

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592612

研究課題名(和文) 網膜神経細胞障害における神経分泌タンパク質 VGF の保護機構に関する研究

研究課題名(英文) A study for protective mechanisms of VGF, a neurosecretory peptide, in retinal injury

研究代表者

嶋澤 雅光 (Shimazawa, Masamitsu)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80381721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：網膜神経細胞障害における神経分泌タンパク質である VGF (nerve growth factor inducible (VGF)) の関与およびその機序を解明することを目的として実施した。VGF 活性ペプチドである VGF588-617 (AQEE30) は小胞体ストレスによる神経細胞障害に対して保護作用を示し、細胞生存促進因子である Akt のリン酸化亢進作用を示した。これらのことから、VGF は細胞生存シグナルを活性化することにより神経細胞保護作用を発現していることが示唆された。さらに、VGF は緑内障モデルマウスの網膜において小胞体ストレスおよび VGF の発現が増加していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We performed to clarify the involvement of VGF (nerve growth factor inducible (VGF)), a neurosecretory peptide, in retinal injury. VGF588-617 (AQEE30), an active VGF peptide, inhibited neuronal cell death induced by endoplasmic reticulum (ER) stress, and it increased phosphorylated Akt, a cell survival factor. These data suggest that VGF may protect neuronal cells by activation of cell survival signals. Furthermore, VGF increased with ER stress in retina of glaucoma model mice.

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：眼薬理学 緑内障

1. 研究開始当初の背景

緑内障は、我が国における中途失明原因の第1位を占める失明疾患であり、緑内障の40歳以上の平均有病率は約5%、20人に1人の割合で存在する(多治見スタディー)。しかし、眼圧降療法以外に緑内障に対して有効な治療法は存在せず、眼圧を十分に下降しても視野障害が進行する患者が多数存在する。したがって、緑内障の病態解明および直接網膜神経節細胞を保護するような治療法の開発が望まれている。近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などに代表される神経変性疾患において、神経細胞内に異常なタンパク質が凝集体を形成していることが報告され、その神経変性と小胞体ストレスとの関連性が注目されている。一方、アルツハイマー病患者において高率に緑内障を発症していることが疫学調査により明らかにされた。即ち、緑内障の発症率は健常者で5%に対してアルツハイマー病患者の緑内障発症率は26%であった。これらの知見から、緑内障とアルツハイマー病、特に小胞体ストレスの間になんらかの因果関係があることが推測される。これまで申請者らは、網膜神経節細胞死における小胞体ストレスの関与について検討し、それを初めて明らかにした。一方、網膜神経節細胞死における小胞体ストレスの関与に着目して研究しているのは、申請者ら以外にほとんどいない。

さらに申請者らは、小胞体ストレス細胞死を抑制する化合物を見出すことを目的にマウス由来培養網膜神経節細胞を用いてツニカマイシン誘発小胞体ストレス細胞死に対するスクリーニングを実施した。そのスクリーニングから小胞体ストレス細胞死を抑制するいくつかの天然成分および化合物を見出した。そのなかで、抗酸化作用および $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ チャネル遮断作用を有する(2S)-1-(4-amino-2,3,5-trimethyl phenoxy)-3-(4-[4-(4-fluorobenzyl)phenyl]-1-piperazinyl)-2-propanol dimethanesulfonate (SUN N8075)が最も強力にその細胞死を抑制することを見出した。一方、他の抗酸化剤および $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ チャネル遮断薬には明らかな保護作用は認められなかった。これらの結果から、SUN N8075の小胞体ストレスにより誘発される細胞死に対する保護作用は抗酸化および $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ チャネル遮断作用以外の新規な機序によることが示唆された。さらに、SUN N8075の保護作用が網膜以外の細胞においても認められるか否か確認するために、ヒト由来神経芽細胞腫(SH-SY5Y)を用いて同様の検討を実施した。その結果、SUN N8075はSH-SY5Y細胞においても同様にツニカマイシンによる細胞死を抑制した。そこで、SUN N8075の小胞体ストレス細胞死抑制作用の機序についてDNAマイクロアレイを用いた解析を行い、いくつかの標的候補分子を同定した。そのなかで、VGF nerve growth factor inducible (VGF)遺伝子の発現がSUN N8075処置単独およびツニ

