

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 年度～2009 年度  
 課題番号：20791248  
 研究課題名（和文） 社会の夜型化傾向に着目した加齢黄斑変性発症の新たな分子基盤  
 —動物モデルによる追究  
 研究課題名（英文） A novel molecular paradigm of age-related macular degeneration in view  
 of the social trend in nocturnal: An approach using an animal model  
 研究代表者 大石健太郎 (OHISHI, KENTARO)  
 浜松医科大学・光量子医学研究センター・助教  
 研究者番号：80345826

研究成果の概要（和文）：加齢黄斑変性は、視機能障害、そして失明にまで至る眼科疾患であり、長期間にわたる太陽光への曝露により引き起こされる可能性が指摘されている。近年、社会の夜型化傾向が進み、夜間に強い光を浴びる人が増加し、今後、この疾患の発症率が上昇する可能性が考えられる。ラットに対して明るい白色蛍光灯の光を照射すると、視機能が障害され、照射した光の量などによっては失明にまで至る。これを“ラット網膜光障害実験モデル”と呼ぶ。これを用いて、夜間に明るい光に曝されることが網膜にとってどれほど危険なのかを示し、さらに、その BMAL1 タンパク質を標的としたメカニズムを追究した。このようにして加齢黄斑変性のメカニズムに探ろうとした研究である。

研究成果の概要（英文）：Age-related macular degeneration (AMD) is an ocular disease with visual dysfunction and blindness, which might be induced by sunlight exposure for a long time. Recently, our society has been going toward the nocturnal life, the number of people exposed to bright light in the nighttime has been increasing. Such the actual situation may contribute to the increased prevalence of AMD in future. A white light exposure to a rat leads to retinal dysfunction, and depending on the experimental condition, the rat goes blind, which is called as “experimental retinal photic injury model”. Using this model, we investigated how risky the nocturnal exposure to bright light is and the mechanism targeted at BMAL1 protein, aiming at looking into the mechanism of the onset of AMD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：網膜光障害、ラット、系統差、時刻差、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

当初、マイクロアレイ解析により、Lewis ラットでの網膜光障害実験に伴い、mRNA レベルで発現上昇が認められた多数の遺伝子の中で、*Bmal1* 遺伝子や *Cry2* 遺伝子という時計遺伝子が発現上昇していることを認めていた。目は体内時計と密接な関係を持ち、また、網膜光障害も昼と夜のいずれに光照射するかで網膜変性の度合いが大きく異なっていた。この“時刻差”は、網膜光障害に対して耐性の Lewis ラットで認められたが、それに対して感受性を示す Wistar ラットで認められなかった。このことから、Lewis ラットの網膜光障害に対する耐性機構において、時計遺伝子の重要性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、網膜光障害における網膜変性に関して、これまで曖昧であった変性の程度や部位の数値化法を開発・実施することにより、客観的に各群間での比較を行えるようにすること。また、時計遺伝子により制御される体内時計との関係について追究するために、BMAL1 や CRY2 のタンパク質レベルでの発現誘導に関して、検討を行うこと。これらを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 網膜光障害実験 非近交系の Wistar 系統と近交系の Lewis 系統および WKY 系統の成熟アルビノ雄ラットを使用した。ラットは、朝7時から夜7時までの明環境である明暗サイクル下にて飼育した。光照射実験は、予め1日間の暗順応を行い、その後、夜 12 時より 3 時間、照度 3000 ルクス、光照射条件にて白色蛍光灯を頭上 50 cm の高さより照射した。その後、通常光環境下に戻した(朝 7 時まで暗所)。

また、日内リズムとの関係を調べるために、光照射時間を、夜 12 時、朝 6 時、昼 12 時、夕方 6 時から、それぞれ、3000 ルクス、3 時間、光照射し、2 時間の暗所飼育後、通常光環境に戻した。

(2) ラットの屠殺および眼球標本作製 光照射後 4.5 日以降において、ラットをエーテル過量吸入により無痛に屠殺した後、眼球を冷 4%パラホルムアルデヒド溶液にて 10 分間浸漬固定し、実体顕微鏡下にて、角膜下半分を切除、水晶体および硝子体を除去、更に 4 時間浸漬固定した。冷スクロース-PBS 溶液による処理(15%、20%、25%; 各 4 時間)の後に液体窒素下にて OCT コンパウンド中に凍結包埋した。この凍結ブロックより凍結切片を作製し、組織化学染色を施行した。この実験病理標本を用いて、網膜変性度の測

定(後述)を行った。

免疫組織化学染色標本の作製の場合は、光照射後 6 時間から 18 時間以内に凍結ブロック作製を行った(後述)。

(3) 組織染色 ラット眼球が包埋された凍結ブロックは、クリオスタットにて、14  $\mu$ m 厚の切片を作製し、自然乾燥させた。その後、ヘマトキシリン-エオシン(HE)染色を行い、病理標本を作製した。写真撮影は、高精度のデジタルカメラを用いて行い、通常の 20 倍および 40 倍のレンズによる撮影を行った。また、2 倍の低倍率のレンズを用いて、網膜全体(眼球後部全体)の写真撮影した。

(4) 網膜変性度の測定 網膜変性度は、独自に方法を確立した。HE 染色した矢状面の眼球切片を低倍率レンズで撮影した写真画像を用いて、コンピュータ上で網膜全体における変性部位の割合を百分率にて数値化を実施した。方法の詳細については、「4.研究成果」にて解説する。

(5) 免疫組織化学染色 ラットは光照射後、3 時間、9 時間、15 時間後に無痛に屠殺し、上述の方法にて、凍結切片を作製した。免疫組織化学染色は、間接法にて行い、ジアミノベンジン(DAB)による染色を行った。その後、メチルグリーンによる細胞核染色を行った。1次抗体は市販の抗体を数種類試行したが、使用可能であった一部の抗体・抗原についてのみ検討を進めた。

## 4. 研究成果

### (1) 網膜光障害と網膜変性解析法の確立

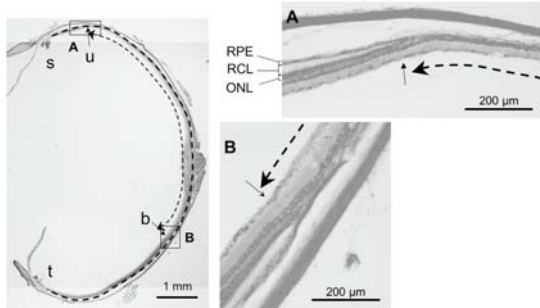
本網膜光障害実験モデルにおける網膜変性は、夜 12 時からの 3 時間光照射し、光照射後 4.5 日目の網膜は、すでに、視細胞と網膜色素上皮(RPE)細胞の消失を伴う網膜変性を認めた。この変性領域の大きさには、系統差が認められた。しかし、この領域の大きさや位置に関するデータを計測、解析する手段が、これまで報告されていなかった。ここで、画像描画ソフトウェアを用いた画像解析法を考案した。

方法は、まず、変性領域の上端および下端に印を付し、その後、網膜外層に沿って上端から下端まで、曲点線を引いた(図1)。上端(s(始点))から視神経乳頭部を経て網膜下端(t)までの点の数をT、同様に、変性領域上端(u)までの点の数をU、変性領域下端(b)までの点の数をBとした(図1)。

網膜変性度は、

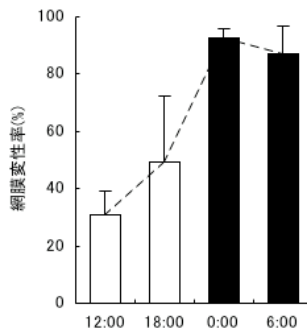
$$\text{網膜変性度 (\%)} = (B-U)/T \dots\dots\dots (i)$$

の式(i)により求めた。この方法は、点線の細かさの具合で精密度を調整できるが、今回は、およそ 125  $\mu\text{m}/\text{dot}$  前後で行った。また、U、B および T の値は、変性領域の位置情報を求める要素としても重要であり、特に、グラフ化することで切片の間での比較が容易かつ客観的に行える利点もある。



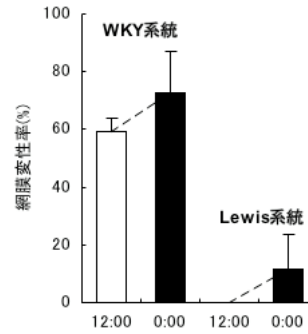
**図1. 光障害を受けた網膜像** 照射後4ヶ月後の網膜像。全体写真における記号(s, u, b, t)については、本文を参照。記号A およびB は右側の写真A および写真Bの位置を示している。小矢印は、視細胞およびRPE細胞が完全に消失した部位の境界を示す。上記の網膜における変性度は60.5%と計測された。

(2) 光照射の時刻差および系統差 この方法を用いて、まず、本光照射条件で感受性を示すWistar ラットでの光照射の時刻差の比較・解析を行った(図2)。この結果から、昼から夕方にかけて、光照射による網膜変性が起こりにくい一方、夜から朝にかけて、網膜変性の感受性が上昇することが明確となり、体内時計の影響を強く受けていることが明らかとなった。また、前者と後者の間の差は、統計的にも有意であった。夕方6時において標準偏差が大きいことは、個体間でのばらつきが大きかったためであり、夕方6時前後に、ラット網膜において何らかの遺伝子発現変化が起こっていることを示唆していた。さらに、夜から朝にかけての時間帯は、多くの時計遺伝子が活性化する時刻と一致することからも、体内時計メカニズムが感受性に影響を与えていることが考えられた。



**図2. 網膜光障害の程度と照射開始時刻との関係 (Wistar 系統)** 各時刻からの光照射により引き起こされる網膜変性の程度を示す。横軸は光照射を開始した時刻を示す。

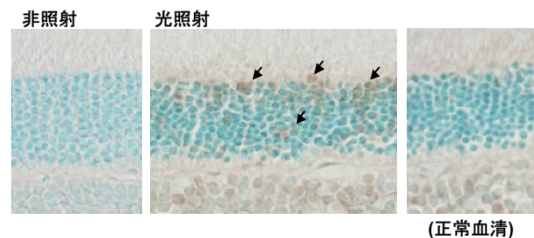
次に、本光照射条件で感受性を示すWKY ラットおよび耐性を示すLewis ラットを用いて、昼と夜の12時からの両結果を比較した(図3)。WKY ラットでは、昼夜の両方において、広範囲に網膜変性が認められたが、両者において顕著な時刻差は認められなかった。Lewis ラットの結果は、網膜変性の程度が小さいので、顕著な差として示されなかった可能性も考えられる。



**図3. 網膜光障害の程度と照射開始時刻との関係 (WKY 系統およびLewis 系統)** 各時刻からの光照射により引き起こされる網膜変性の程度を示す。横軸は光照射を開始した時刻を示す。

このように、時刻差に関する検討を行う場合は、ラット系統の選定を十分に行う必要があることが明らかとなった。

(3) 免疫組織化学染色による体内時計関連遺伝子産物の検討 そこで、光照射により視細胞やRPE細胞において、時計遺伝子である*Bmal1* 遺伝子や*Cry2* 遺伝子の発現誘導が起こるかについて、免疫組織化学染色によりタンパク質レベルでの検討を行った。光照射終了後9時間目において、錐体細胞の細胞体と思われる外顆粒層外側の細胞体を中心に Wistar ラットにてBMAL1 タンパク質の陽性像が散見された(図4)一方、Lewis ラットでは数は少なかったが比較的弱陽性な細胞を確認できた。CRY2タンパク質については発現誘導が認められなかった。このことから、網膜光障害における視細胞のアポトーシスにはBMAL1 タンパク質の発現誘導が関与する可能性が考えられた。



**図4. 光照射後9時間目の網膜のBMAL1の発現** 写真は外顆粒層を示している。光照射後9時間目のWistar ラット網膜において、外顆粒層の外層(上側)を中心にBMAL1 陽性細胞が散見された。

今回の結果から、当初考えていた、Lewis ラット

におけるBMAL1-CLOCK-CRY2複合体形成によるアポトーシス抑制機構は、この系には該当しないと現段階では考えざるを得ないが、BMAL1タンパク質による別のメカニズムがアポトーシスに関与する可能性も十分に残っているため、今後も検討を続けていきたい。

#### 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. Ohishi K, Hosono K, Hiramitsu T, Minoshima S: Regression analysis of swimming time of rats with retinal photic injury using lognormal distribution model. *Photomed. Photobiol.* 31:21-2, 2009 (査読なし).
2. Ohishi, K., Hiramitsu, T., Minoshima, S.: Genetic approach for mapping genes responsible for susceptibility to photic injury in the rat retina. *Photomed. Photobiol.* 30:3-4, 2008 (査読なし).
3. Wang, C., Nakanishi, N., Ohishi, K., Hikoya, A., Koide, K., Sato, M., Nakamura, M., Hotta, Y., Minoshima, S.: Novel RDH5 mutation in family with mother having fundus albipunctatus and three children with retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Genet.* 29(1):29-32, 2008 (査読あり).
4. Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., Sugiura, Y., Zaima, N., Nakanishi, H., Ohishi, K., Nakanishi, S., Naito, T., Taguchi, R., Setou, M.: Matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight (MALDI-QIT-TOF)-based imaging mass spectrometry reveals a layered distribution of phospholipid molecular species in the mouse retina. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22(21):3415-26, 2008 (査読あり).

[学会発表] (計16件)

1. 大石健太郎, 細野克博, 堀田喜裕, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害感受性に関わる染色体領域の同定. 第14回眼科分子生物研究会(大阪府池田市 伏尾温泉 不死王閣, 2010.2.13-14)
2. 大石健太郎, 細野克博, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害感受性の責任遺伝子探索. 第32回日本分子生物学会年会(横浜

パシフィコ横浜, 2009.12.9-12)

3. 細野克博, 大石健太郎, 山口良考, 工藤純, 清水信義, 堀田喜裕, 蓑島伸生: 視細胞特異的遺伝子プロモーターとSV40LargeT抗原遺伝子によるマウス培養細胞株の樹立と性状解析. 第32回日本分子生物学会年会(横浜パシフィコ横浜, 2009.12.9-12)
4. Ohishi, K., Hosono, K., Hiramitsu, T., Minoshima, S.: Genetic Analysis of Rat Strain-Dependent Difference in the Susceptibility to Retinal Photic Injury and Mapping Possible Susceptibility Loci. The 9th Kyungpook-Hamamatsu Joint Medical Symposium, Hamamatsu Meeting. Sep., 2009, Taegu, Korea.
5. 大石健太郎, 平光忠久, 蓑島伸生: 可視光線による網膜光傷害におけるトランスフェリンおよびその受容体の発現動態. 第33回日本鉄バイオサイエンス学会(倉敷 倉敷市芸文館, 2009.9.12-13)
6. 蓑島伸生, 細野克博, 大石健太郎, 山口良考, 工藤純, 清水信義, 堀田喜裕: 視細胞特異的遺伝子を発現するマウス培養細胞株の樹立. 第16回日本遺伝子診療学会大会(札幌 ホテル札幌ガーデンパレス 2009.7.30-8.1)
7. 大石健太郎, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害の感受性遺伝子検索のための遺伝学的アプローチ——病理組織所見と行動学所見の関係比較——. 第20回眼科酸化ストレス研究会(大阪 梅田スカイビル・タワーウエスト, 2009.7.25)
8. 大石健太郎, 細野克博, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害の感受性遺伝子検索のための遺伝学的アプローチ(2). 第31回日本光医学・光生物学会(大阪 梅田スカイビル・タワーイースト, 2009.7.24-25)
9. Wang, C., Hosono, K., Ohtsubo, M., Ohishi, K., Nakanishi, N., Hikoya, A., Sato, M., Hotta, Y., Minoshima, S.: Interaction between optineurin and bZIP transcription factor NRL. Association for Research in Vision and Ophthalmology, May, 2009, Florida, USA.
10. 蓑島伸生, 細野克博, 大石健太郎, 山口良考, 工藤純, 清水信義, 堀田喜裕: 錐体特異的遺伝子を発現するマウス培養細胞株の樹立. 第113回日本眼科学会(東京 東京国際フォーラム, 2009.4.16-19)
11. 中西伸夫, 大坪正史, 大石健太郎, Ismail

Thanseem, 細野克博, 王春霞, 堀田喜裕, 蓑島伸生: 緑内障発症機序の分子レベルでの解明: 緑内障原因遺伝子ミオシリンの産物蛋白質が細胞外で相互作用する蛋白質の探索. 第31回 日本分子生物学会年会 第81回 日本生化学会大会 合同年会(神戸 神戸ポートアイランド, 2008.12.9-12)

12. 王春霞, 細野克博, 大坪正史, 大石健太郎, 中西伸夫, 堀田喜裕, 蓑島伸生: オプチニューリンと NRL タンパクの相互作用の解析. 第31回 日本分子生物学会年会 第81回 日本生化学会大会 合同年会(神戸 神戸ポートアイランド, 2008.12.9-12)

13. Ohishi, K., Hiramitsu, T., Minoshima, S.: Genetic Analysis of Rat Strain-Dependent Difference in Susceptibility to Retinal Photoc Injury using a Behavioral Visual Assessment. The 8th Kyungpook-Hamamatsu Joint Medical Symposium, Hamamatsu Meeting. Sep., 2008, Hamamatsu, Japan.

14. 蓑島伸生, 細野克博, 大石健太郎, 山口良考, 工藤純, 山本清二, 小川美香子, 間賀田泰寛, 清水信義, 堀田喜裕: 視細胞特異的遺伝子プロモーターと SV40 LargeT 抗原遺伝子を用いた不死化培養細胞株樹立の試み. 第15回 日本遺伝子診療学会大会(仙台 戦災復興記念館. 2008.7.31-8.2)

15. 大石健太郎, 平光忠久, 蓑島伸生: 網膜光傷害感受性の系統差と鉄代謝タンパク質の動態変化. 第19回 眼科酸化ストレス研究会(松江 島根県医師会館, 2008.7.12)

16. 大石健太郎, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害の感受性遺伝子検索のための遺伝学的アプローチ. 第30回 日本光医学・光生物学会(松江 島根県医師会館, 2008.7.11-12)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 大石 健太郎

(OHISHI, KENTARO)

浜松医科大学・光量子医学研究センター・  
助教

研究者番号: 80345826