

機関番号：20101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791696

研究課題名（和文） 各種遺伝性網膜変性モデル動物における光ストレスの影響

研究課題名（英文） Effect of light-stress for retinal degeneration in rat models

研究代表者

石川 太（ISHIKAWA FUTOSHI）

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：00419962

研究成果の概要（和文）：遺伝性網膜変性症の動物モデルに光ストレスを与えた場合の網膜内での変化を詳細に検討した。適度な光ストレスを与えることにより網膜変性遅延の効果がみられるかが課題であったが、網膜障害性が強いとされる青色光を除去した弱い照度でも網膜変性の治療効果は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：The effects of various light-induced stress on the retina were examined in the retinal degenerative rat models. The most important problem in this study was light-induced stress promotes photoreceptor cell survival and function in model rats. However, this beneficial effect was not found in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：遺伝性網膜変性症

1. 研究開始当初の背景

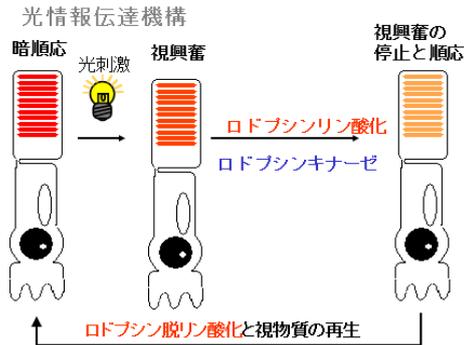
(1) 網膜色素変性症は遺伝性網膜変性疾患であり、治療法が確立されていない難病である。その研究モデルとして用いられる網膜光傷害は網膜変性に至る分子病態を含めて不明な点が多い。

(2) 網膜光傷害の主な傷害部位は網膜視細胞であり、これは遺伝性網膜変性症の障害部位と一致している。光ストレスにおける視細胞変性のメカニズムを詳しく解析することで、遺伝性網膜変性症の発症メカニズムを類推

し、それにより新たな治療法を見出すことが期待されている。

(3) 網膜光傷害モデルは極めて短期間で網膜変性をつくることができ、照射条件を変化させることで様々な程度の網膜変性を作成できる利点がある。さらに標的の網膜視細胞以外に大きな影響を及ぼさないという利点があり、薬剤投与による遺伝性網膜変性症モデルにはない優れた点がある。

(4) 今回は網膜光傷害および遺伝性網膜変性疾患の分子病態を詳しく解析し、未治療法が確立されていない遺伝性網膜変性症の新たな治療法をデザインする目的で本研究を企図した。



2. 研究の目的

本研究は正常および遺伝性網膜変性症モデルラットにおける光刺激に対する変化を詳細に検討することで、網膜光障害に病態が類似する網膜色素変性症の治療法を新たに確立すること、正常ラットと遺伝性網膜変性モデルラットの光ストレスに対する影響を生化学的に詳細に比較する方法により遺伝性網膜変性症と網膜光傷害の病態を遺伝子、タンパク、組織レベルで解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝性網膜変性モデルラット (RCS ラット・P23H ラット) と正常ラット (Sprague Dawley rat, Brown Norway rat) に対して様々な照度・照射時間・照射光で照射を行ない、光学顕微鏡による組織学的検討、網膜電図 (ERG) による機能評価を行った。

① 光ストレスの条件

照度 650lux, 1300lux, 2500lux, 5000lux の 4 種類、照射時間は 12 時間と 24 時間。照射光は通常の白色光と青色光除去フィルター下での照射の 2 種である。

② 組織的变化の評価法

犠牲死させたラットから眼球を摘出し網膜切片を作成し、ヘマトキシ・エオジン染色を施し、網膜切片の顕微鏡写真を撮影、撮影された網膜切片の各細胞層、特に外顆粒層の断層数を数えることで網膜変性の程度を判定した。

③ 網膜機能評価

光刺激後 12 時間の暗順応を行い、暗室内で散瞳剤 (トロピカミド) を点眼した上で腹腔内に麻酔薬 (ケタミン) を注射し、十分に鎮静が得られた状態で両眼の網膜電図を測定した。得られた波形の最高値から最低値を引き振幅幅を算出した。最低 3 回の測定を行い、加算平均値を算出した。

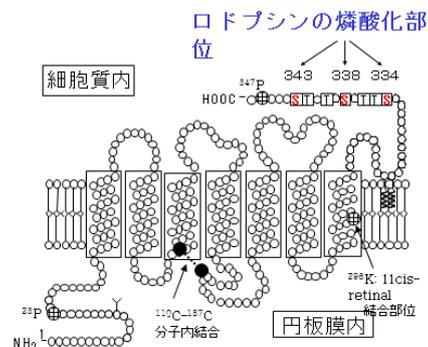
(2) ロドプシンの再生、ロドプシンの脱リン酸化速度の検討、細胞内 cGMP 濃度の測定、TacMan®PCR を用いた神経栄養因子の網膜内発現変化を生化学的に検討した。