カマイシン併用下において著明に増加することを見出し、その増加はリアルタイムRT-PCR解析においても確認された。VGFはエネルギーバランスの維持および海馬シナプスの可塑性への関与が報告されている神経分泌タンパク質で、神経栄養因子であるNerve growth factor (NGF)およびBrain-derived neurotrophic factor (BDNF)により誘導されることが知られている。興味深いことに、発達過程の外側膝状体においてVGFが高発現し、眼球内へのテトロドトキシン(TTX)投与により網膜から外側膝状体への神経伝達を遮断することにより外側膝状体のVGF発現が著明に低下することが報告されている。したがって、緑内障の病態進行過程において、外側膝状体内においても小胞体ストレスの増加およびVGFの発現低下が同時に起こっていることが予測される。つぎに、小胞体ストレス細胞死に対するSUN N8075の保護作用がVGFの発現を介しているか否かを検討したところ、VGF siRNAによるVGF発現抑制によりSUN N8075の保護作用はほぼ完全に消失した。さらに、一過性のVGF遺伝子導入によりツニカマイシン細胞死は有意に抑制された。これらの結果は、SUN N8075の小胞体ストレス細胞死に対する保護作用がVGFの発現を介しており、VGFが小胞体ストレス細胞死抑制作用を有することを強く示唆する。

2. 研究の目的

緑内障に代表される網膜疾患において、その網膜神経節細胞死の機序については十分に解明されていない。申請者らはその網膜神経節細胞死に小胞体ストレス負荷を介した機序が関与しているという仮説に基づき研究を進め、その網膜障害時に小胞体ストレスが誘導されることを初めて明らかにした。さらに、*in vitro*スクリーニングにより小胞体ストレス細胞死を抑制する新規化合物を見出し、それらの中で保護作用の最も強力であった化合物の作用機序の解析から、その保護作用が神経栄養因子により誘導される神経分泌タンパク質であるVGF nerve growth factor inducible (VGF)遺伝子の発現を介していることを明らかにした。本研究ではこれらの研究を更に発展させ、網膜疾患におけるVGFの関与並びにその細胞保護機構の解明およびVGFの新規治療ターゲットとしての可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)正常網膜におけるVGFの発現および網膜障害時の変化を検討

マウス緑内障モデルとして自然発症緑内障マウス(高眼圧マウス:DBA/2J)および正常マウス(C57BL/6J)15ヶ月齢を用いて、網膜における小胞体ストレス因子(GADD153/CHOP)およびVGFの発現を免疫染色またはWestern blottingにより検討した。麻酔下に経心的に生

理食塩液および4%パラホルムアルデヒド溶液により全身灌流することにより組織を固定し、眼球を摘出し、組織を凍結包埋液に包埋した。包埋後の凍結組織は50μmの厚さに薄切し、定法に従い抗VGF抗体および蛍光標識二次抗体を用いて蛍光染色した。

(2) 培養神経細胞における小胞体ストレス細胞死に対するVGFの作用の検討

マウス由来運動神経細胞およびハンチントン病モデル細胞(STHdhQ111/Q111)を96well plate中に播種し、24時間後に tunicamycin (終濃度2 μg/ml)添加または血清除去ストレスを惹起した。細胞障害はストレス開始24時間後に Hoechst 33342 及び propidium iodide(PI)による核蛍光染色により死細胞率(PI陽性細胞数/Hoechst陽性細胞数×100)を測定することにより評価した。STHdhQ111/Q111 および STHdhQ7/Q7 細胞：それぞれ CAG リpeat配列がノックインされたマウス線条体前駆細胞であり、グルタミンリpeatの多い Q111 細胞はハンチントン病態モデル細胞として用いられており、この異常タンパク質が細胞内で小胞体ストレスを惹起する。Q7 細胞はコントロールとして用いていた。

(3)VGF 遺伝子導入マウスの作製

マウス VGF 遺伝子をクローニングし、BDF1 マウス受精卵にマイクロインジェクション法により導入した。それにより誕生したマウス6系統(雄3系統、雌3系統)のVGF遺伝子導入マウス(F0)を野生型マウスと交配させ、誕生したマウス(F1)にVGF遺伝子が引き継がれていることをテイルカットにより得た組織からDNAを抽出し genotyping により確認した。さらに、それぞれの系統から誕生した VGF 遺伝子導入マウスの各組織における VGF 遺伝子の発現を RT-PCR、Western blotting および免疫染色により測定し、各系統の VGF 遺伝子導入マウスの各組織における VGF の発現レベルを定量した。各組織の摘出はペントバルビタール過麻酔により安楽殺させた後に摘出した。

4. 研究成果

(1) 正常網膜におけるVGFの発現および網膜障害時の変化を検討

正常網膜および視覚路におけるVGFの発現および網膜障害時の変化を検討に関して、正常マウス(C57BL/6J)および自然発症緑内障モデルマウス(DBA2J)の15ヶ月齢の網膜におけるVGFの発現について免疫染色により検討した。正常マウスでは網膜全層にわたり弱いVGF様免疫活性が認められた。それに対して、緑内障モデルマウスでは網膜におけるVGFの発現が著明に増加し、特に網膜神経節細胞層において強い発現の上昇が認められた(図1)。

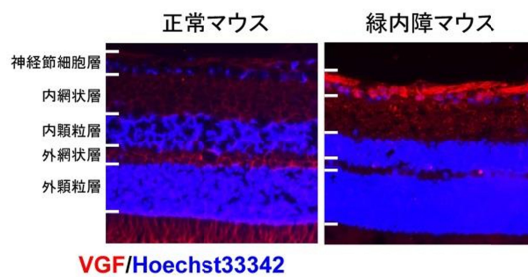


図1 正常および緑内障モデルマウス網膜におけるVGFの発現

さらに、CHOPの発現がDBA2Jマウス網膜において著明に増加していた。

(2) 培養神経細胞における小胞体ストレス細胞死に対するVGFの作用の検討

VGF活性ペプチドであるVGF588-617(AQEE30)は糖鎖修飾阻害剤であるツニカマイシンにより誘発した小胞体ストレスによる神経細胞障害に対して保護作用を示し、細胞生存促進因子であるAkt(v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene)/PKB(Protein Kinase-B)のリン酸化亢進作用を示した。これらのことから、VGFは細胞生存シグナルを活性化することにより神経細胞保護作用を発現していることが示唆された。さらに、AQEE-30は、血清除去により引き起こされるハンチントン病モデル細胞STHdhQ111の細胞死を濃度依存的に抑制した。しかし、同じくVGF由来のペプチドであるTLQP-21では保護効果は認められなかった。これらの結果より、VGF活性ペプチドであるAQEE30は小胞体ストレスによる神経細胞障害に対して保護作用を有することが示唆された。

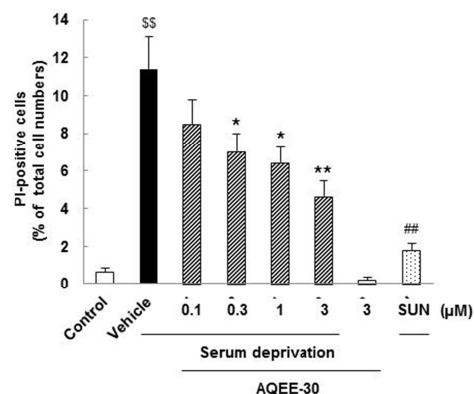


図2 血清除去ストレス誘発神経細胞死に対するVGF活性ペプチドの作用
SUN: SUN N8075

(3) VGF 遺伝子導入マウスの作製

VGF 遺伝子導入マウス用いて急性網膜障害および慢性緑内障モデルにおける網膜・視覚中枢障害に対する作用を検討するために、VGF 遺伝子導入マウスを作製した。現在、F0マウス6ラインを交配し、そのうち3ライン

について F3 以降まで系統維持に成功した。そのなかで 1 系統のマウス(429 Line)は F6 まで交配に成功し、各種臓器における VGF 遺伝子の発現を検討したところ野生型マウスと比較して著明な VGF 遺伝子発現の上昇が認められた(図 3)。特に、網膜における発現が野生型マウスの網膜と比較して約 40 倍増加した。

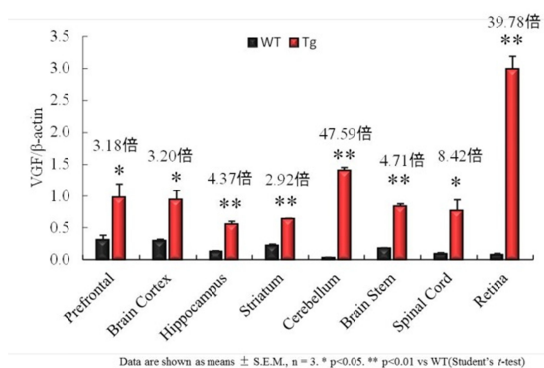


図 3 VGF 遺伝子導入マウスの各臓器における VGF 遺伝子発現の検討
WT: 野生型マウス、Tg:VGF 遺伝子導入マウス

VGF タンパク質の発現についても網膜において最も増加していた。今後、これらのマウスを 9 世代以上まで戻し交配した後に網膜障害に対する作用を検討する予定である。

以上、小胞体ストレスによる神経細胞死に対して VGF は保護作用を示し、緑内障において VGF の発現が増加していることを明らかにした。

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)

Shimazawa, M., Nakamura, S., Miwa, M., Tsuruma, K., Aihara, M., Nakamura, K., Hara, H. Establishment of the ocular hypertension model using the common marmoset. *Exp Eye Res*, 査読有り, 111, 1-8, 2013.

Ito, Y., Shimazawa, M., Tsuruma, K., Mayama, C., Ishii, K., Onoe, H., Aihara, M., Araie, M., Hara, H. Induction of amyloid-beta(1-42) in the retina and optic nerve head of chronic ocular hypertensive monkeys. *Mol Vis*, 査読有り, 18, 2647-2657, 2012.

Shimazawa, M., Miwa, A., Ito, Y., Tsuruma, K., Aihara, M., Hara, H. Involvement of endoplasmic reticulum stress in optic nerve degeneration following N-methyl-D-aspartate-induced retinal damage in mice. *J Neurosci Res*, 査読有り, 90, 1960-1969, 2012.

Shimazawa, M., Ito, Y., Inokuchi, Y., Yamanaka, H., Nakanishi, T., Hayashi, T., Ji, B., Higuchi, M., Suhara, T., Imamura, K., Araie, M.,

Watanabe, Y., Onoe, H., Hara, H. An Alteration in the Lateral Geniculate Nucleus of Experimental Glaucoma Monkeys: In vivo Positron Emission Tomography Imaging of Glial Activation. *PLoS One*, 査読有り, 7, e30526, 2012.

Yamauchi, M., Tsuruma, K., Imai, S., Nakanishi, T., Umigai, N., Shimazawa, M., Hara, H. Crocetin prevents retinal degeneration induced by oxidative and endoplasmic reticulum stresses via inhibition of caspase activity. *Eur J Pharmacol*, 査読有り, 650, 110-119, 2011.

[学会発表](計 1 件)

嶋澤 雅光、原 英彰．緑内障の病態解明と神経保護をターゲットとした薬物治療の現状と将来展望 第 32 回 日本眼薬理学会(招待講演)。(大津、2012、9、15-16)

6. 研究組織

(1)研究代表者

嶋澤 雅光 (SHIMAZAWA MASAMITSU)
岐阜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：80381721

(2)研究分担者

原 英彰 (HARA HIDEAKI)
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：20381717