

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24033

研究課題名(和文) 網膜色素変性におけるミクログリアのゲノムの酸化の影響の解明

研究課題名(英文) Assessment of oxidative stress for DNA of microglia in retinitis pigmentosa

研究代表者

中武 俊二 (Shunji, Nakatake)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30847091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに難治性網膜疾患である網膜色素変性(RP: Retinitis Pigmentosa)において免疫を担当するミクログリアのゲノムへの酸化ストレスが病態の進行に関与していることを明らかにした。また、網膜神経節細胞死によって引き起こされる緑内障は、本邦における失明原因の第1位となっており、緑内障においてもゲノムの酸化ストレスが関与している事がわかっているが、その病態については不明な点が多い。今回、緑内障モデルマウスを用い、緑内障においてもゲノムの酸化とその修復機構が病態に関与している事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性、緑内障はいずれも本邦における中途失明原因の上位を占める疾患である。これまでに網膜色素変性において遺伝子情報を担うゲノムの酸化が病態進行に関与していることを明らかにしたが、今回、緑内障モデル動物を用いることで緑内障においてゲノムの酸化を修復する機構が病態に関与している可能性が示唆された。これまで緑内障の治療は眼圧下降や神経保護が治療の主流であったが、今後酸化ストレスに着目した新しい治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Previously, we revealed the oxidative DNA damage activates microglia and exacerbate retinal inflammation and degeneration in retinitis pigmentosa. Additionally, it has been elucidated that oxidative stress plays a crucial role in glaucoma, one of a major cause of blindness in Japan, however, the mechanism is still unclear. In this study, we revealed oxidative stress for DNA and the repair system of oxidative DNA damage plays a crucial role for glaucoma.

研究分野：眼科

キーワード：網膜色素変性 緑内障 酸化ストレス ゲノムの酸化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性 (RP: Retinitis Pigmentosa) は遺伝性かつ進行性の網膜変性疾患で、全世界で 150 万人以上が罹患し、中途失明原因の上位を占める疾患となっている。RP の原因遺伝子は 50 以上が同定されているものの、これらの原因遺伝子によってどのようにして視細胞死が引き起こされるのか、詳細なメカニズムは分かっていない。こういった背景から、我々は原因遺伝子によらない共通の病態をターゲットとし、研究を進めてきた。今回、その中で酸化ストレスについて着目した。RP モデル動物に対し抗酸化剤である N アセチルシステイン (NAC) を投与することで視細胞死・網膜変性が抑制されることが明らかになっている (Yoshida N, et al., Ophthalmology. 2013)。また、我々はさらに核酸塩基の酸化とそれに対する修復系酵素の役割に着目して研究を進めてきた。核酸塩基の中で最も酸化されやすいグアニンの酸化体、8-オキソグアニン (8-oxoG) は、神経変性モデル動物や神経変性疾患の患者の脳において、神経細胞やミクログリアの核とミトコンドリアゲノムに蓄積する。我々は過去に RP においても網膜のミクログリアの核 DNA の酸化がミクログリアの活性化や視細胞死に重要であることを明らかにした (Nakatake S, et al., JCI Insight. 2016)。

また、網膜神経節細胞死によって引き起こされる緑内障は全世界において中途失明原因の上位を占め、現在の本邦における失明原因の第 1 位となっている。大規模スタディにより緑内障患者は 40 歳以上の 5% に占めることがわかっており、今後も患者数の増加が予想されている。緑内障においても病態の進行に酸化ストレスが関与している事がわかっているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。今回、緑内障における酸化ストレスの影響について、特にゲノムの酸化に着目して研究を行った。

2. 研究の目的

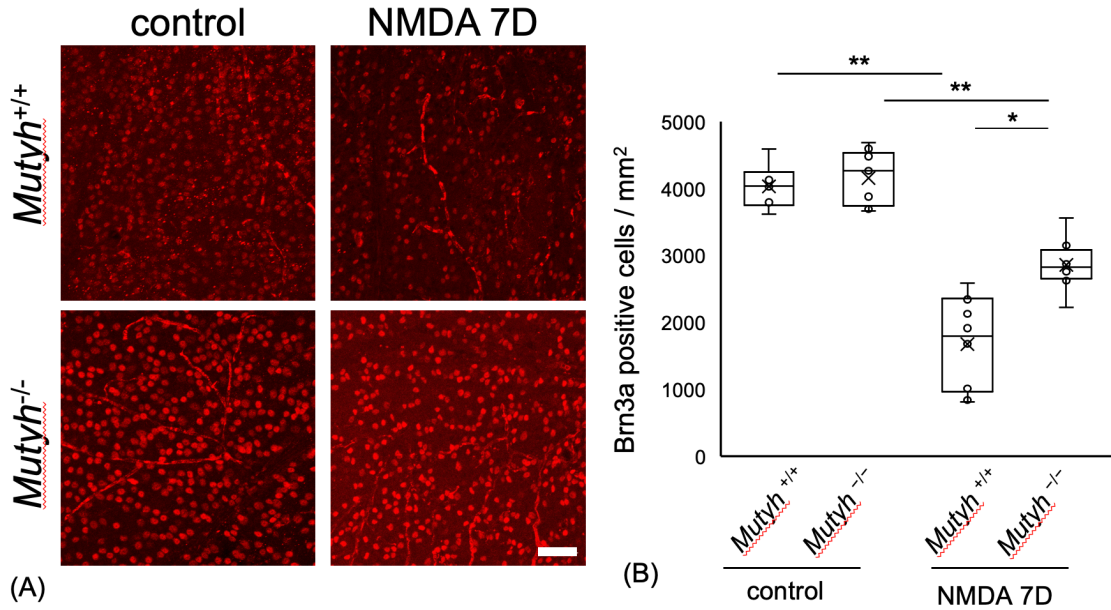
緑内障患者の前房水や血清中に、また緑内障モデル動物において神経節細胞に 8-oxoG が蓄積することが報告されているが、8-oxoG の神経節細胞の変性と緑内障の発症における機序は明らかになっていない。本研究では緑内障においてゲノムの酸化修復酵素の一つである MUTYH の影響を解析し、緑内障の発症における 8-oxoG のゲノム蓄積とその抑制機構の関与と意義を明らかにする。

3. 研究の方法

緑内障モデルマウスについては グルタミン酸トランスポーターである GLAST (glutamate-aspartate transporter) をノックアウトさせた *Glast*-KO マウスとグルタミン酸と似た構造物である NMDA (N-methyl-D-aspartate) 硝子体投与マウスの 2 種類を用いた。いずれのマウスも網膜神経節内のグルタミン酸の濃度が上昇することにより、網膜神経節細胞死を引き起こすことがわかっており、緑内障モデル動物として広く使用されている。ゲノムの酸化修復機構については複数知られており、MTH1 は 8-oxodGTP などの酸化ヌクレオチドを分解し、OGG1 は DNA 中のシトシンと対合した 8-oxoG を除去し、MUTYH は DNA 中の 8-oxoG に誤って取り込まれたアデニンを除去修復することがわかっている。今回、この中の一つの *Mutyh* をノックアウトした *Mutyh*-KO マウスを用い、それぞれの緑内障モデルマウスにおいて *Mutyh* の欠損の影響を免疫染色を用いて解析を行った。網膜神経節細胞のマーカーは抗 Brn3a 抗体を、免疫担当細胞であるミクログリアのマーカーは抗 Iba-1 抗体をそれぞれ用いて評価を行った。

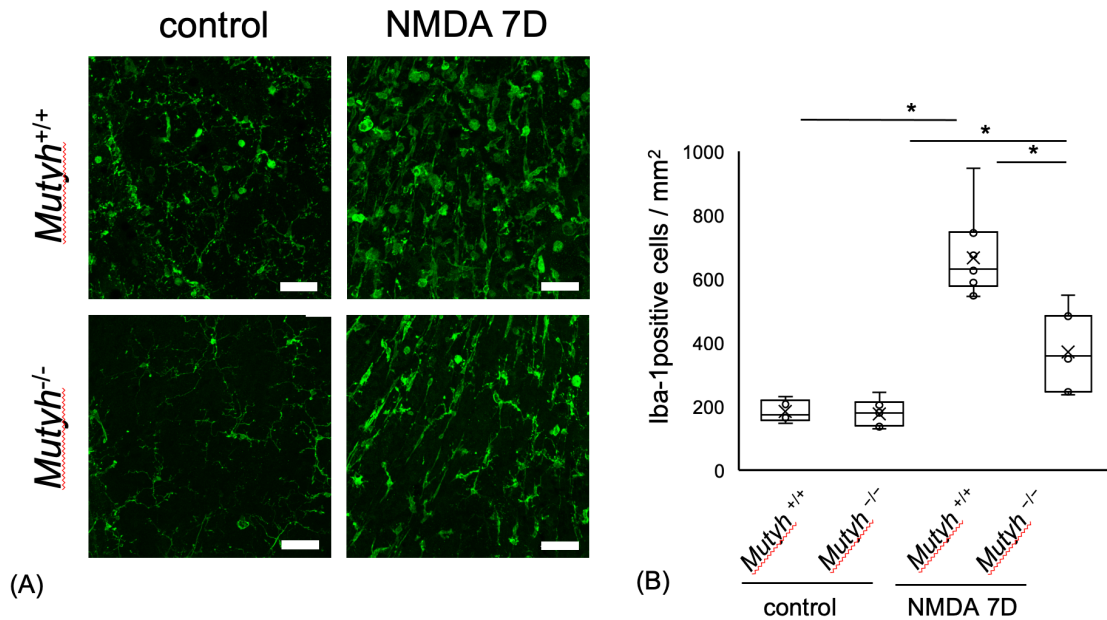
4. 研究成果

図1 *Mutyh* の欠損により、NMDA 投与による網膜神経節細胞死が抑制された



Mutyh^{+/+} マウスと *Mutyh*^{-/-} マウスに対し、NMDA を投与した群とコントロール群の投与後7日における網膜神経節細胞のマーカである Brn3a による染色を行なった。(A) は免疫染色の図であり、(B) はその定量である。*Mutyh* の欠損により、NMDA 投与による網膜神経節細胞死が有意に抑制されていた。

図2 *Mutyh* の欠損により、NMDA 投与によるミクログリアの増生が抑制された



Mutyh^{+/+} マウスと *Mutyh*^{-/-} マウスに対し、NMDA を投与した群とコントロール群の投与後7日におけるミクログリアのマーカである Iba-1 による染色を行なった。(A) は免疫染色の図であり、(B) はその定量である。*Mutyh* の欠損により、NMDA 投与によるミクログリアの増生が有意に抑制されていた。

Mutyh の NMDA 投与による網膜神経節細胞死への影響の検討を行なったところ、Mutyh をノックアウトした群では NMDA 硝子体投与による神経節細胞死が有意に抑制されていた。さらに詳細なメカニズムについて検討するため、網膜神経節細胞におけるミクログリアの活性について検討を行なったところ、Mutyh の欠損により NMDA 投与によるミクログリアの増生が有意に抑制されていた。これらの結果から、Mutyh はミクログリアの活性を抑制し、NMDA 投与による網膜神経節細胞死を抑制していることが明らかになった。我々は過去に RP において網膜のミクログリアの核 DNA の酸化がミクログリアの活性化や視細胞死に重要であることを明らかにしており (Nakatake S, et al., JCI Insight. 2016)、緑内障においても同様にミクログリアの核 DNA の酸化がミクログリアの活性や網膜神経節細胞死に関与している可能性が考えられた。今後はミクログリアの核 DNA の酸化について検討を行う予定としている。また、*Glast*-KO マウスについては *Mutyh*-KO マウスとの交配が終わっており、今後マイクロアレイや免疫染色を行いゲノムの酸化の有無や Mutyh の影響の有無を検討し、ゲノムの酸化と緑内障の発症との関連について検討する予定としている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------