

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592074

研究課題名(和文)

一酸化窒素合成酵素(NOS)トランスジェニックマウスの作成とその視機能解析

研究課題名(英文) Generation of nitric oxide synthase transgenic mice and analysis of their visual function

研究代表者

米今 敬一 (Komeima Keiichi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40362256

研究成果の概要(和文)：

誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)を網膜色素上皮細胞特異的に発現するiNOSトランスジェニックマウスを5系統作成したところ、そのうち3系統のマウスで、網膜に検眼鏡的にドルーゼンを確認した。この結果から、網膜色素上皮に過剰に発生した一酸化窒素(NO)は、網膜外層に酸化ストレス・ニトロ化ストレスを与え、マウスの網膜にヒト加齢黄斑変性症様の変化を起こしたと考えられた。

研究成果の概要(英文)：

We generated 5 lines of inducible nitric oxide synthase transgenic mice. Fundus examination revealed retinal drusen in 3 lines of transgenic mice. These results indicated that nitric oxide overexpressed in the outer layer of retinas caused oxidative stress and degenerative change in mouse retinas as is seen in the patients of age-related macular degeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：

- (1) 一酸化窒素(NO) (2) 誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS) (3) 網膜色素上皮細胞
 (4) トランスジェニックマウス (5) 酸化・ニトロ化ストレス (6) VMD2プロモーター
 (7) 加齢黄斑変性 (8) 網膜色素変性症

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスによる神経細胞障害は、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの難治性神経変性疾患と密接な

関わりがあることがすでに証明されているが(Lin et al., Nature, 2006, Review)、近年眼科分野においても酸化ストレスと網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症をはじめと

する種々の難治性網脈絡膜変性疾患との関連を報告する論文が急増しつつある。加齢性黄斑変性症に関しては、2001年に米国において抗酸化薬及び亜鉛の経口投与での進行を遅延させることができるという結果が報告されている (Age-Related Eye Disease Study Group, Arch Ophthalmol, 2001)。また、マウスを用いた動物実験においても、酸化ストレスに対する防御機構因子の1つであるスーパーオキシドディスムターゼ1 (SOD1) のノックアウトマウスがヒト加齢性黄斑変性症の表現型を再現することが報告されており (Imamura et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2006)、その病態に酸化ストレスが深く関与していることが確定的である。

細胞傷害性の酸化ストレスを生む活性酸素分子としては、主にラジカル種ではスーパーオキシド・ヒドロキシルラジカル・一酸化窒素 (NO) など、ノンラジカル種では過酸化水素・パーオキシナイトライト (ONOO-) などが挙げられるが、代表者は NO を発生させる酵素である NO 合成酵素 (NOS) を長年研究対象としてきた経緯があり (Komeima et al, J Biol Chem, 2000; Komeima et al, FEBS Lett, 2001)、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症をはじめとする難治性網膜疾患に対する NO の関連性を明らかにすることにした。NO には血管拡張作用、神経伝達物質様作用をはじめとした様々な重要な生理活性作用があるが、その反面、NO はスーパーオキシドと反応して活性酸化窒素種を生じ、生体内の分子を酸化・ニトロ化して細胞を傷害する。すでに代表者は NOS 阻害剤を用いた薬理的アプローチにより網膜色素変性症モデルマウスの錐体細胞変性に NO が大きくかかわっていることをつきとめている (Komeima et al., Free Radic Biol Med, 2008)。また、加齢性黄斑変性症の患者から採取した脈絡膜新生血管膜から誘導型 NOS (iNOS) が検出されたとする報告があり (Hattenbach et al, Ophthalmologica, 2002)、加齢黄斑変性における網脈絡膜の酸化ストレス障害にも NO が深く関与していることが推察された。研究代表者はこのような背景に立ち、網膜 (視細胞、網膜色素上皮、脈絡膜) に対する酸化・ニトロ化ストレスに焦点を当てて網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症をはじめとする難治性網膜疾患の病態生理を明らかにするとともに新規の有効な治療法を開発につなげていきたいと考えた。

2. 研究の目的

NOS には神経型 NOS (nNOS)、内皮型 NOS (eNOS)、誘導型 NOS (iNOS) の3種類のアイソフォームが存在し、すでにそれぞれのノックアウトマウスが作成され表現型が解

析されている (Huang et al., Cell, 1993; Huang et al., Nature, 1995; MacMicking et al., Cell, 1995; Wei et al., Nature, 1995)。網膜研究においてもこれらのノックアウトマウスはしばしば利用されており、各々の内在性 NOS アイソフォームの様々な網膜疾患への関与が検討されている

(Vorwerk et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997; Sennlaub et al., J Clin Invest., 2001; Ando A et al., J Cell Physiol, 2002)。また、各 NOS アイソフォームの選択的阻害剤を用いて内在性 NOS の活性を抑制することで、さまざまな病態における NOS の果たす役割を解明する研究も数多くなされており、NOS 阻害剤を用いた実験は NO 研究の大きな柱となっている。

しかしながら、in vivo で NOS を過剰発現させて酸化・ニトロ化ストレスをかけ、その影響を調べた報告は少なくとも網膜に関しては皆無で、網膜に対する持続的な長期にわたる NO 負荷の影響を調査する上で、このプロジェクトは非常に大きな意義のあるものであると考えられた。

研究代表者は、この NOS トランスジェニックマウスが酸化・ニトロ化ストレスによって何らかの形で機能的・形態的に網膜変性を起こすものと考えた。また、視細胞で過剰に発生した NO は、部分的にスーパーオキシドと反応してパーオキシナイトライトとなり、或いはヘム鉄を介した Fenton reaction によって錐体・桿体細胞を攻撃して視細胞をアポトーシスに導くと考えられた。網膜色素上皮に過剰に発生した NO は同様の機序でヒト加齢性黄斑変性症に見られるような視細胞変性、網膜色素上皮萎縮、あるいは Bruch 膜を攻撃して新生血管を誘導する可能性があると考えられた。以上のような推測から、NOS を過剰発現させた NOS トランスジェニックマウスは網膜色素変性症モデルとして、あるいは加齢性黄斑変性症モデルとして使用できることを期待して本プロジェクトを推進した。研究代表者は網膜に対する持続的・長期にわたる NO の過剰負荷によるマウスの網膜変性モデルを確立し、このモデルを解析することによって、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症を含む難治性網膜疾患の病態生理の一端を明らかにすることを目的にこの実験を行った。

3. 研究の方法

構成的活性型 NOS gene を網膜視細胞特異的プロモーターである interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) promotor、網膜色素上皮特異的プロモーターである Vitelliform Macular Dystrophy 2 (VMD2) promotor に連結した DNA constructs を作成し、これを用いて IRBP/NOS および VMD2/NOS

トランスジェニックマウスを作成した。またトランスジェニックマウスの作成と平行して細胞レベルでNO負荷した細胞の反応を調べた。NOSトランスジェニックマウスの網膜電図(ERG)を用いた電気生理学的解析および免疫組織染色などを用いた組織学的解析を行い、網膜に対する持続的、長期間にわたる酸化・ニトロ化ストレスの影響を調査した。また、網膜におけるNOSの過剰発現による酸化・ニトロ化ストレスの定量および網膜の経時的変化を精査した。

具体的に詳細を述べると、まずmouseのVMD2 promoter部分をPCRで増幅し、TA cloning vectorにinsertして、sequenceを確認した。次に、すでにcloningが完成している構成的活性型NOSをこれらのpromotorに連結した。具体的には、現在Cytomegalovirus (CMV) promoterの下流に挿入してある誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)のDNA plasmidからCMV promoterを制限酵素を用いて抜き出し、そこにVMD2 promoterを挿入した。(Chang et al., 2000, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000, 41:4281-7., Esumi et al., 2000, J Biol Chem. 2004, 30:279:19064-73.を参照)開始コドン直前のKozak配列、3'のpoly Aはそのまま使用した。DNA constructが完成した後、VMD2/NOSトランスジェニックマウス作成を外注した。NOSトランスジェニックマウスの完成に先立ち、これと平行してヒト網膜色素上皮の培養細胞(ARPE-19)、マウス網膜色素上皮の初代培養細胞を用いてin vitroで過剰なNO負荷に対する細胞の反応を調べた。具体的には、酸化ストレス関連酵素(superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalaseなど)のmRNA発現量およびタンパク発現量の変化、酵素活性の変化などを解析した。また、NO負荷した網膜色素上皮細胞のlysateに対して、タンパクの2次元電気泳動、Massspectroscopyなどを用いて、ニトロ化またはS-ニトロ化されるタンパクの同定を行った。また、生後10日、15日、21日、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年、1年6ヶ月、2年の各タイムポイントでNOSトランスジェニックマウスに対して眼底を顕微鏡的に精査し、その表現型を経時的に記録・解析した。さらに網膜変性、ドルーゼン、新生血管などの表現型をチェックした。上記に示した各タイムポイントにおいて、マウス網膜をホモジナイズして得られたlysateに対してタンパクカルボニル量、ニトロ化されたタンパク量をELISAによって定量した。

4. 研究成果

iNOSを網膜色素上皮細胞特異的に発現するiNOSトランスジェニックマウスを5系統樹立したが、そのうち3系統のマウスについて月

齢6カ月以上のマウスの網膜に顕微鏡的にドルーゼンを確認した。その後、さらにこれらのマウスの網膜ドルーゼンの経時的変化を記録し、データを蓄積した。同時に、その発現型を眼底検査、網膜電図、網膜の凍結切片を用いて解析した。当初、研究代表者はこのiNOSトランスジェニックマウスが酸化・ニトロ化ストレスによって何らかの形で機能的・形態的に網膜変性を起こすという仮説を立てて実験を進めたが、上記の3系統のトランスジェニックマウスで見られた網膜ドルーゼンの出現は、網膜色素上皮に過剰に発生したNOが網膜外層に酸化ストレスを与え、ヒト加齢黄斑変性症様の変化を起こしたと考えられた。

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) 全て査読有り

1. Nishiguchi KM, Kataoka K, Kachi S, Komeima K, Terasaki H. Regulation of pathologic retinal angiogenesis in mice and inhibition of VEGF-VEGFR2 binding by soluble heparan sulfate. PLoS One. (2010) 5:e13493
2. Komeima K, Ito Y, Nakamura, M, Terasaki H. Inner Retinal Cleavage Associated With Idiopathic Epiretinal Membrane. Retin Cases Brief Rep. (2010) 4:132-4
3. Sakai T, Kondo M, Ueno S, Koyasu T, Komeima K, Terasaki H. Supernormal ERG oscillatory potentials in transgenic rabbit with rhodopsin P347L mutation and retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. (2009) 50:4402-09
4. Usui S, Komeima K, Lee SY, Jo YJ, Ueno S, Rogers BS, Wu Z, Shen J, Lu L, Oveson BC, Rabinovitch PS, Campochiaro PA. Increased expression of catalase and superoxide dismutase 2 reduces cone cell death in retinitis pigmentosa. Mol Ther. (2009) 17:778-86
5. Lu L, Oveson BC, Jo YJ, Lauer TW, Usui S, Komeima K, Xie B, Campochiaro PA. Increased expression of glutathione peroxidase 4 strongly protects retina from oxidative damage. Antioxid Redox Signal. (2009) 11:715-24

[学会発表] (計3件)

1. Takanori Ito, Keiichi Komeima, Tetsuhiko Yasuma, et al. Girdin phosphorylation at serine-1416 by Akt/PkB promotes postneonatal angiogenesis and ischemic neovascularization in the retina. (2010) ARVO Meeting, Ft. Lauderdale, USA 2010.5.2
2. Keiichi Komeima The functional role of Akt

substrate Girdin in retinal angiogenesis (2010) 第
114 回日本眼科学会総会、名古屋 2010.4.15

3. 米今敬一:網膜静脈閉塞の病態生理に対する考
察 (2009) 第 63 回日本臨床眼科学会、福岡
2009.10.9

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米今 敬一 (KOMEIMA KEIICHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40362256

(2) 研究分担者

近藤 峰生 (KONDO MINEO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80303642

寺崎 浩子 (TERASAKI HIROKO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40207478

(3) 連携研究者

なし