① ロドプシンの再生

吸光度計をもちいてロドプシン再生速度を測定した。各種ラットに光ストレスを与えた後に暗順応を施してロドプシンの再生を促し、暗順応時間を変化させることにより、各種ラットごとにロドプシン再生速度曲線を算出した。

② ロドプシン脱リン酸化速度の測定

ロドプシンのリン酸化部位であるロドプシン 334Ser およびロドプシン 338Ser に特異的な抗体を作成した。これを蛍光免疫染色することでロドプシンのリン酸化程度が測定できる。蛍光を発する細胞層が長いほどリン酸化されており、蛍光が少ないほど脱リン酸化されている状態である。各種ラットに光ストレスを与えた後に暗順応を施してロドプシン脱リン酸化を促し、暗順応時間を変化させることにより、各種ラットごとにロドプシン脱リン酸化曲線を算出した。



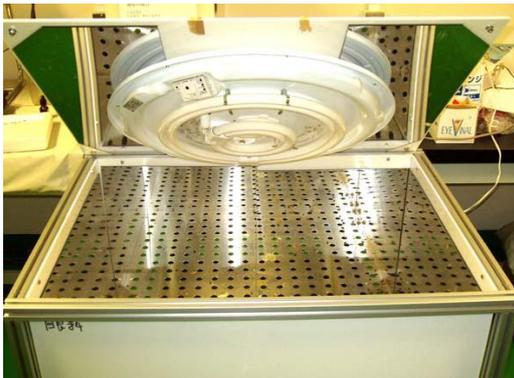
③ 細胞内 cGMP 濃度の測定

細胞内 cGMP 濃度の測定は ELISA 法を用いて

測定した。

④ 網膜保護遺伝子の発現測定

光ストレスにより網膜内に反応性の発現する網膜保護因子の発現を定量的PCRで測定した。各種ラットに光ストレスを与えた後に犠牲死させて眼球を摘出した。摘出した眼球から光学顕微鏡下で網膜を分離し、得られた網膜から Total RNA を抽出した。TaqMan®PCR法で神経栄養因子である、FGF2・CNTF・BDNF・PDGF を定量した。



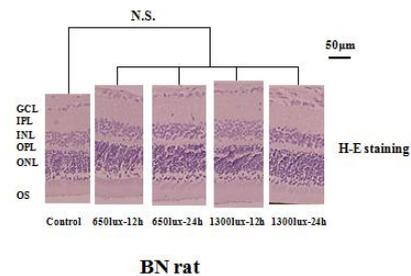
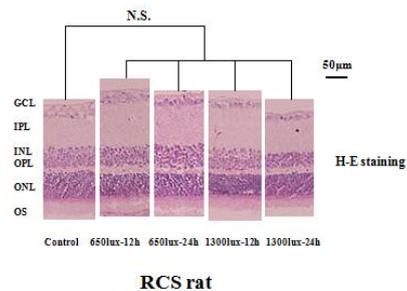
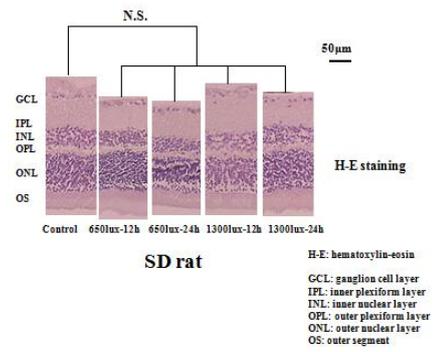
光ストレス装置



遺伝性網膜変性モデルラット

4. 研究成果

(1) 種々の条件 (650lux, 1300lux, 2500lux, 5000lux) で遺伝性網膜変性モデルラットおよび正常ラットに光照射したところ、照度依存的にERG振幅が低下した。組織学的変化として光照射から1週間で照度依存的に外顆粒層の菲薄化がみられた。遺伝性網膜変性モデルラットにおいても照度依存的にERG振幅低下と外顆粒層の菲薄化がみられた。



(2) 光ストレス後のロドプシンの再生には遺伝性網膜変性モデルラットおよび正常ラットともに有意差はみられなかった。遺伝性網膜変性モデルラットおよび正常ラットともに光ストレス、を与えた群では有意にロドプシンの脱リン酸化時間に延長がみられた。また遺伝性網膜変性モデルラットでは、もともとロドプシンの脱リン酸化時間が延長していることがわかった。

(3) 遺伝性網膜変性モデルラットおよび光ストレスを与えた SD ラットでは光依存的な網

膜内 cGMP 濃度低下が十分におこらなかった。遺伝性網膜変性モデルラットおよび正常ラットともに各種神経栄養因子の網膜における mRNA レベルでの発現に有意な変化はみられなかった。また、特に網膜障害性が強いと思われる青色光を除去した刺激でも以上の結果には差違はみられなかった。

アポトーシス関連因子の変化

	650lux-12h	650lux-24h	1300lux-12h	1300lux-24h
Caspase3	↓	↓	↓	↓↓
Caspase8	-	-	-	-
Caspase9	↓↓	↓	↓	↓
Bax	-	-	-	-
Bcl-2	-	-	-	-
Bcl-x	-	-	-	-

RCS rat

アポトーシス関連因子の変化

	650lux-12h	650lux-24h	1300lux-12h	1300lux-24h
Caspase3	-	-	-	-
Caspase8	-	-	-	-
Caspase9	-	-	-	-
Bax	-	-	-	-
Bcl-2	-	-	-	-
Bcl-x	-	-	-	-

BN rat

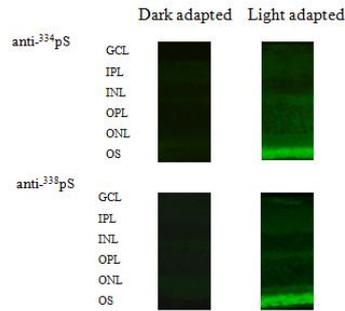
アポトーシス関連因子の変化

	650lux-12h	650lux-24h	1300lux-12h	1300lux-24h
Caspase3	-	-	↓	-
Caspase8	-	-	-	-
Caspase9	↑↑	↑	-	↑
Bax	-	↓	↓	↓
Bcl-2	-	-	-	-
Bcl-x	-	-	↓	-

SD rat

(4) 光ストレスはロドプシンの脱リン酸化を著明に延長させるため、光情報伝達経路の異常を惹き起こしはするが、光ストレスによる網膜保護効果はみられなかった。特に網膜障害性が強いと推察される短波長光（青色光）を除去した刺激でも保護効果は見いだされなかった。

Brown Norway rat



(5) 動物種は異なるがヒト網膜色素変性症を含む網膜変性疾患に対して過度な光ストレスを与えることは有害である可能性を示唆するものと思われる。すなわち①ロドプシンのリン酸化状態の亢進により光依存性の transducin の活性が抑制され、細胞内に cGMP が蓄積する。②細胞内の cGMP 濃度の低下が起こらないため cGMP gated channel が開いた状態が続く。③cGMP gated channel から細胞内への Ca²⁺流入が続き、細胞内 Ca²⁺濃度が上昇する。④Ca²⁺依存的なアポトーシス経路が活性化する。以上の機序により網膜視細胞が細胞死に陥ると考えられた。

(6) 以上の実験結果から特に強い光ストレスは網膜視細胞に不可逆性の組織学的変化をもたらすことがわかった。弱い光ストレスではその変化が可逆的で一時的な網膜視細胞の機能障害に留まるが、遺伝性網膜変性動物モデルでは光ストレスに対して網膜視細胞の状態が脆弱で、正常対照と比較すると回復に時間を要することがわかった。これは網膜障害性が強いとされる青色光をフィルターで除去しても同様の結果であった。非常に弱い光ストレスを遺伝性網膜変性動物モデルに与えて網膜保護因子である FGF2・CNTF・BDNF・PDGF の発現を促し、網膜変性を遅延させるような有用な効果はみられなかった。遺伝子レベルでの解析でもこれらの神経栄養因子の発現は有意なものではなく、新たな治療法として用いるのは困難と考えられた。網膜に光ストレスを与える利益よりも網膜に光ストレスを与えることによる網膜視細胞への傷害のほうが大きかった。今回の検討からはむしろ光ストレスを軽減したほうが網膜変性を抑制できる可能性が示唆されるが、臨床における網膜色素変性症患者への黄色着色レンズの装用などは効果を疑問視する報告を散見される。網膜視細胞変性の原因としては視細胞の代謝異常にかかわる因子が

大きく、変性における光ストレスの関与は小さいのかもしれない。さらに詳しく分子病態を解析することにより、疾患へのそれぞれの因子のかかわりを明らかにし、新たな治療法を見出すことが今後の課題と思われる。

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 太 (ISHIKAWA FUTOSHI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00419962

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: