

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20284

研究課題名(和文) SIRT3による加齢性網膜病態の抑制メカニズム

研究課題名(英文) Role of SIRT3 in age-related retinal diseases

研究代表者

内田 敦郎 (Uchida, Atsuro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：70365336

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)：SIRT3ノックアウトマウスの網膜における解析は60週齢に至るまで解析したが、明らかな表現型は検出されなかった。しかしながら、光照射後の網膜変性は野生型におけるものと比べて明らかに重篤であった。その際にはより多くの活性酸素種が組織内に蓄積し、ミトコンドリアの電子顕微鏡における形態の異常を伴っていた。

研究成果の概要(英文)：SIRT3 knock out mice showed no obvious phenotype in the retina until 60 weeks old. However, they showed more severe light induced retinal degeneration compared with wild type mice. The levels of reactive oxygen species were higher and mitochondria had abnormality detected by electron microscopy after light exposure in the knock out mice.

研究分野：網膜

キーワード：網膜 老化 光 酸化ストレス ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化社会においては、健康長寿への期待は大きい。すなわち、加齢に伴う生理的变化にせよ病的変化にせよ、生活の便利さを損なう変化は抑制したいという希望が強い。そのため老化研究に対する関心は一般でも研究者の間でも大きなものがある。

これに光明を投げかけたのは酵母において示された、Sir2 (Imai, Guarente et al. 2000 Nature)が寿命延長に働いたという報告である。それ以来、その哺乳類におけるホモログである SIRT1 は長寿遺伝子と呼ばれ、老化の研究で大きく注目を集めている。実際に、Sirtuins の中でも SIRT1 についてはよく研究され、そのノックアウトマウスでは胎生致死になるばかりか、眼でも発生中の網膜細胞に異常が出るという激しい表現型が出る事が報告されている (Cheng et al. PNAS 2003)。しかし、SIRT3 を含む他の Sirtuin ファミリー分子の役割には未知の部分が多い。Sirtuin ファミリー分子には SIRT1 から SIRT 7 までがあるが、その細胞内局在や酵素活性が異なることから、様々な役割を果たしていると考えられる。

Human sirtuin	Subcellular localization	Enzyme activity	Biology
SIRT1	Nucleus (cytosol)	Deacetylase	DNA stability and cell proliferation (DNA double-strand break repair)
SIRT2	Cytosol	Deacetylase	Mitosis and cell differentiation (modulation of microtubule network)
SIRT3	Mitochondria	Deacetylase	Energy metabolism and responses to oxidative stress (ATP level)
SIRT4	Mitochondria	ADP-ribosyltransferase	Energy metabolism and responses to oxidative stress (insulin secretion)
SIRT5	Mitochondria	Deacetylase	Energy metabolism and responses to oxidative stress
SIRT6	Nucleus	ADP-ribosyltransferase, deacetylase	DNA stability and cell proliferation (DNA single-strand break repair)
SIRT7	Nucleus	Deacetylase	DNA stability and cell proliferation

Ozawa et al. 2010

視覚は外部刺激の 80% を受容するといわれ、高齢者においても視覚維持の重要性は高い。加齢に伴い進行する加齢性疾患に加齢黄斑変性や糖尿病網膜症があり、いずれも失明原因の上位である (若生ら 日本眼科学会雑誌 2014)。これらでは加齢による網膜内分子発現の変化が、その病態を助長すると考えられている。さらに、たとえ眼疾患に罹患しなくても、高齢になるにしたがって網膜視細胞が徐々に減少することが知られている (Curcio et al.

Investivative Ophthalmol Vis Sci 1993)。視覚障害をこうむると、個人の活動が制限され社会的労働力が減少するばかりか、介護者の活動も制限されることから、視覚不良の高齢者が増加することは、大きな社会問題となる。

網膜は光を受容し、電気信号に変換して神経活動を起こさせる組織であり、エネルギー代謝が盛んであることが知られる。すなわち、エネルギー産生が盛んであり網膜にはミトコンドリアが多数存在することが知られる。その数と質の維持が網膜の機能に關与することは疑う余地がない。また、研究室ではこれまでにすでに Sirtuins (SIRT1-7)の網膜内発現に関する研究をし、SIRT3 が網膜で高い発現量を持つことを報告した (Ban, Ozawa et al. Exp Gerontology 2013)。そこで、本研究ではミトコンドリアに局在する SIRT3 の網膜における臓器保護的な役割を、加齢性網膜病態を念頭に解析することとした。ミトコンドリアという生命活動に重要な細胞内小器官あるにもかかわらず、SIRT3 の役割には不明の点が多い。一般的には SIRT3 ノックアウトマウスは表現型に乏しいとされてきた。とはいえ、近年、加齢性聴覚低下をカロリー制限で抑制する経路には、SIRT3 が必要であることが報告された (Someya et al. Cell 2010)。

このほか、心筋梗塞 (Zeng et al PLoS One 2014、Porter et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2014)の予後に SIRT3 が關連することが報告され、加齢や加齢性疾患、あるいは一定のストレス下においては、SIRT3 が重要な役割を果たすことが明らかであると予測された。なお、ミトコンドリアには SIRT3 の他に SIRT4 および SIRT5 が存在して協調的に作用しうる可能性が示されている (Lin, Apte et al. Cell Rep. 2016)。

本研究の結果により SIRT3 の眼における役割が明らかになれば、将来的に、SIRT3 を標的とした加齢性網膜病態に対する新規治療法の開発が可能になると考えられた。そして、高齢者の視覚の健康を維持することにつながり得ると考えられた。そのための研究を開始

することとした。

2. 研究の目的

長寿遺伝子と言われる Sirtuins の中でも、ミトコンドリアに局在する SIRT3 の生体網膜内での役割を、加齢性網膜病態との関連を中心に解析する。SIRT3 ノックアウトマウスを用いて、加齢や加齢性疾患に関連するストレス刺激下の網膜での SIRT3 の役割を解析する。また、加齢や加齢性疾患モデルにおける SIRT3 の網膜内発現を解析する。網膜にはミトコンドリアが豊富にあり、エネルギー代謝が盛んに行われるとされ、網膜での SIRT3 の役割の重要性は予想に難くない。本研究により SIRT3 の網膜での役割がわかれば、加齢性網膜病態に対する SIRT3 を標的とする新規治療法の開発につながる。

3. 研究の方法

SIRT3 ノックアウトマウスの表現型について、経時的に組織学的解析を行った。Sirutins が老化に関わる分子であることを鑑み、ノックアウトマウスは 10 週齢から解析をはじめ、60 週齢というマウスにおいては高齢までの解析を行った。光学顕微鏡による網膜切片の解析のみならず、電子顕微鏡による解析も行った。さらに網膜電図の測定により機能的解析を行った。網膜電図 (electroretinogram; ERG 図) は人にも使われる手法であり、客観的視機能を解析するためにマウスモデルでも用いられる手法である。網膜電図はマウスの眼球にコンタクトレンズ型の電極を載せることで測定できる。



図 網膜電図(ERG)測定装置。

次に、本ノックアウトマウスに光照射を行いストレスを与えたうえでの組織学的・機能的解析を行った。老化は各種ストレス、殊に酸化ストレスの蓄積により引き起こされる変化であることはこれまでに示されており、その負荷を急性で与えることにより、組織の変化が促進されると考えられた。そこで、光照射という負荷の下、網膜に生じる変化を分子レベルで解析した。光照射については専用ケージを用いてこれまで報告された方法と同様に行なわれた (図) (Kurihara, Ozawa et al. *Mol. Vis.* 2009, Kubota Ozawa et al. 2010, Narimatsu, Ozawa et al. *Free Radical Biol Med*, 2014)。



図 光照射ケージ
全面金属反射材張り。空調設備有。

そして、その際の組織内活性酸素種の蓄積及び酸化ストレスの影響についての解析を行った。SIRT3 が発現するミトコンドリアにおいては、ATP 産生のために細胞内呼吸が盛んに行なわれ、その過程で生じる活性酸素種が組織障害を引き起こしうるが、これを、SIRT3 が抗酸化酵素の亢進を通じて抑制しうるということが予測に難くないことであつたからである。そのメカニズムには、SIRT3 がミトコンドリアで作用する superoxide dismutase 2 の発現や作用を促進することが既に知られているからである (Someya et al. *Cell* 2010)。酸化ストレスの影響としては、小胞体ストレスに着目して解析した。その方法として、リアルタイム RT-PCR 等の手法を用いた。

さらに、培養細胞株を用いて SIRT3 ノックダウンの系を用いた解析が行なわれた。ノックダウンについては siRNA を用いて

行われた。そして酸化ストレスレベルを解析すると共に、superoxide dismutase 2の発現について、リアルタイム RT-PCRにより解析された。

4. 研究成果

SIRT3 ノックアウトマウスの解析は通常コンディション下で飼育したものを、60週齢に至るまでサンプル採取し、光学顕微鏡を用いた組織学的なデータおよび、網膜電図のデータを示した。なお、この SIRT3 ノックアウトマウスは C57/B6 バックグラウンドにより準備されたものであった。

次いで行われた光照射の実験結果であるが、光照射後には、野生型においてはほぼ障害がみられない程度の刺激条件を決定したのちに、その条件下における SIRT3 ノックアウトマウスにおける障害の程度を明らかにした。C57/B6 バックグラウンドおよび、より光照射の影響を受けやすい Balb/c バックグラウンドの動物を用いた実験を行った。すなわち、両方のバックグラウンドにおいて網膜電図を記録し、Balb/c バックグラウンドの動物では、ヘマトキシリンエオジン染色による視細胞層の観察を行った。また両方のバックグラウンドにおいて TUNEL アッセイを用いたアポトーシス細胞の数の計測を行った。光照射後の TUNEL 陽性細胞は視細胞層にのみ出現し、これまでの光照射実験と合致した(Kurihara, Ozawa et al. *Mol. Vis.* 2009, Kubota Ozawa et al. 2010, Narimatsu, Ozawa et al. *Free Radical Biol Med*, 2014)。

また、この時、より多くの活性酸素種が網膜組織内に蓄積しているかが示された。組織内酸化ストレスに関してはこれまでも研究室で行われてきた dihydroethidium (DHE) を網膜切片に対して用いた方法(Sasaki, Ozawa et al. 2010, Yuki, Ozawa et al. 2010, Yuki, Ozawa et al. 2011)を用いて示した。

また、小胞体ストレスのマーカーをリアルタイム RT-PCR を用いて解析した結果を比較検討した。

そして、培養細胞を用いた解析において

は、SIRT3 をノックダウンすると酸化ストレスが増強するかどうか、およびその過程で superoxide dismutase 2 の発現低下があるかどうかを示した。superoxide dismutase 2 は抗酸化酵素であるため、その発現低下は、酸化ストレス増強につながりうる。

老化には細胞代謝は重要であり、代謝に重要な役割を果たすミトコンドリアに発現する SIRT3 の網膜における役割は、網膜および視機能の老化における役割を示すことにつながり、今後も重要な課題と言えるであろう。さらなる解析が必要とされることは言うまでもない。今回の結果は現在論文投稿中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田敦郎 (UCHIDA Atsuro)
慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：
70365336

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

該当なし ()