

機関番号： 11101
 研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2009 ～ 2010
 課題番号： 21791662
 研究課題名 (和文) 視細胞変性へのカルパインの関与とその制御による新しい視細胞保護治療法の可能性
 研究課題名 (英文) EFFECT OF CALPAINS ON PHOTORECEPTOR DEGENERATION AND POSSIBILITY OF NEW TREATMENT FOR PHOTORECEPTOR PROTECTION
 研究代表者
 目時 友美 (METOKI TOMOMI)
 弘前大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号： 00400169

研究成果の概要 (和文) : カルシウム結合性タンパク分解酵素であるカルパインが網膜色素変性モデル動物における視細胞変性進行過程でどのように視細胞死に関与するかを研究した。Royal College Surgeon's (RCS)ラットの変性初期にミトコンドリアカルパインが細胞質カルパインの活性上昇に先立って活性が上昇することを発見した。さらに変性初期にカルパイン阻害薬を RCS ラット硝子体中に投与すると視細胞死が特異的に阻害されることを見いだした。

研究成果の概要 (英文) : We studied in this project whether and how calpains, calcium activated proteases, play roles in the photoreceptor apoptosis during retinal degeneration of retinitis pigmentosa model animals. We found that activities of mitochondrial calpains increased in the early stage of retinal degeneration of Royal College Surgeon's (RCS) rats. We also found that intravitreal injection of calpain inhibitors specifically retarded photoreceptor apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：臨床医学

科研費の分科・細目：外科系・眼科学

キーワード：網膜色素変性、カルパイン、視細胞

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性には視細胞のアポトーシスが関与することが知られている。細胞内でアポトーシスを進行させる反応機構としてはカスパーゼ系がよく知られているが、非カスパー

ゼ系酵素群の1つとしてカルパイン系が知られていた。カルパイン系は主に細胞質に存在しているが、ミトコンドリアにも存在していることが明らかにされている。しかし、ミトコンドリアカルパインが細胞死の過程でどの

ような役割を果たしているのかは不明であった。

2. 研究の目的

網膜色素変性モデル動物の網膜変性過程で、細胞質カルパインおよびミトコンドリアカルパインの活性動態を明らかにする。ミトコンドリアカルパインのアポトーシスへの関与の可能性を明らかにする。カルパイン阻害薬が視細胞アポトーシスを抑制できるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

網膜色素変性モデル動物として **Royal College Surgeon's (RCS)**ラットを用いた。弘前大学動物実験倫理委員会の許可を受けて実験を行った。ラット網膜変性の進行過程において細胞質カルパインとミトコンドリアカルパインそれぞれの酵素活性の推移を検討した。ミトコンドリアカルパインがミトコンドリアに通常不活性型として存在しているアポトーシス誘導因子の活性化に関与するか否かを細胞分画法とウェスタンブロット法にて検討した。**RCS**ラット硝子体中にカルパイン阻害薬を投与し、視細胞アポトーシスが抑制されるか否かを **TUNEL**法を用いて検討した。

4. 研究成果

①**RCS**ラットの各週齢において細胞質カルパインとミトコンドリアカルパインの酵素活性をモニターしたところ、3週齢から4週齢という比較的網膜変性の初期段階においてミトコンドリアカルパインの活性が上昇したのに対し、細胞質カルパインは4週齢から5週齢という網膜変性の進行期に活性が上昇した。このことから、視細胞死の比較的初期にミトコンドリアカルパインが関与している可能性が示唆された。

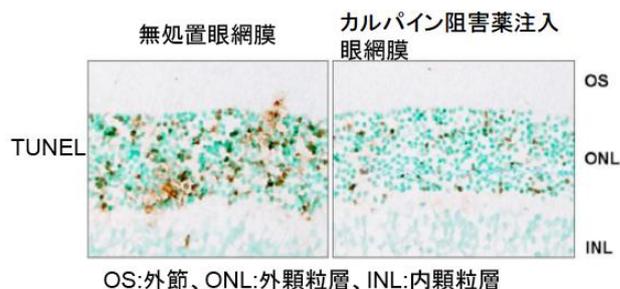
②細胞分画法を用いて野生型 **RCS**ラットからミトコンドリア分画を調整し、試験管内で

培養したところ培養液中にアポトーシス誘導因子が遊離してきたことがウェスタンブロット法にて確認された。この遊離はカルパイン阻害薬を添加した培養液を用いることで抑制された。このことから、ミトコンドリアからのアポトーシス誘導因子の遊離にはミトコンドリアカルパインが関与していることが示唆された。

③**RCS**ラット硝子体中にカルパイン阻害薬を生後3週齢(3週齢群)と4週齢(4週齢群)にそれぞれ別々に投与した。投与後5日で網膜を摘出し **TUNEL**染色にてアポトーシスを半定量的に検索したところ、3週齢群では有意にアポトーシスが抑制されていたのに対し、4週齢群では対照群と有意差はなかった。このことから **RCS**ラット網膜変性ではアポトーシスの少なくとも初期にはカルパインが関与していることが示唆された。

④以上の結果から **RCS**ラットでは網膜変性の初期にミトコンドリアカルパインの活性が上昇しているため、ミトコンドリアカルパインがアポトーシス誘導因子を介してアポトーシスの進行に関与している可能性が示され、今後の網膜色素変性に対する新しい治療法の開発へ向けて研究が前進したとすることができる。

参考までにカルパイン阻害薬を **RCS**ラット硝子体に注入した後の網膜 **TUNEL**染色像を下に示す。カルパイン阻害薬注入後に明らかに **TUNEL**陽性アポトーシス細胞が減少していることが分かる。



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 8 件)

- ① Nakazawa M, Ohguro H, Takeuchi K, Miyagawa Y, Ito T, Metoki T.
Effect of nilvadipine on central visual field in retinitis pigmentosa: a 30-month clinical trial. *Ophthalmologica*, 225 (1): 120-126, 2011.
- ② Takeuchi K, Nakazawa M, Metoki T, Yamazaki H, Miyagawa Y, Ito T.
Effects of Solid Hyaluronic Acid Film on Postoperative Fibrous Scar Formation after Strabismus Surgery in Animals, *J Pediat Ophth Strab*. In press. 2010 Sep 22:1-4. doi: 10.3928/01913913-20100920-02.
- ③ Mizukoshi S, Nakazawa M, Sato K, Ozaki T, Metoki T, Ishiguro S.
Activation of mitochondrial calpain and release of apoptosis-inducing factor from mitochondria in RCS rat retinal degeneration. *Exp Eye Res*. 91: 353-361, 2010.
- ④ Suzuki Y, Suzuki K, Metoki T, Nakazawa M.
Morphological findings of intraocular lens with haptics detached from optics following cataract surgery. *Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging* in press. 2010 Mar 9:1-3. doi: 10.3928/15428877-20100215-75
- ⑤ 山崎仁志、宮川靖博、目時友美、鈴木 香、伊藤 忠、横井由美子、木村智美、中澤 満：トラボプロスト点眼液の点状表層角膜症に対する影響。 *あたらしい眼科* 27(8), 1123-1126, 2010.
- ⑥ 木村智美、石川 太、山崎仁志、目時友美、伊藤 忠、竹内侯雄、中澤 満：各種緑内障手術の成績。 *あたらしい眼科* 26 (9)、1279-1285, 2009.
- ⑦ Takeuchi K, Nakazawa M, Yamazaki H, Miyagawa Y, Ito T, Ishikawa F, Metoki T.

Solid hyaluronic acid prevents postoperative fibrous scar formation in experimental animal eyes. *Arch Ophthalmol* 127 (4): 460-464 2009.

⑧ 伊藤 忠、山崎仁志、横井由美子、目時友美、竹内侯雄、木村智美、中澤 満、楠美智己：内境界膜自然剥離を伴った黄斑円孔症例。 *あたらしい眼科* 26 (12), 1693-1696, 2009.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 目時友美、鈴木幸彦、木村智美、盛 泰子、横井由美子、竹内侯雄、鈴木 香、伊藤 忠、宮川靖博、中澤 満、野田康子。
肥厚性硬膜炎と眼窩先端症候群を呈した症例。第 115 回日本眼科学会総会。東京国際フォーラム。2011 年 5 月 11 日。
- ② 鈴木 香、鈴木幸彦、伊藤 忠、目時友美、中澤 満。
両眼の再発性視神経炎を初発症状とした抗好中球細胞質抗体関連腎炎。第 114 回日本眼科学会総会。名古屋国際会議場。2010 年 4 月 15 日。
- ③ 横井由美子、山崎仁志、目時友美、鈴木幸彦、木村智美、鈴木 香、伊藤 忠、中澤 満、高畑武功、和田龍一、杉田 直。
眼内悪性リンパ腫を契機に発見された T 細胞リンパ腫の 1 例。名古屋国際会議場。2010 年 4 月 15 日。
- ④ 中澤 満、大黒 浩、山崎仁志、目時友美、宮川靖博、伊藤 忠、竹内侯雄、横井由美子。
ニルバジピンの網膜色素変性の中心視野進行への影響。第 64 回日本臨床眼科学会。神戸国際会議場。2010 年 11 月 12 日。
- ⑤ 中澤 満、大黒 浩、山崎仁志、目時友美、宮川靖博、伊藤 忠、竹内侯雄、横井由美子。
ニルバジピンの網膜色素変性に対する進行遅延効果。第 63 回日本臨床眼科学会。福岡国際会議場。2009 年 10 月 9 日。
- ⑥ 竹内侯雄、蝦名祐一、山崎仁志、宮川靖博、伊藤 忠、目時友美、横井由美子、中澤 満。

トレハロースによる結膜および皮膚線維芽細胞の抑制効果について. 第 113 回日本眼科学会総会. 東京国際フォーラム. 2009 年 4 月 16 日.

[図書] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

目時友美 (METOKI TOMOMI)

弘前大学医学部附属病院・講師

研究者番号: 00400169

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

研究者番号: