様式Ｃ－１９

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２４年　６月　６日現在

機関番号：３２６０７
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2009～2011
課題番号：21790249
研究課題名（和文）　網膜色素変性症により引き起こされる視細胞死の機序解明と新規治療法開発への応用
研究課題名（英文）　Analysis of the mechanism of photoreceptor cell death induced by retinitis pigmentosa in order to develop the new therapy.
研究代表者
坂本　謙司（SAKAMOTO KENJI）
北里大学・薬学部・講師
研究者番号：80317065

研究成果の概要（和文）：網膜色素変性症（RP）の原因の１つに視細胞ホスホジエステラーゼ６（PDE6）サブユニットの変異が挙げられる．本研究は，*Pde6a* に変異を持つ RP モデルマウスである *nmf363*，および *Pde6b* に変異を持つ RP モデルマウスである *nmf137* において，活性酸素産生酵素の１つである NADPH オキシダーゼの阻害薬であるアポシニンや，抗酸化能を併せ持つ Ca^{2+}チャネルブロッカーであるニルバジピンが，それぞれ視細胞保護効果を示すことを明らかにした．これらの薬物は RP 患者の治療に用いることができる可能性がある．
研究成果の概要（英文）：Mutation in phosphodiesterase 6 genes (*PDE6*) causes retinitis pigmentosa (RP). The present study demonstrated that apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, and nilvadipine, a Ca^{2+} channel blocker with an anti-oxidant effect, protect against photoreceptor cell death in the *nmf*363 mouse, which has a mutation in *Pda6a*, and the *nmf137* mouse, which has a mutation in *Pde6b*, respectively. Therefore, these drugs may be able to use for treatment of RP patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００９年度	1,600,000	480,000	2,080,000
２０１０年度	800,000	240,000	1,040,000
２０１１年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：基礎医学，薬理学一般
キーワード：脳神経疾患，薬理学

１．研究開始当初の背景

網膜色素変性症(RP)は進行性の視細胞(その中でも特に暗部での視力や視野の広さを司っている桿体細胞）および網膜色素上皮細胞の変性により視覚障害，ひいては失明を引き起こす疾患であり，人口 4000 人あたり１人が罹患していると推定されている．RP は厚生労働省が定めた特定疾患治療研究事業対象疾患の１つで，いわゆる難病として認識されている．現在のところ RP による視細胞死を明らかに遅延あるいは停止させる有効な治療法は存在しない．RP による視覚障害は患者の生活の質を著しく低下させるため，その進行を停止あるいは遅らせることのできる治療法の開発が急務である．現在，動物実験レベルにおいて，神経幹細胞を用いた再生医療やウイルスベクターを用いた遺伝子治療による RP の視覚障害遅延効果が報告されており，注目されているが，加えて，RP に対する有効な薬物療法の開発もコスト面

や先進諸国以外での治療を考えると不可欠である．

米国テキサス大学の Daiger 博士のグループが視覚障害に関係しているヒト遺伝子の変異についてまとめた公開データベースである RetNet ホームページによると，これまでに 21 の常染色体劣性遺伝型 RP の原因遺伝子が同定されており，それらの多くは桿体細胞の細胞内情報伝達に重要な役割を果たしているタンパク質をコードする遺伝子である．それらの中でもホスホジエステラーゼ 6（PDE6）は桿体細胞の機能に中心的な役割を果たしている分子であり，α, β および 2 つの γ サブユニットで構成されている．PDE6 の α サブユニットをコードする *PDE6A* と β サブユニットをコードする *PDE6B* の変異は，ヒトの常染色体劣性遺伝型 RP では最も頻度が高く，RP 全体の約 5%を占めることが知られている．

RP の治療法の開発には，適切な動物実験モデルが必須である．*Pde6b* の変異に起因する RP については，過去に *rd1, rd10, rd1-2J*（*nmf137*）など数種のマウスモデルが報告されており，それらを用いて，視細胞死の機序や，薬物治療，再生医療，遺伝子治療などの可能性が検討されている．PDE6 は cGMP に特異的なホスホジエステラーゼ（cGMP 分解酵素）であり，その機能が減弱あるいは消失しているこれらの動物モデルにおいては，網膜中 cGMP 含有量の上昇が報告されている．桿体細胞では細胞内 cGMP 量の増加は cGMP-gated channel の開口確率を上昇させ，細胞内への Na^+イオンや Ca^{2+}イオンの流入量を増加させる．その結果，細胞膜が脱分極し，電位依存性 Ca^{2+} channel を通って流入する Ca^{2+}イオン量が増加する．桿体細胞内 Ca^{2+}イオン量の増加が細胞死を引き起こすトリガーとなっていることにはほとんど異論はないが，その下流においてどのような機序が細胞死を引き起こしているのかについては，まだ確固たる結論は出されていない．*PDE6A* の変異に起因する RP に関しては Cardigan Welsh corgi dog が唯一の動物モデルであり，網膜変性のメカニズムや治療法に関しては，これまで動物実験レベルでさえほとんど検討がなされていない．

研究代表者は，米国留学中に *Pde6a* の変異に起因する RP の新規マウスモデルである *nmf363* を同定することに成功した．これらのマウスモデルは *PDE6A* の変異に起因する RP の機序解明やその治療法の開発に非常に有用なツールであり，かつ世界初のマウスモデルである．加えて，応募者はこれまで長年にわたり，心筋虚血・再灌流による心筋細胞死や網膜虚血・再灌流による視神経細胞死の機序，および細胞を虚血・再灌流傷害から保護する薬物の探索について研究を続けてきた．また，網膜神経細胞の生存には，網膜を栄養する網膜血管の循環機能の保持が重要なことはいうまでもないが，応募者は所属研究室で独自に開発した小動物用網膜循環解析システムを用いて，多くの網膜循環改善薬のリードとなる化合物を報告している．応募者は，1）RP モデルマウスである *nmf137* および *nmf363* の詳細な解析を通じて，視細胞死のメカニズムを追求することが新たな視細胞保護薬の開発につながり，また，2）過去の研究により見いだされた化合物をこれらのマウスモデルに適用することにより，視細胞保護作用をもつ化合物を探索できる，との考えから本研究を着想した．

２．研究の目的

本研究の目的は，応募者が米国留学中に同定した新規 RP マウスモデルおよび既存の RP マウスモデルにおいて見られる視細胞死の機序を解析することによって，新たな RP の治療法の開発に結びつけることである．

３．研究の方法

（１） 応募者が他の実験系で見いだした候補化合物が RP モデルマウスの視細胞死に与える影響

生後 7 日から 17 日にかけて，*nmf137* マウスの母親に薬物を飲水に混和して投与した．薬物投与終了日に，網膜電図を測定して網膜機能の客観的評価を行い，その後眼球を摘出した．1 つの眼球を固定後，パラフィン包埋し，薄切組織切片を作成し，視細胞の脱落を H-E 染色を行った組織切片で評価した．もう 1 つの眼球からは網膜を剥離し，錐体細胞を Alexa Flour 488 標識ピーナッツアグルチニン（PNA）で特異的に染色し，錐体細胞数を計測した．以上の項目に関して，薬物を投与した群と溶媒を投与した群とを比較し，投与した薬物に視細胞保護作用があるかどうかを組織学的かつ機能的に検討した．用いる薬物は，応募者が過去に網膜虚血・再灌流モデルにおいて視神経細胞死を抑制することが明らかにした Ca^{2+}チャネルブロッカーのニルバジピン，抗アルツハイマー病薬のドネペジルなど，応募者の持つ候補薬物ライブラリーより神経保護効果を持つ可能性が高いものを選択して用いた．

（２） RP モデルで認められる視細胞死に対する NADPH オキシダーゼの関与

Pde6b に変異を持つマウスモデルでは，網膜 cGMP 含有量の増加が Ca 過負荷を引き起こして細胞死を導くという概念が，一応，学会のコンセンサスとなっている．しかし，*Pde6a* の変異がどのようにして細胞死を引き起こすのかについては今のところ全く報

告がない．研究代表者は，視細胞死に対する活性酸素の役割に注目し，活性酸素産生酵素の 1 つである NADPH オキシダーゼの活性を阻害する薬物であるアポシニンや塩化ジフェニルヨードニウム（DPI）が RP モデルの視細胞死に与える影響を検討した．生後 7 日から 17 日にかけて，*nmf137* マウスの母親に薬物を飲水に混和して投与した．また，生後 16 日から 26 日にかけて，*nmf363* マウスに薬物を飲水に混和して投与した．以降の実験方法は上記（1）と同様に行った．

4．研究成果

（1） 応募者が他の実験系で見いだした候補化合物が RP モデルマウスの視細胞死に与える影響

① *nmf137* マウスにおけるニルバジピンの視細胞保護作用

生後 17 日齢の *nmf137* マウス網膜において，ONL には視細胞の核が 2 層，あるいは 3 層存在しており，その層厚の平均はおよそ 7 ~ 8 μm であった．生後 7 日目から 17 日目の間に，母親に対して nilvadipine（30 mg/kg/day）を投与したところ，生後 17 日齢において，*nmf137* マウスの視細胞の脱落が有意に抑制されており，加えて錐体細胞機能の指標となる明順応網膜電図の b 波の大きさが有意に大きくなっていた．

従って，ニルバジピンが PDE6B の変異に起因する RP に対する視細胞保護薬となり得る可能性が示唆された．

② *nmf137* マウスの視細胞死に対する他の薬物の影響

網膜虚血・再灌流モデルや N-メチル-D-アスパラギン酸硝子体内投与モデルにおいて，視神経保護効果が認められている，ドネペジルやエダラボンが *nmf137* マウスで認められる視細胞死に与える影響を検討したが，これらの薬物には視細胞保護効果が認められなかった．

（2） RP モデルで認められる視細胞死に対する NADPH オキシダーゼの関与

① *nmf137* マウスで認められる視細胞死に対する NADPH オキシダーゼの関与

生後 7 日目から 17 日目の間に，母親に対して NADPH オキシダーゼ阻害薬である apocynin（100 mg/kg/day）を投与したが，視細胞の脱落や明順応網膜電図の b 波の大きさに対して有意な影響を示さなかった．Apocynin と同様に NADPH オキシダーゼを阻害することが知られている diphenyliodonium chloride（DPI）（10 mg/kg/day）を母親に対して投与したところ，明らかな視細胞脱落抑制作用を示したが，明順応網膜電図の b 波の大きさに対しては有意な影響を示さなかった．溶媒投与群および上述の薬物投与群において，peanut agglutinin（PNA）を用いて網膜フラットマウント標本を染色し，錐体細胞数を検討したが，明らかな変化は認められなかった．

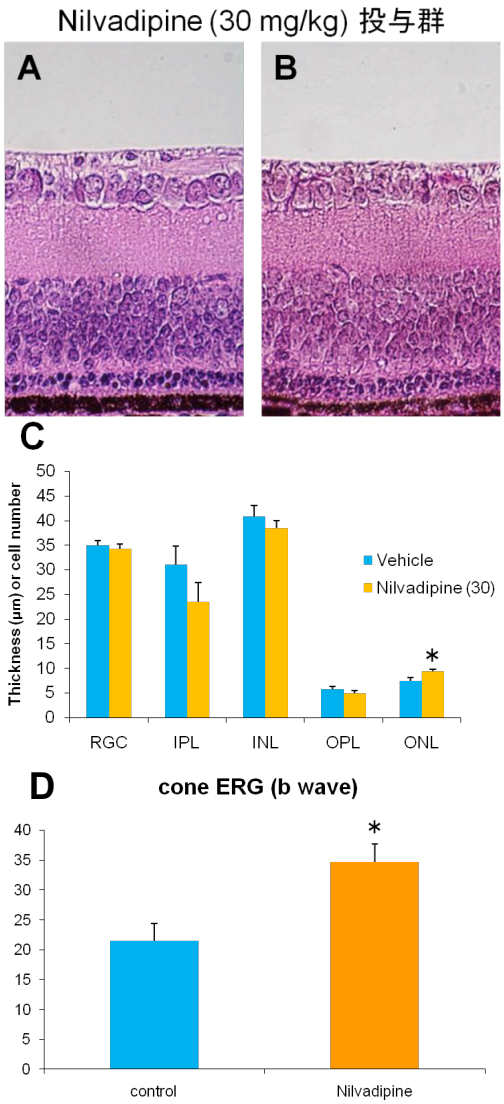

Fig. 1 **生後 26 日齢の *nmf137* マウスにおいて認められる視細胞の脱落に対する nilvadipine の影響**

nmf137 マウスの出生が確認された日を 0 日齢とし，生後 7 日から母親に対し薬物の投与を開始した．薬物は飲水に混和し，投与期間は 10 日間とした．生後 17 日目に溶媒投与群（A）と薬物投与群（B）の眼球を摘出し，paraffin 包埋標本を作製した．組織切片を作製して HE 染色を行い，光学顕微鏡を用いて観察した．A および B には代表的な網膜組織標本の光学顕微鏡写真を示した．溶媒投与群（A）と比べて，nilvadipine（30mg/kg）投与群（B）では ONL に存在する視細胞の核の脱落が抑制されていた． 視神経節細胞（RGC）数および網膜各層の厚さを測定したところ，nilvadipine 投与群において ONL の層厚が有意に大きかった（C）．眼球摘出前に明順応 ERG（cone ERG; D）を測定したところ，nilvadipine は，cone ERG の b 波の大きさの低下を抑制した． Scale bar = 50 μm. $^{*}P < 0.05$.

従って，*nmf137* マウスで認められる視細胞死には NADPH オキシダーゼ由来の活性酸素種が関与している可能性がある．アポシニンと DPI の結果の違いは，薬物の母乳への移行性の違いに起因する可能性がある．また，DPI の組織学的保護効果が NADPH オキシダーゼ阻害作用以外の作用に起因している可能性も否定できない．今後のさらに詳しい検討が必要である．

② *nmf363* マウスで認められる視細胞死に対する NADPH オキシダーゼの関与

生後 26 日齢の *nmf363* マウス網膜において，ONL には核が約 3 層存在しており，その層厚の平均はおよそ 12 μm であった．生後 16 日目に離乳を行い，生後 26 日目までの 10 日間，飲水に apocynin（6 and 20 mg/kg/day）を混和し，投与した．その結果，生後 26 日齢において *nmf363* マウスの視細胞の脱落が apocynin の用量に依存して抑制される傾向が認められた．Apocynin（20 mg/kg/day）投与群では ONL には核が約 4 層観察された．その平均層厚は約 16 μm であり，溶媒投与群よりも有意に大きかった．加えて ERG による電気生理学的な機能検査を行ったところ，apocynin（20 mg/kg/day）は，明順応 ERG の b 波の大きさの減少を有意に抑制した．溶媒投与群および apocynin 投与群において，網膜を PNA で染色し，錐体細胞の数を検討したが，各群間に差は認められなかった．PNA は錐体細胞外節のみならず内節に対しても結合するため，外節は脱落して内節さえ残っていれば蛍光標識された細胞が観察される．すなわち，PNA は外節が消失して機能を失った錐体細胞も標識してしまう可能性があり，ERG で錐体機能が認められなくても，PNA により錐体細胞の存在が確認されることがあり得ると考えられる．

従って，*nmf363* マウスで認められる視細胞死には NADPH オキシダーゼ由来の活性酸素種が関与している可能性がある．加えて，NADPH オキシダーゼ阻害薬が PDE6A の変異に起因する RP に対する視細胞保護薬となり得る可能性が示唆された．

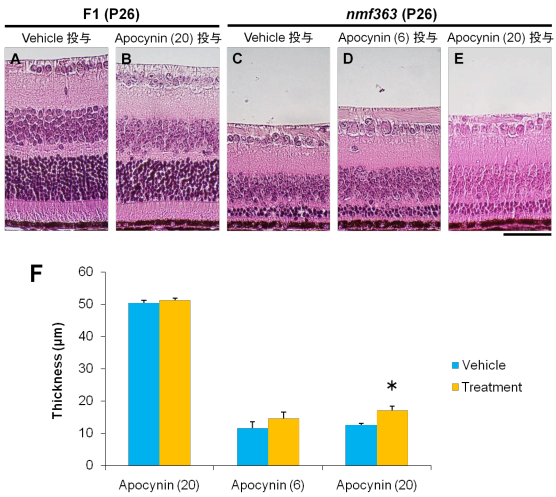

Fig. 2 **生後 26 日齢の *nmf363* マウスにおいて認められる視細胞の脱落に対する apocynin の影響**

nmf363 マウスの出生が確認された日を 0 日齢とし，生後 16 日において離乳および群分けを行った．離乳と同時に薬物の投与を開始した．薬物は飲水に混和し，薬物投与期間は 10 日間とした．生後 26 日目に対照群（A and C）と薬物投与群（B, D and E）の眼球を摘出し，paraffin 包埋標本を作製した．組織切片を作製して HE 染色を行い，光学顕微鏡を用いて観察した．A ~ E には代表的な網膜組織標本の光学顕微鏡写真を示した．溶媒投与群（C）に比べ apocynin 投与群（D and E）では ONL に存在する視細胞の脱落が抑制されていた．RGC 数および網膜各層の厚さを測定したところ，apocynin（20 mg/kg/day）投与群において ONL の層厚が有意に大きかった（F）． Scale bar = 50 m. $*P < 0.05$

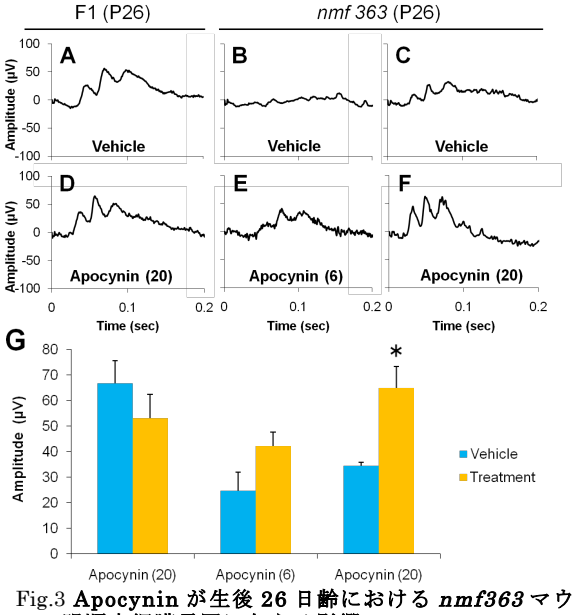

Fig.3 **Apocynin が生後 26 日齢における *nmf363* マウスの明順応網膜電図に与える影響**

nmf363 マウスの出生が確認された日を 0 日齢とし，生後 16 日において離乳および群分けを行った．離乳と同時に apocynin（20 mg/kg/day）の投与を開始した．薬物は飲水に混和し，薬物投与期間は 10 日間とした．生後 26 日齢において明順応 ERG（cone ERG）を測定した．Apocynin（20 mg/kg/day）は，*nmf363* マウスで認められる cone ERG（A ~ F）の b 波の大きさの減少を有意に抑制した（C, F and G）．$*P < 0.05$.

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８件）

① 森麻美，花田真幸，坂本謙司，中原努，石井邦雄，Noradrenaline contracts rat retinal arterioles via stimulation of α(1A)- and α(1D)-adrenoceptors，Eur J Pharmacol，査読有，Vol. 673，No. 1-3，2011，pp. 65-69，DOI：10.1016/j.ejphar.2011.10.012

② 森麻美，坂本謙司，中原努，石井邦雄，Role of ß3-adrenoceptors in regulation of retinal vascular tone in rats，Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol，査読有，Vol. 384，No. 6，2011，pp. 603-608，DOI：10.1007/s00210-011-0682-2

③ 森麻美，鈴木佐知，坂本謙司，中原努，石井邦雄，Vasodilation of retinal arterioles induced by activation of BKCa channels is attenuated in diabetic rats，Eur J Pharmacol，査読有，Vol. 669，No. 1-3，2011，pp. 94-99，DOI：10.1016/j.ejphar.2011.07.042

④ 清水奈保子，森麻美，坂本謙司，中原努，石井邦雄，Involvement of bradykinin in trypsin-induced urinary bladder contraction in cyclophosphamide-treated rats，Biol Pharm Bull，査読有，Vol. 34，No. 7，2011，pp. 1122-1125，DOI：10.1248/bpb.34.1122

⑤ 坂本謙司，大木かよ，斉藤麻希，中原努，石井邦雄，Small molecule cyclin-dependent kinase inhibitors protect against neuronal cell death in the ischemic-reperfused rat retina，J Ocul Pharmacol Ther，査読有，Vol. 27，No. 5-3，2011，pp. 419-425，DOI：10.1089/jop.2010.0141

⑥ 津田曜，中原努，森麻美，坂本謙司，石井邦雄，Resveratrol prevents bradykinin-induced contraction of rat urinary bladders by decreasing prostaglandin production and calcium influx，Eur J Pharmacol，査読有，Vol. 666，No. 1-3，2011，pp. 189-195，DOI：10.1016/j.ejphar.2011.05.019

⑦ 坂本謙司，平岩昌英，斉藤麻希，中原努，佐藤陽治，長尾拓，石井邦雄，Protective effect of all-trans retinoic acid on NMDA-induced neuronal cell death in rat retina，Eur J Pharmacol，査読有，Vol. 635，No. 1-3，2010，pp. 56-61，DOI：10.1016/j.ejphar.2010.03.001

⑧ 坂本謙司，大木かよ，斉藤麻希，中原努，石井邦雄，Histological protection by donepezil against neurodegeneration induced by ischemia-reperfusion in the rat retina，J Pharmacol Sci，査読有，Vol. 112，No. 3，2010，pp. 327-335，DOI：10.1254/jphs.09302FP

〔学会発表〕（計１９件）

① 青木学一，森麻美，中原努，坂本謙司，石井邦雄，エルカトニンはオキサリプラチンおよびパクリタキセル誘発末梢神経障害を回復させる，日本薬学会第 132 年会，2012. 3. 29，北海道大学（北海道）．

② 森麻美，花田真幸，坂本謙司，中原努，石井邦雄，ノルアドレナリンはα1A 及びα1D アドレナリン受容体を介してラット網膜細動脈を収縮させる，日本薬学会第 132 年会，2012. 3. 29，北海道大学（北海道）．

③ 坂本謙司，大木かよ，森麻美，斉藤麻希，中原努，石井邦雄，ドネペジルのラット網膜虚血・再灌流傷害に対する保護効果にはアセチルコリン受容体刺激は関与しない，日本薬学会第 132 年会，2012. 3. 30，北海道大学（北海道）．

④ 坂本謙司，黒木大陽，関谷春菜，渡辺彰宏，森麻美，中原努，石井邦雄，カプサイシンはオピオイド受容体の刺激を介してラット網膜における NMDA 誘発神経細胞死を抑制する，第 85 回日本薬理学会年会，2012.3.16，国立京都国際会館（京都府）．

⑤ 森麻美，武井俊明，森田匡彦，中川智，坂本謙司，中原努，石井邦雄，L-シトルリンは網膜血管を拡張させる，第 85 回日本薬理学会年会，2012.3.16，国立京都国際会館（京都府）．

⑥ 武井俊明，森麻美，森田匡彦，中川智，坂本謙司，中原努，石井邦雄，L-シトルリンは糖尿病ラットにおける網膜血管拡張障害を改善する，第 85 回日本薬理学会年会，2012.3.15，国立京都国際会館（京都府）．

⑦ 中原努，赤沼かおり，及川風花，森麻美，坂本謙司，石井邦雄，β3 アドレナリン受容体刺激薬 CL316243 の網膜神経保護効果，第 85 回日本薬理学会年会，2012.3.15，国立京都国際会館（京都府）．

⑧ 東恵広，森麻美，坂本謙司，中原努，石

井邦雄，I 型糖尿病モデルラットにおける白内障に進行に対するレスベラトロールの効果，第 55 回日本薬学会関東支部大会，2011.10.8，東邦大学薬学部（千葉県）．

⑨ 坂本謙司，黒木大陽，関谷春菜，渡辺彰宏，森麻美，中原努，石井邦雄，視細胞選択的に蛍光タンパク質を発現しているトランスジェニックマウスを用いたカプサイシンの視神経保護効果の評価，第 125 回日本薬理学会関東部会，2011.10.15，日本大学薬学部（千葉県）．

⑩ 奥野由依，森麻美，中原努，坂本謙司，石井邦雄，実験的緑内障モデルにおける SA13353 の視神経保護効果，次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011，2011.8.31，北里大学薬学部（東京都）．

⑪ 青木学一，森麻美，中原努，坂本謙司，石井邦雄，新規冷感過敏試験装置の開発と抗がん剤誘発末梢神経障害動物モデルへの応用，次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011，2011.8.31，北里大学薬学部（東京都）．

⑫ 森麻美，鈴木佐知，坂本謙司，中原努，石井邦雄，EDHF は BKCa チャネルを介してラット網膜血管を拡張させる，次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011，2011.8.31，北里大学薬学部（東京都）．

⑬ 東恵広，森麻美，坂本謙司，中原努，石井邦雄，レスベラトロールの糖尿病性白内障に対する効果，次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011，2011.8.31，北里大学薬学部 （東京都）．

⑭ 関谷春菜，渡辺彰宏，黒木大陽，森麻美，中原努，坂本謙司，石井邦雄，視神経節細胞選択的に蛍光タンパク質を発現しているトランスジェニックマウスを用いたカプサイシンの視神経保護作用の評価，次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011，2011.8.31，北里大学薬学部（東京都）．

⑮ 渡辺彰宏，関谷春菜，黒木大陽，森麻美，中原努，坂本謙司，石井邦雄，ラット NMDA 誘発網膜傷害モデルにおける β-endorphin の視神経保護効果に対する CGRP 受容体拮抗薬の影響，次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011，2011.8.31，北里大学薬学部（東京都）．

⑯ 森麻美，花田真幸，坂本謙司，中原努，石井邦雄，NMDA 誘発緑内障モデルにおける網膜血管反応性の変化，第 124 回日本薬理学会関東部会，2011.6.4，東京大学農学部（東京都）．

⑰ 坂本謙司，黒木大陽，森麻美，中原努，石井邦雄，NMDA 誘発緑内障モデルにおける capsaicin の保護作用：CGRP の関与について，第 124 回日本薬理学会関東部会，2011.6.4，東京大学農学部（東京都）．

⑱ 石井隆之，森麻美，中原努，坂本謙司，石井邦雄，Apocynin preserves retinal cone cell function in a mouse model for recessive retinitis pigmentosa caused by a mutation in the Pde6a gene，第 84 回日本薬理学会年会，2011.3.22，震災のため誌上開催．

⑲ 坂本謙司，黒木大陽，森麻美，中原努，石井邦雄，ニルバジピンは NMDA あるいは NOC12 硝子体内投与誘発網膜傷害モデルラットにおける視神経細胞死を抑制する，日本薬学会第 130 年会，2010.3.28，就実大学（岡山県）．

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
特になし．

６．研究組織
(1)研究代表者
坂本　謙司（SAKAMOTO KENJI）
北里大学・薬学部・講師
研究者番号：80317065