

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791254

研究課題名 (和文) 老化に伴う網膜変性に対する ALDH2 の効果の検討

研究課題名 (英文) Study for the treatment with ALDH2 against age-related retinal degeneration.

研究代表者

菅野 江里子 (SUGANO ERIKO)

東北大学・国際高等研究教育機構・助教

研究者番号：70375210

研究成果の概要：

加齢性網膜においても、 β -アミロイドの蓄積が報告されている。本研究では β -アミロイドのが蓄積されるアルツハイマーモデルを用いて検討を行った。また、それと関連して報告のある酸化物質 4-hydroxynonenal (4-HNE) の蓄積について検討を行った。その結果、網膜で β -アミロイド及び 4-HNE の蓄積を起こす個体が存在したが、アルツハイマーモデルであれば、必ずこれらの蓄積を起こす訳ではなく、またその頻度も低い事がわかった。更に、4-HNE は加齢よりむしろ酸化ストレスに関与していると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：加齢、網膜、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 加齢黄斑変性症 (AMD) は網膜の黄斑部に老化が原因で発生する目の難病で日本における失明原因の第3位を占めている。患者数は約3万人と推定され、この6年間で倍増しており、高齢化社会の進行とともに増加の一途をたどっている。AMDの原因は、主に網膜色素上皮 (RPE) 細胞を始めとした網膜細胞の老化と考えられてい

る。その特徴として、ブルッフ膜の加齢変化によるドルーゼン (不飽和脂肪酸の蓄積物) の形成、リポフスチンと呼ばれる視細胞由来家蛍光物質の蓄積、RPE細胞の機能低下あるいは加齢変化による網膜-血液柵の崩壊、または新たに網膜に形成される網膜新生血管 (CNV) などが挙げられる。

(2) 現在、AMDに対してはCNVを術的に取り去る方法 (CNV抜去術)、また

は、形成されてしまった CNV を選択的に潰す、レーザー光を用いた経瞳孔的温熱療法 (TTT) などが行われ、効果が報告されている。しかし、AMD には確立した予防法はなく、特効薬もない。網膜は、酸化ストレスに晒される器官である為、AMD 予防法として、ビタミン E、C、フラボノイド類などの抗酸化作用を持つ物質による保護効果について多くの報告があり、研究も進められている。

(3) 平成 16 年度採択課題 (若手(B) 研究代表者: 菅野 江里子)において、酸化ストレス下の RPE 細胞死について研究を行ってきた。この研究では、4-HNE が RPE に酸化ストレスを与える事が示された。4-HNE は脂肪酸の過酸化により生じるアルデヒドの一種で神経細胞等に有害であるとされている。また、この 4-HNE は、アルツハイマーを発症したヒトの脳に多量にあることが報告されている (Lovell MA et. al., Neurobiol Aging, 1997)。

2. 研究の目的

近年、アルツハイマー症と AMD の機序が類似していることが明らかとなってきた (Anderson DH et. al., Exp Eye Res. 2004)。事実、 β -アミロイドを蓄積させるアルツハイマー型トランスジェニックマウスを用いた実験で RPE 細胞の変性、網膜萎縮が見られた (Yoshida T, J Clin Invest. 2005)。そこで、本研究では、4-HNE が加齢モデル動物の網膜内で増加するか、検討を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) β -アミロイド前駆タンパク質 (APP) を発現させることにより脳内に β -アミロイドを増加させてアルツハイマー病を起こすトランスジェニックマウス (APP(+)/B6SJL) を用い、検討を行った。APP(+)/B6SJL マウスの網膜組織の評価を行い、加齢黄斑変性様の障害を起こしているかを調べた。また、4-HNE の蓄積について免疫染色により調べた。

(2) 一方、高週齢の Fischer344 ラットは加齢性の網膜変性を引き起こすことが報告されている。正常な加齢モデル (正常加齢モデル) として、高週齢の Fischer344 ラットを用い、網膜組織像及び 4-HNE の蓄積について同様に調べた。

(3) 培養 RPE 細胞を用いて、4-HNE の細胞生

存への影響及び抗酸化ストレスタンパク質の 4-HNE に対する効果を核染色及び MTS assay により調べた。

4. 研究成果

(1) マウス (APP(+)/B6SJL) を調べた結果、脳内に僅かな β -アミロイドの蓄積が見られるが、網膜では僅かに検出されるに留まった。APP(+)/B6SJL マウスでは、正常の同系統マウスと比較して、視細胞の減少が僅かに見られたが、正常マウスと比較して、網膜の組織に大きな変化は見られなかった。

(2) 高週齢の Fischer344 ラットを調べた結果、1 年 6 ヶ月齢以上の個体においてリポフスチン様物質の顕著な蓄積と、視細胞変性が見られる個体があった。また 4-HNE が網膜で検出された個体があった。

以上の長期的サンプリング結果から、アルツハイマー病において、関連して網膜に 4-HNE の蓄積を起こさない事が分かった。また、加齢においては 4-HNE の蓄積を起こすケースもあるが、加齢との直接的な関係を見出すには、更なる検討が必要である。

また、光障害を与え、視細胞に酸化ストレスを与えると 4-HNE の蓄積が顕著に起こることから、4-HNE は酸化ストレスに大きく関与していると考えられる。

(3) 培養した RPE 細胞を用いて 4-HNE に対する細胞毒性を調べた結果、細胞死を起こすことが明らかとなった。さらに、抗酸化ストレスタンパク質であり、RPE で発現しているチオレドキシシン系タンパク質 Trx1, Trx2 を発現させると、細胞死を阻害した。以上の事からも 4-HNE は網膜内においては、大きな酸化ストレスとなっている可能性が示唆された。

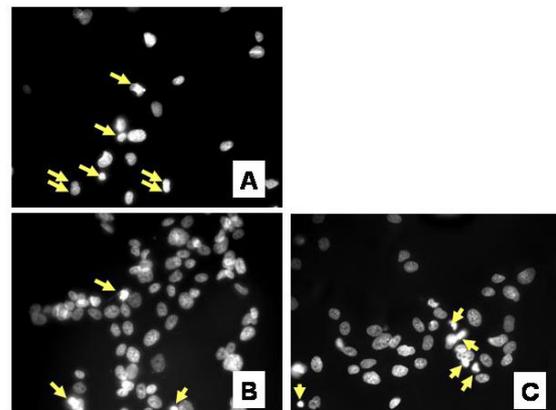


図 1. 4-HNE を添加後 24hr の培養 ARPE 細胞。矢印は、細胞核の断片化を示している。(A) ARPE 細胞 (B)Trx-1 を強発現させた ARPE 細胞 (C)Trx-2 を強発現させた ARPE 細胞

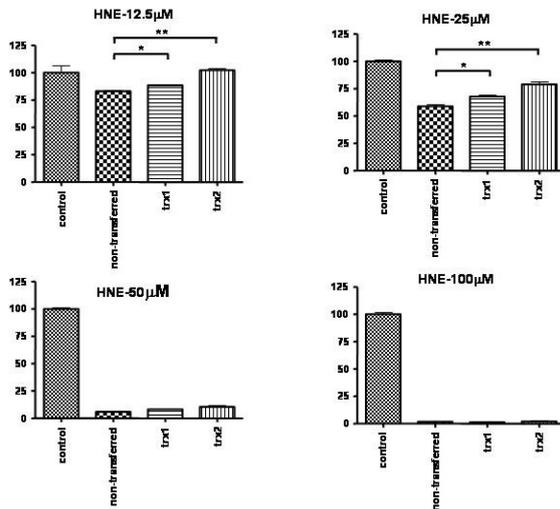


図2. 4-HNEを添加後24hrの培養ARPE細胞の生存率。4-HNEを添加しない群を100%の生存率とした(control)。無処理の細胞群(non-transfected)、Trx-1強発現群(trx1)及びTrx-2強発現群に対し4-HNEを添加し、細胞生存

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)

