

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20329

研究課題名(和文) 光ストレスによる網膜のミトコンドリア障害と細胞死

研究課題名(英文) Light-induced mitochondria damage and cell death in the retina

研究代表者

戸田 枝里子(Toda, Eriko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員

研究者番号：90722992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：暗順応後の6週齢のBalb/c雄マウスに対し光照射を行い、誘導される細胞死をTUNELアッセイにより解析したところ、2日後に視細胞でのみアポトーシスが亢進していた。TUNEL陽性反応はDapiで示される核にあったため、染色性の妥当性を確認することができた。ミトコンドリアに作用する抗酸化剤を投与し、同様の光照射を行い、アポトーシスについて解析した。現時点までには、アポトーシス細胞に対する明らかな影響は示されていない。

研究成果の概要(英文)：Six-week old Balb/c male mice were exposed to the light after dark adaptation, and the cell death in the retina was analyzed using TUNEL assay. The TUNEL positive and apoptotic cells were increased only in the photoreceptor layer 2 days after light exposure. The TUNEL staining was positive in the nuclei which were defined by the staining with Dapi. The mice were treated with an antioxidant, which is supposed to affect mitochondria, before light exposure to analyze the effects on the apoptosis, although the significant effect was not detected.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜 ミトコンドリア 光障害

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症は日本でも世界でも4000-8000人に1人に認められ、進行性の視野障害を呈する疾患である。遺伝子変異により引き起こされ、中年以降の発症が多く、最終的には失明に至りうる。国内失明原因の第3位である。本疾患は遺伝子異常が原因であり、有効な治療法は国内・海外共に確立されていない。早期発見をされた症例でも、特別な進行予防法がないまま、経過観察される。近年では疾患 iPS 研究などにより研究への機運は上がってきたが、神経細胞の移植には移植細胞の生存や生着、シナプス形成等の課題が多い。また、遺伝子治療についても研究は進められ、一部で臨床研究が行われているが、loss of function の補填は行われるものの、gain of function による変性の解決法については、未だ見出されていないのが実情である。すなわち、未だ実現可能な治療法は報告されていない。

一方で、多くの症例で、光暴露により病態が増悪することが知られている。光暴露は健常人でも網膜障害を引き起こしうるが、網膜色素変性症では網膜が脆弱であり、特に問題視される。現代社会では屋外および屋内共に光に暴露する機会が増加しその影響は無視できない。古くから光障害に対する防御として遮光眼鏡が処方される。しかし、網膜色素変性症では疾患に基づく視覚不良があり、光を遮ることはさらに見づらくなるにつながることから、必ずしもすべての患者で受け入れられるわけではない。

当研究室では、これまで様々な網膜疾患モデルマウスを用いて、その病態解明を行ってきた。その中で、網膜光照射モデルでは網膜視細胞層が菲薄化し、光による網膜障害のメカニズムに酸化ストレスが含まれることを示した(Osada Ozawa et al. PLOS One 2017, Narimatsu Ozawa et al. Free Radical Biol Med 2014)。一方で、光障害ではミトコンドリアの障害が生じ得ることが、ミトコンドリア DNA の分解のデータにより報告されている(Grimm et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001)。

酸化ストレスを抑制するための抗酸化剤には、N-acetyl-cysteine (NAC) やルテインやレスベラトロール等、数多くあるが、ミトコンドリアに直接作用するものに MitoQ10 がある (Murphy & Smith Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007)。これはミトコンドリア内膜に存在して、lipid peroxidation を抑制することで活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) による脂質二重膜への病的影響を抑制する。さらに、ミトコンドリアのカルシウムイオンの排出を抑えて、ミトコンドリア内のカルシウムイオンのホメオスタシスを保つ作用があることが報告されており、これは抗酸化作用とは別に働きうるということが報告された (Leo et al. Ann N Y Acad Sci 2008)。そこで、MitoQ10 を用いて、光障害におけるミトコンドリアへの影響とそれによる視細胞死のメカニズムを明らかにする。ミトコンドリアで産生された ROS はミトコンドリアに対して障害を与えるばかりか、ミトコンドリアから流出して細胞全体に障害を与える可能性がある。また、ミトコンドリア障害自体が、細胞のエネルギー確保に支障をきたすため、細胞死の原因となりうる。

Lipid peroxidation は不飽和脂肪酸にしばしば影響を与えることが知られ、網膜視細胞には不飽和脂肪酸がふんだんに存在することが知られる。そこで、MitoQ10 が網膜視細胞保護に働く可能性は高いと考えられた。なお、MitoQ10 は既に、パーキンソン病や Friederich 病に対して臨床試験が行われており、臨床応用に近い位置にある (Murphy & Smith Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007)。

2. 研究の目的

網膜色素変性症に対する薬剤介入の開発は世界的に待たれるものの、現時点では有効な手段が見出されていない。いくつかの薬剤については臨床試験が行われたものの、実際に承認に至ったものはない。その原因の一つは、様々な遺伝子変異が混在することもある。一つ一つの遺伝子変異により、病態のメカニズムが異なることから、画一的治療法が効きにくい可能性がある。しかし、光暴露が病態を悪化させることは、一般的によく知られる。このメカニズムに対する介入により、網膜色

素変性症の進行を抑制することができれば、比較的多くの患者に共通の治療を開発する可能性につながることになる。

そこで、本研究では、光暴露による網膜変性の進行のメカニズムを解析し、網膜色素変性症の新規進行予防治療法につなげることを目的とする。

遺伝子異常があっても網膜異常が進行しないための新規治療法となる。

網膜光照射マウスに対して MitoQ10 を用いることで、視細胞死の抑制が可能であるかを解析する。これにより、MitoQ10 が網膜色素変性症の進行予防に対する新規治療法の候補となり得るかを解析することとした。

3. 研究の方法

研究代表者はまず、光照射モデルマウスを製作した。アルビノである Balb/c マウス、6 週齢の雄を 12 時間明所、12 時間暗所のサイクルのもとで飼育し、その後、暗順応直後に一定の照度の光源に一定時間、暴露することで、視細胞のアポトーシスを誘導する方法を用いた。Balb/c マウスは、光暴露に対して脆弱であり、これまでの光照射実験の報告では基本的にこれが用いられている。この系はすでに研究代表者の所属する研究室で確立され論文発表も行った方法である (Kurihara, Ozawa et al. Mol. Vis. 2009, Narimatsu, Ozawa et al. Free Radical Biol Med, 2014) (図 1)

本研究では従来通り、通常の明暗 12 時間ごとのサイクルのケージで数日飼育したのちに、MitoQ10 もしくはコントロール溶媒を腹腔内投与し、12 時間暗順応ケージに入れ、その直後の朝 9 時に専用光照射ケージに移して 3000lux 1 時間の照射を行った。このケージは上方の光源の部分以外は全面鏡張りで、床敷きは入れず、マウスが確実に光に暴露するようになっている。ケージ内の一つの区画にマウスは 1 匹のみ入れられており、個体同士が重なって光をよけるようなことはないように配置した。また、光を当てても気温が変わらないように温度調整ができる機能がある。



図 1 光照射ケージ。
全面金属反射材張り。空調設備もついている。

光照射を終えたマウスは通常の明暗 12 時間ごとのサイクルのケージに戻し、時間を追って眼球をサンプリングし、光障害モデルの網膜を摘出し、新鮮な網膜切片を作成した。

網膜切片はアポトーシスを検出する terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay キットを用いて解析した。4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) による核染色を併用した。TUNEL 陽性反応が核で生じていれば、染色性の妥当性が確認可能となる。

また、網膜機能については網膜電図 (Electroretinogram; ERG) を用いた解析を行った(図 2)。ERG は、光を当てた時の電位をコンタクトレンズ電極により取得することで、視機能を客観的に評価する方法であり、ヒト臨床およびマウス実験のいずれにおいても用いることが可能である。



図 2 網膜電図の測定

4. 研究成果

光照射後の網膜サンプルでは、照射後2日目にTUNELアッセイにより検出されるアポトーシス細胞の、視細胞層での増加がみられた。そこで、MitoQ10投与群、コントロール溶媒投与群でのアポトーシス細胞の数を解析した。この時TUNEL陽性反応はDapiで示される核にあったため、染色性の妥当性を確認することができた。また、アポトーシス細胞は視細胞層のみで見られ、他の層では見られないことが明らかとなった。

アポトーシス細胞の数であるが、予測に反して、MitoQ10群ではコントロール溶媒群と比べて光照射後のアポトーシス細胞の数を増加する傾向にあった。

次にERGであるが、まず、ERGは光照射後2日から低下し始め4日では明らかな低下があらることが明らかとなった。

光照射2日目のERGについては、今回の実験では、MitoQ10群ではコントロール溶媒群と比べて光照射後のERGの反応が低下する傾向があった。

今回の研究で、現時点では予測と異なる結果が得られており、そのメカニズムは今のところ不明であるが、興味深いところである。むしろ、新規の治療戦略に結びつく可能性を秘めていると考え、引き続き研究を進める予定である。

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 5件)

1. Ban N, Ozawa Y, Osada H, Jonathan B. Lin, Toda E, Watanabe M, Yuki K, Kubota S, Rajendra S. Apte, Tsubota K. Neuroprotective role of retinal SIRT3 against acute photo-stress. npj Aging and Mechanisms of Disease. 2017 Dec 4; 3:19. 査読有 doi:

10.1038/s41514-017-0017-8.

2. Osada H, Okamoto T, Kawashima H, Toda E, Miyake S, Nagai N, Kobayashi S, Tsubota K, Ozawa Y. Neuroprotective effect of bilberry extract in a murine model of photo-stressed retina. PLOS ONE. 2017 Jun 1;12(6):e0178627 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0178627.
3. Kamoshita M, Toda E, Kobayashi S, Tsubota K, Osada H, Ozawa Y. Lutein acts via multiple antioxidant pathways in the photo-stressed retina. Sci Rep. 2016 Jul; 22; 6:30226. 査読有 doi: 10.1038/srep30226.
4. Kamoshita M, Fujinami K, Toda E, Tsubota K, Ozawa Y. Neuroprotective effect of activated 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase on cone system function during retinal inflammation. BMC Neurosci. 2016 Jun; 17:32. 査読有 doi: 10.1186/s12868-016-0268-5.
5. Hirasawa M, Takubo K, Osada H, Miyake S, Toda E, Endo M, Umezawa K, Tsubota K, Oike Y, Ozawa Y. Angiotensin-like protein 2 is a multistep regulator of inflammatory neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. J Biol Chem. 2016 Apr; 291(14):7373-85. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M115.710186.

〔学会発表〕(計 6件)

1. 川島弘彦, 岡本知大, 戸田枝里子, 長田秀斗, 鴨下衛, 永井紀博, 篠田肇, 坪田一男, 小沢洋子. 光照射直後の網膜における酸素消費速度(OCR)の低下. 第56回日本網膜硝子体学会. 2017.
2. 長田秀斗, 岡本知大, 川島弘彦, 戸田枝里子, 小林沙織, 坪田一男, 小沢洋子. 光障害に対するビルベリーエキスの網膜保護効果. 第17回日本抗加齢医学会総会. 2017.
3. Kawashima H, Osada H, Toda E, Okamoto T, Kamoshita M, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y. Neuroprotective role of activated AMPK against light-induced

photoreceptor cell death. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2017.

4. Kamoshita M, Osada H, Toda E, Sano K, Kawashima M, Nagai N, Shinoda H, Tsubota K, Ozawa Y. Aerobic exercise protects retinal function in type 2 diabetic mice. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2016.
5. Okamoto T, Kamoshita M, Osada H, Toda E, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y. The neuroprotective effect of rapamycin as a modulator of the mTOR-NF- κ B axis during retinal inflammation. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2016.
6. Kawashima H, Osada H, Toda E, Okamoto T, Kamoshita M, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y. AMPK activation protects photoreceptors from light-induced degeneration. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2016.

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

戸田 枝里子 (TODA, Eriko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員

研究者番号: 90722992

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

小澤 洋子 (OZAWA, Yoko)

川島 弘彦 (KAWASHIMA, Hirohiko)