝性網膜変性ラットにおける眼内酸化ストレスの経時的変化とその変化の視細胞変性に及ぼす影響を探るべく、研究計画を立案した。しかし、動物モデルにおける眼内酸化ストレスの測定法の信頼性の検討が不十分であり、最初から動物サンプルでの実験開始に不安があったため、その前段階としてまず以前から保存してあった各種網膜硝子体疾患患者から得られた眼内液サンプル内の抗酸化力を安定的に測定できることを確認することを最優先とすることとした。併せてヒトサンプル内を用いて酸化ストレスを間接的に測定し、各種網膜硝子体疾患における酸化ストレスの強弱が測定できるかどうかの検討を最初に行うこととした。併せて、各種疾患の眼内液のタンパク質の発現プロファイルをプロテオミクスの手法を応用して検討することとした。この研究の後に網膜色素変性での視細胞変性に類似する視細胞変性をきたす裂孔原性網膜剥離(RRD)を対象疾患として、RRD硝子体中の酸化ストレスが臨床的にどの因子の影響を最も受けるかを統計学的に解析することにより、RRDによる視細胞変性機構を酸化ストレスの観点から検討することとした。最後に、実際にRPモデルラット網膜や硝子体サンプルを用いて抗酸化力が実際に計測可能かどうかを検討することとした。

## 2. 研究の目的

本研究は網膜色素変性に対する新規治療法について酸化ストレスを視標とするという視点から評価できるかどうかを明らかにすることである。その具体的な方策として、網膜疾患における実際の酸化ストレスあるいは抗酸化力が実際に測定できるかどうか、測定したデータに信頼性があるかどうか、各種疾患での差異は見られるのかどうか、臨床因子による差異はみられるのかどうか、網膜変性ラット眼内液で酸化ストレスが測定できるかどうかなどをまず明らかにする必要

があり、これらの本研究を順次行った。

### (1) 眼内液を用いた抗酸化力の測定

各種網膜硝子体疾患の眼内液を手術時に採取し、そのサンプルを用いて抗酸化力を測定できるかどうかを明らかにすることを目的とした。各サンプル内の抗酸化力はすでにBiological Antioxidant Potential (BAP)として血液サンプルにて確立されている方法を眼内液に応用することとした。

### (2) 各種網膜硝子体疾患眼内液(硝子体)サンプル内のタンパク質発現パターンの差異の検討

酸化ストレスおよび酸化ストレスの影響が硝子体内のタンパク質発現にどのような影響を及ぼすかを明らかにする目的で、各疾患の硝子体液サンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて視覚的に観察するとともにプロテオミクスの手法により主要なタンパク質を同定した。

### (3) 各種網膜硝子体疾患硝子体における疾患毎の酸化ストレスの差異の解析

前述の(1)にて測定したBAPが疾患毎に差異を示すかどうかを統計学的に検討した。

### (4) 裂孔原性網膜剥離(RRD)における酸化ストレスと抗酸化力との関係について

RPの視細胞変性の1つのモデルとしてRRDにおける視細胞変性を取り上げて、RRDにおける視細胞変性に影響を及ぼすと考えられる酸化ストレスを抗酸化力BAPを測定することにより間接的に類推し、BAPと術前の臨床因子との関連性を統計学的解析により明らかにすることを目的とした。

### (5) 網膜変性モデルラット網膜および硝子体における抗酸化力の測定

前述の(1)から(4)までの経験と結果を踏まえて、RPモデルとしてRoyal College of Surgeonsラットを対象として眼内の抗酸化力を測定することを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 眼内液(硝子体)の採取

弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の承認のもと、弘前大学医学部附属病院にて硝子体手術を行ったRRD 45例45眼、増殖糖尿病網膜症(PDR) 93例93眼、網膜静脈閉塞症(RVO) 14例14眼、網膜上膜(ERM) 18眼18例、黄斑円孔18眼18例を対象として、手術時に採取した硝子体液を直ちに遮光、氷冷の上-80に冷凍保存した。

### (2) 抗酸化力の測定

抗酸化力はウイスマー社製 F.R.E.E.を使

用し、BAP 測定のプロトールに従った。測定原理は生体サンプルにチオシアン酸塩と加えこの混合溶液中で 3 価鉄イオン ( $Fe^{3+}$ ) を 2 価鉄イオン ( $Fe^{2+}$ ) に還元する還元力を持って BAP と定義した。生体の酸化ストレスは攻撃因子 (酸化ストレス産生因子) と抗酸化力 (scavengers) とのバランスが前者側に傾いた状態と考えられるが、BAP の低下は酸化ストレスが相対的に抗酸化力に打ち勝っている状態とも考えられる。じっさいの測定に当たっては硝子体液 10  $\mu$ l に反作用試薬 (キット) を加えて 505 nm の波長で比色定量して BAP を mM 単位で求めた。

### (3) 各種網膜硝子体疾患硝子体のプロテオミクス解析

各種網膜硝子体疾患患者から採取された硝子体のうち、RRD 2 例、PDR 1 例、RVO 2 例、ERM 2 例および MH 2 例についてタンパク質濃度を測定した後、ほぼ一定量のタンパク質を 12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離後、銀染色法により染色し可視化した。その後、主要タンパク質バンドについてゲルを切り出し、トリプシン処理を行った後、NanoFrontier LD mass spectrometer による LC-MS/MS 解析を行った。ペプチド配列の同定は NCBRRnr のデータベースを用いた。

### (4) 各種網膜硝子体疾患硝子体サンプル中の BAP の比較

RRD, PDR, RVO, ERM および MH の 5 種類の疾患内で BAP にどのような差異があるのかを統計学的に解析した。各群のデータが正規分布を示すかどうかの検定には Shapiro-Wilk test を用い、全体比較として一元配置分散分析法 (ANOVA) を、また各群間の多重比較 (post hoc test) には Dunnett T3 test を使用した。

### (5) RRD 硝子体中の BAP とそれに影響を及ぼす臨床因子の解析

RRD の術前データを診療録から検討し、各症例の網膜剥離範囲 (象限)、自覚症状の持続期間 (週)、増殖性硝子体網膜症 (PVR) や硝子体出血 (VH) の合併の有無、黄斑剥離の有無および年齢を記録した。これらのデータをもとに各種臨床因子と BAP との関係を統計学的に解析した。剥離範囲と BAP では剥離範囲と BAP との ANOVA による比較と相関解析 (Pearson) および 1-2 象限群と 3-4 象限剥離群との比較 (t-検定) を施行した。期間と BAP では両者の相関解析 (Pearson) を、PVR や VH の合併では t-検定を用いた。最後に、どの因子が最も影響を及ぼしているのかを解析するため BAP を従属変数、剥離範囲、剥離期間、硝子体変化、黄斑剥離の有無および年齢を独立変数としてステップワイズ法による重回帰分析を行った。

### (6) RCS ラット網膜および硝子体の BAP

野生型 RCS ラット (+/+) と変異型 RCS ラット (rdy/rdy) の生後 12 週齢個体を安楽死の上、両眼眼球摘出を行った。合計 2 群 4 眼の眼球から網膜と硝子体を分離して、リン酸緩衝液 (pH7.4) 中でホモジナイズし、タンパク量を合わせてその 10  $\mu$ l 中の BAP を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 各種疾患の硝子体中主要タンパク質の解析

図 1 各種網膜硝子体疾患硝子体の主要タンパク質泳動所見 (銀染色)

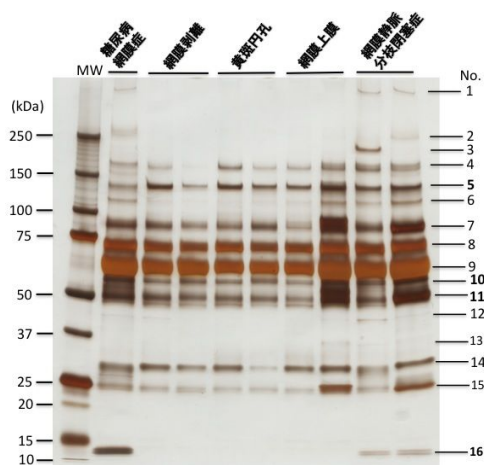


図 1 に硝子体サンプルの SDS-PAGE 所見を示す。LC-MS/MS 解析の結果主要タンパクとして同定されたバンドは以下の通りとなった。

- 1, keratin; 2, keratin; 3, ferritin light chain;
- 4, hormerin; 5, retinol binding protein 3;
- 6, complement C3; 7, IgG  $\gamma$ -1 chain;
- 8, serotransferrin; 9, serum albumin;
- 10, antithrombin III; 11, PEDF;
- 12, apolipoprotein A-IV; 13, IgG $\gamma$ -1 chain;
- 14, transthyretin; 15, IgG  $\kappa$  chain

これらの結果から、酸化ストレスに対して抗酸化力として作用しうる主要タンパク質分子 (albumin, transferrin, PEDF) などには各疾患間で大きな量的な差異は生じていないことが推定された。

### (2) 各疾患間での BAP 値の差異

各網膜硝子体疾患における硝子体中 BAP 値 (mM) の結果は、RRD,  $1.86 \pm 0.47$ ; PDR,  $1.67 \pm 0.46$ ; RVO,  $1.86 \pm 0.41$ ; ERM,  $2.17 \pm 0.59$ ; MH,  $2.26 \pm 0.45$  であった。ANOVA による全体比較では  $p < 0.001$  で有意な差異を認めた。多重比較では RRD は MH に対して有意に低く ( $p = 0.012$ )、PDR は MH ( $p < 0.001$ ) と ERM ( $p = 0.019$ ) に対し

て有意に低くなっていることが判明した。なお、RRDとPDR ( $p = 0.130$ )、RRDとRVO ( $p = 1.000$ ) および RRDとERM ( $p = 0.425$ ) の間には有意な差異はみられなかった。また各疾患ともBAPと年齢との間には有意な相関関係はみられなかった。

### (3) RRDと臨床因子との関連性

#### BAPと剥離範囲

ANOVAにて1から4象限のRRD各群におけるBAP値の間には全体で有意な差異が認められた ( $p = 0.026$ )。BAPと剥離範囲の間には有意な負の相関関係が認められた (相関係数,  $-0.384$ ;  $p = 0.008$ )。剥離範囲が1-2象限群のBAPは  $2.01 \pm 0.40$  であったのに対して同3-4象限群では  $1.57 \pm 0.47$  であり有意の差を認めた ( $p = 0.002$ )。

#### BAPと剥離期間

BAPと剥離期間との間の相関係数は  $0.095$  であり有意の相関とは認められなかった ( $p = 0.528$ )。

#### BAPとPVRおよびVHとの関連

BAPとPVRまたはVHの存在はそれらが見られなかった症例のBAPとの間に有意差はみられなかった ( $p = 0.095$ )。

#### BAPと黄斑剥離との関係

BAPと黄斑剥離の有無との間には有意な関連性はみられなかった ( $p = 0.097$ )。

#### 重回帰分析

標準化係数で採択されたのは剥離範囲のみであり、標準化係数は  $-0.369$  ( $p = 0.008$ ) であった。その他の因子はすべて除外された。この結果、今回の解析ではRRD硝子体内のBAPは網膜剥離範囲と最も強い関連性があり、剥離範囲が広ければBAPが低下していることが明らかになった。

### (4) RCSラット眼内BAP

今回の研究ではこの方法でRCSラットにおいても十分にBAPが測定できることが分かった。2群しか設定しなかったので統計学的な検討はできなかったが、野生型に比べて変異型はBAPが十分低い値であった。このことから、網膜色素変性モデルにおいてもBAPの低下があることが示され、間接的に視細胞変性において酸化ストレスが関与していることが推定された。今後、本方法を用いて網膜色素変性モデル動物において眼内BAP値を抗酸化力や酸化ストレスの指標として解析できる目途が得られた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

現在、執筆中にて掲載論文はまだない

〔学会発表〕(計 2 件)

伊藤 忠、工藤孝志、吹田淑子、毛内奈津姫、中澤 満. ICE症候群に対して硝子体、緑内障インプラント、角膜移植同時手術を施行した1例. 第126回青森眼科集談会、2014. 4.20. 弘前大学医学部コミュニケーションセンター.

陳内嘉浩、鈴木幸彦、伊藤 忠、中澤 満. シリコンオイル抜去を目的とした硝子体手術の成績. 第126回青森眼科集談会、2014. 4.20. 弘前大学医学部コミュニケーションセンター.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等: なし

## 6. 研究組織

研究代表者

伊藤 忠 (ITO, Tadashi)

弘前大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号: 00431453