

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462702

研究課題名(和文) ユビキチンプロテアソーム機能低下による網膜変性の解析

研究課題名(英文) Analysis of retinal degeneration caused by dysfunction of ubiquitin proteasome system

研究代表者

野田 実香 (NODA, Mika)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：10296668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年の研究はユビキチンプロテアソーム系機能不全がアルツハイマー病などの全身性神経変性疾患に関与していることを明らかとしてきた。眼科領域では、網膜色素変性が進行性の視細胞変性を特徴とする網膜神経変性疾患である。それ故、ユビキチンプロテアソーム系機能不全が網膜色素変性を惹起するかは興味深い点である。

本研究ではプロテアソーム機能不全マウス(5t-Tg mice)を用いて、同機能不全が網膜変性と視細胞死を引き起こすこと、視細胞はプロテアソーム機能不全に対して非常に脆弱性を有することを明らかとした。本検討結果は、網膜色素変性の病態における機能不全の影響について興味深い疑問を投げかけるものであった。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have revealed that ubiquitin proteasome system (UPS) dysfunction is involved in the pathogenesis of systemic neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. In ocular diseases, retinitis pigmentosa (RP) is a heterogeneous group of inherited retinal neurodegenerative disorders characterized by progressive degeneration of photoreceptors. Therefore, whether impairment of UPS function also causes RP has been of great interest.

In the present study, using an animal model of decreased proteasomal activity (5t-Tg mice) we demonstrated that i) decreased function of proteasome causes retinal degeneration in vivo, largely attributed to photoreceptor cell death, and ii) photoreceptor cells are vulnerable to the functional disturbance of proteasome in the retina. The current data raise an interesting question regarding the impact of proteasome dysfunction in the pathogenesis of RP.

研究分野：眼科

キーワード：プロテアソーム 網膜色素変性

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性 (RP) は、視細胞、網膜色素上皮細胞が原発性に障害される遺伝性疾患である。発症の時期は一般的に20-40歳代であり、約4000人に一人の発症とされる。視機能障害は、初期に夜盲を自覚することから始まり、病期の進行とともに周辺部視野異常が出現し、やがて視野狭窄は視力低下へと変化するというケースが多い。視力低下および周辺視野狭窄などの視機能低下が徐々に出現すること、そして遺伝性疾患であることがもたらす患者の人生における心的ストレス、そして実生活上の負担は計り知れない。しかしながら、現時点で本症に対する有効な治療手段は確立されておらず、またその病態の詳細についても不明な点が多い。本症の病態解明ならびに介入手段を開発することは眼科医の重要な責務である。

RPの原因となる遺伝子異常はこれまで数多く報告されており、常染色体優性の遺伝形式をとるRP (autosomal-dominant RP, ADRP) においてはその約25%がロドプシン遺伝子の異常であるとされる [Hartong DT et al. Lancet. 2006]。ロドプシンは、網膜の桿体細胞外節に存在する蛋白であり、ポリペプチドであるオプシンと11-シス-レチナールが結合したものである。光子によってその11-シス-レチナールがオールトランスレチナールに異性化されることによってオプシンの構造が変化し、会合しているGタンパク質が活性化されて光受容の情報伝達がおこなわれる。

近年の研究によって、このロドプシンの遺伝子異常による変異ロドプシン蛋白の蓄積がADRPの原因となることがわかってきた。例えば、ADRPの原因遺伝子として最初に発見されたロドプシンのPro23His (P23H) 変異では、ロドプシンのフォールディング過程に異常が生じて小胞体に変異ロドプシンが蓄積することが明らかとなっている [Sung CH et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991]。小胞体における蛋白質の三次元構造形成過程をフォールディングと呼ぶが、遺伝子変異によってフォールディング異常を生じた変異ロドプシンは小胞体からゴルジ体に輸送されず、異常なジスルフィド結合や凝集体・封入体の形成をおこなうことによってADRPの発症に関与すると考えられている。RPはアルツハイマー病やパーキンソン病と同様の神経変性疾患とされる。これらの疾患においては異常蛋白の凝集体が神経細胞に蓄積することによって神経細胞死が引き起こされることから、RPにおいても同様のメカニズムの存在が推定される。

プロテアソームはユビキチンシステムと連動してユビキチン化蛋白の分解を制御・実行する複合体であり、細胞周期、DNA修復、蛋白質の品質管理、ストレス応答、免疫応答などの多様な生命現象に関与している。このプロテアソームは20Sプロテアソームと19S複合体からなるが、その20Sプロテアソームに含まれる $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ のサブユニットが蛋白分解

を担っている。プロテアソーム機能低下にともなう異常蛋白蓄積と疾患病態の関係は大変興味深い研究テーマだが、これらのサブユニット $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ をノックアウトすると胎生致死となるためその検討は困難であり、これまであまりよい動物モデルもなかったというのが実情である。

研究分担者の外丸詩野ら (北海道大学) は、胸腺に発現する比較的酵素活性の弱いプロテアソームサブユニット $\beta 5t$ を全身発現させた遺伝子導入マウス ($\beta 5t$ -Tgマウス) を作成し、その結果としてプロテアソーム機能低下マウスモデルを確立した。ヒトでは加齢にともないプロテアソーム機能が低下することが知られているが、当該 $\beta 5t$ -Tgマウスでも背骨の彎曲や皮下脂肪量の低下等、老化に伴う表現型を伴った短寿命を生じること、またユビキチン化タンパク質や酸化変性タンパク質が増加していることが明らかとなっている [Tomaru U et al. Am J Pathol 2012]。この「変異蛋白の蓄積」は、 $\beta 5t$ -Tgマウスの網膜にRP様の変化を生じる可能性を示唆していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、 $\beta 5t$ -Tgマウスを用いてプロテアソーム機能低下による眼底異常を解析してヒトにおけるRPとの共通点を調べること、またその変性機序を明らかとして同疾患モデルとしての有用性を検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 眼底変化の観察

さまざまな週齢の $\beta 5t$ -Tgの網膜変化を観察する。眼底変化を経時的に調べるため、またその発症時期を知るために生後1、3、6、9ヶ月の時点での眼底検査をおこない、RPに類似した眼底所見の有無を検討した。

(2) 網膜厚の測定

RPではまず桿体細胞の外節や内節が変性した後に視細胞の核が存在する外顆粒層の配列が乱れ、その後から核は徐々に減少して外顆粒層が菲薄化することが知られている。

$\beta 5t$ -Tgマウスにおける神経網膜組織の組織学的変化を経時的に調べるために、またその発症時期を知るために生後1、3、6、9ヶ月の時点での網膜厚を定量的に評価した。

(3) 電子顕微鏡を用いた観察

電子顕微鏡を用いてヒトADRPの神経網膜組織を観察した過去の検討によれば、(1) 桿体細胞が錐体細胞に比して早期に傷害される、

(2) 光学顕微鏡では正常である網膜色素上皮細胞にリポフスチンの蓄積やメラニンの消失などの変化が認められたとの記述がある [Kolb H et al. Invest Ophthalmol. 1974]。

電子顕微鏡を用いて $\beta 5t$ -Tgマウスにおける視細胞の超微細構造を観察した。

(4) 網膜電図による機能評価

ヒトRPでは網膜の機能的評価法である網膜電図が初期から低下、進行例では消失する [Hartong DT et al. Lancet 2006]。β5t-Tgにおいても同様の機能的異常を生じるかを経時的に調べるために、生後3ヶ月および9ヶ月の時点での網膜電図を定量的に評価した。

(5) 視細胞死の検討

ヒトRPではアポトーシスによる視細胞死を生じることが知られている。β5t-Tgにおいても同様の変化を生じるかを経時的に調べるために、生後1、3、6、9ヶ月の時点での神経網膜組織を用いてTUNEL染色をおこない、視細胞死を定量的に評価した。

4. 研究成果

(1) 眼底変化

β5t-Tg マウスの眼底検査では白点が眼底に多発し、ヒト網膜色素変性でみられるような網膜萎縮や網膜動脈の狭細化が認められ、週齢とともに増加した。

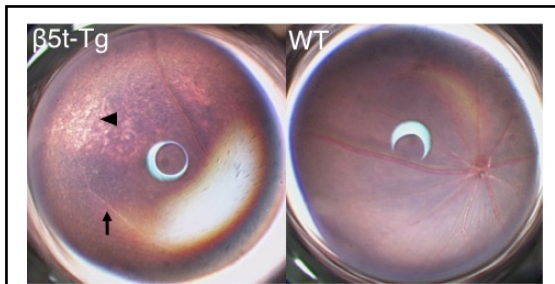


図1：眼底検査

24週齢のマウスにおける比較。β5t-Tgマウスでは、網膜萎縮(矢頭)や網膜血管の狭細化(矢印)が生じる。

(2) 網膜厚の測定

網膜の組織学的検討では、視細胞の核が集合している外顆粒層の厚さがβ5t-Tgマウスで経時的に有意に菲薄化していた。一方、網膜内層にある内顆粒層の厚さは保たれていた。

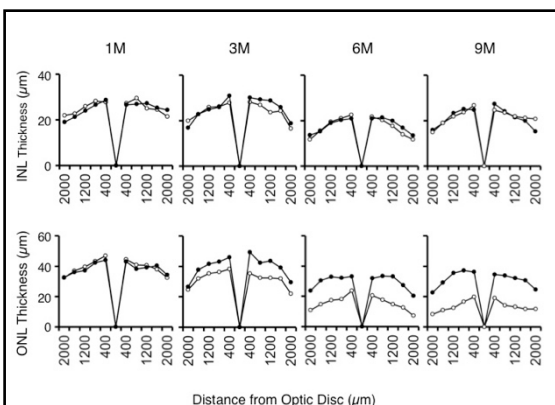


図2：網膜厚変化

β5t-Tgマウスでは、野生型と比較して外顆粒層(ONL)が菲薄化していた。

(3) 電子顕微鏡を用いた観察

β5t-Tgマウスにおける視細胞の超微細構造について電子顕微鏡を用いて検討したが、野生型マウスのそれと比較して、ヒトADRPで報告されている変化は認められなかった。

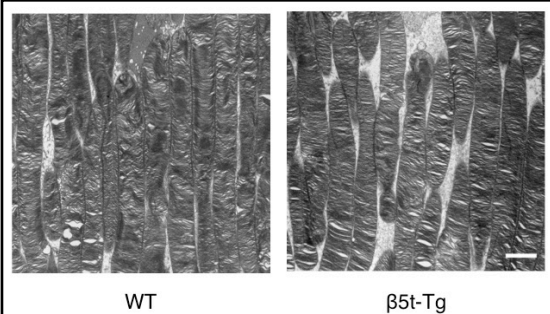


図3：視細胞超微細構造(24週齢)

両者に顕著な差は認められなかった。

(4) 網膜電図による機能評価

網膜電図検査では視細胞のうち桿体細胞での機能低下を示したが、錐体細胞では差がなかった。

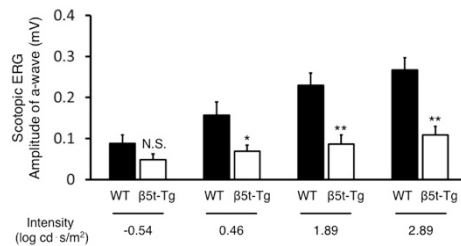


図4：網膜電図(24週齢)

桿体細胞機能を反映する暗順応網膜電図ではβ5t-Tgマウスで有意な低下を認めた。

(5) 視細胞死の検討

TUNEL染色による細胞死の評価では、β5t-Tgマウスの外顆粒層に陽性細胞を有意に多く認めた。

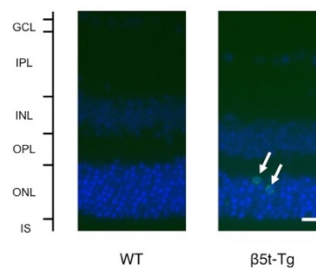


図5：TUNEL染色(12週齢)

β5t-Tgマウスの外顆粒層に陽性細胞陽性細胞(矢印)を有意に多く認めた。

今回の検討で、視細胞関連タンパク質の遺伝子変異・蓄積がなくてもプロテアソーム機能が低下すると *in vivo* で視細胞死による網膜変性を惹起することが明らかとなった。我々の知りうる限り、この報告は *in vivo* で網膜におけるプロテアソーム機能障害について検討した初めての報告である。プロテアソームの機能の低下は、パーキンソン病患者の黒質やアルツハイマー病患者の海馬・海馬傍回で報告されている。したがって、プロテアソーム機能障害が網膜色素変性などの眼における神経変性を生じることが十分考えられ、今回の検討結果はこの仮説を支持するものであった。しかしながら、今回の検討ではヒト ADRP で報告されている視細胞の超微細構造変化を $\beta 5t$ -Tg マウスでは確認できておらず、プロテアソーム機能低下による網膜神経変性のメカニズムとヒト ADRP におけるその相違についてはさらなる検討が必要と考えられた。

今回の研究から得られた新知見は、網膜におけるプロテアソーム機能不全は視細胞変性を誘導するということである。日本人の中途失明原因 3 位である網膜色素変性には原因遺伝子が不明なものが多く存在しており、プロテアソーム機能不全がその病因の一部であるかもしれない。今後さらに検討を重ねる予定である。

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 4 件)

1. 安藤 亮、野田航介、外丸詩野、鴨下 衛、小澤洋子、納富昭司、久富智朗、野田実香、神田敦宏、石橋達朗、笠原正典、石田 晋. 感覚網膜におけるプロテアソーム機能不全の影響. Best articles of the year. 北海道医学雑誌. 90: 136, 2015
2. Ando R, Noda K, Tomaru U, Kamoshita M, Ozawa Y, Notomi S, Hisatomi T, Noda M, Kanda A, Ishibashi T, Kasahara M, Ishida S. Decreased proteasomal activity causes photoreceptor degeneration in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014; 55: 4682-4690.
doi: 10.1167/iovs.13-13272
3. Kase S, Noda M, Yoshikawa H, Yamamoto T, Ishijima K, Ishida S. Oxidative stress in the levator aponeurosis in Asian involutional blepharoptosis. Ophthalm Plast Reconstr Surg. 2014; 30: 290-294
doi: 10.1097/IOP.0000000000000090
4. Kinoshita S, Kase S, Ando R, Dong Z, Fukuhara J, Dong Y, Takashina S, Noda K, Noda M, Kanda A, Ishida S.

Expression of vascular endothelial growth factor in human ocular adnexal lymphoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014; 55: 3461-3467
doi: 10.1167/iovs.13-13510

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 実香 (NODA, Mika)
北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号: 10296668

(2) 研究分担者

野田 航介 (NODA, Kousuke)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 90296666

外丸 詩野 (TOMARU, Utano)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 20360901

小澤 洋子 (OZAWA, Yoko)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師
研究者番号: 90265885