- ① Wang H., Sugiyama Y., Hikima T., Sugano E., Tomita H., Takahashi T., Ishizuka T., Yawo H.
Molecular determinants differentiate photocurrent properties of two channel rhodopsins from Chlamydomonas. J Biol Chem. 査読有 284-9, 2008, 5 685-5696
- ② Yoshida H., Tomita H., Sugano E., Isago H., Ishiguro S.I., Tamai M
Brain-derived neurotrophic factor increases the phagocytic activity mediated through mitogen-activated protein kinase pathway in cultured iris pigment epithelial cells. Cell Struct Funct. 査読有 33(1), 2008, 21-6
- ③ Watanabe T., Kobayashi R., Komiya K., Fukushima T., Tomita H., Sugano E., Kurino H., Tanaka T., Tamai M., Koyanagi M.
Evaluation of Platinum-Black (Pt-b) Stimulus Electrode Array for Electrical Stimulation to Retinal Cells in Retinal Prosthesis System. Japanese Journal of Applied Physics 査

読有 46 (4B), 2007, 2785-91

- ④ Hiroshi Tomita, Eriko Sugano, Hiromu Yawo, Toru Ishizuka, Hitomi Isago, Satoko Narikawa, Sebastian Küler, Makoto Tamai

Visual responses in aged dystrophic RCS rats were restored by AAV-mediated channelopsin-2 gene transfer.

Invest Ophthalmol Vis Sci 査読有 48 (8), 2007, 3821-6

[学会発表] (計8件)

- ① Eriko Sugano, Hiroshi Tomita, Hitomi Isago, Teru Hiroi, Makoto Tamai.
Restore Vision Using Channelrhodopsin-2: Dissemination of AAV Vector in Channelrhodopsin-2 transferred rat. Asia-ARVO (アジア眼科研究会議) 平成21年1月18日 インド, hyderabad, International Conv. Cent
- ② 菅野江里子, 富田浩史, 砂金ひとみ, 玉井信
Channelrodopsin-2による遺伝盲ラットの視機能再建—免疫学的検討—
第79回 日本動物学会 平成20年9月7日, 東京国際フォーラム
- ③ E. Sugano, H. Tomita, H. Isago, H. Yawo, T. Ishizuka, M. Tamai.
Immune Responses to Adeno Associated Virus Type2 Encoding Channelrhodopsin-2 in Genetically Blind Rat Model for Gene Therapy. ARVO (国際眼科研究会議), 平成20年4月29日, Fortlauderdale, FL, International Conv. Cent
- ④ Eriko Sugano, Hiroshi Tomita, Hiromu Yawo, 他
Restoration of visual responses in genetically blind rats using AAV-mediated channelopsin-2 gene transfer
Society for Neuroscience (北米神経科学会) 2007年11月5日 Sandiego, CA
- ⑤ 菅野江里子, 富田浩史, 砂金ひとみ, 他
チャンネルロドプシン-2 遺伝子導入による遺伝盲ラットの視機能の回復 日本動物学会 2007年9月21日 弘前大学
- ⑥ Eriko Sugano, Hiroshi Tomita, Wei Cao, 他
Stable Expression of Thioredoxins in RPE Cells Increases Cell Viabilities During

Oxidative Stress
ARVO (国際眼科研究会議) 2007 年 5 月 10
日 Fortlauderdale, FL

⑦ **菅野江里子**、富田浩史、八尾寛、他
光障害による視細胞変性と光感受性遺伝
子による光反応の回復 第111回 日本眼
科学会, 生体材料シンポジウム, 2007 年
4月19日, 大阪国際会議場

⑧ **菅野江里子**、富田浩史、八尾寛、他
人工網膜に替わる新規視機能再建法の検
討 第111回 日本眼科学会 2007年4月
19日, 大阪国際会議場

[図書] (計1件)

①富田浩史、**菅野江里子**、玉井信
医学書院臨床眼科 増刊号 網膜硝子体
診療 update 「チャンネルロドプシン」
第62巻 11号, 2008年, 336-341

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

①名称: 遺伝子改変による光感受性増大の方
法

発明者: 富田浩史、菅野江里子
権利者: 富田浩史、菅野江里子
番号: 学内整理番号: P20070350
出願年月日: 2007/12/18
国内外の別: 国内

②名称: 遺伝子導入による視覚機能の再建方
法

発明者: 富田浩史、玉井信、菅野江里子
権利者: 富田浩史、玉井信、菅野江里子
番号: 学内整理番号: P20060407
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.iiare.tohoku.ac.jp/laboratory/researcher.html>

<http://www.visual-neuroscience.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 江里子 (SUGANO ERIKO)
東北大学 国際高等研究教育機構 助教
研究者番号: 70375210

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: