

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791837

研究課題名(和文) 視細胞に必須の抗酸化酵素：遺伝性網膜変性における役割について

研究課題名(英文) Role of antioxidant enzyme in inherited retinal degeneration

研究代表者

小畑 亮 (Obata, Ryo)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80625434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性網膜変性に対する抗酸化療法については基礎研究レベルでは多数の候補物質が報告されている。最近グルタチオンペルオキシダーゼ4 (Gpx4) が視細胞にとって必須の抗酸化酵素である事が見出されたため、本研究ではGpx4の遺伝性網膜変性への関与について検討した。その結果、遺伝性網膜変性モデルマウスにおいて、Gpx4が網膜変性の進行に関与する知見を得た。Gpx4は遺伝性網膜変性疾患における進行抑制治療のターゲット候補となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A lot of materials were reported as candidates for antioxidant therapy of hereditary retinal dystrophy. Since glutathione peroxidase 4 (GPx4), one of the antioxidant enzymes, was found essential for maturation of photoreceptor cells recently, we studied the role of GPx4 on hereditary. As a result GPx4 was associated with progression of retinal atrophy in a murine model of inherited retinal degeneration. Therefore, GPx4 was suggested to be a novel candidate of the target for antioxidant therapy against inherited retinal degeneration.

研究分野：網膜

キーワード：網膜変性 抗酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

遺伝性網膜変性の多くは治療がなく、世界各地において主要な失明原因となっている。これまでも酸化ストレスが網膜変性の進行の原因となっていることを多くの報告が示唆しており、抗酸化療法の可能性が示唆されている。その根拠としては、例えば酸素過負荷による光酸化ストレスは網膜変性モデルとして頻りに用いられているモデルであることが挙げられる。また、網膜変性モデル動物の網膜では、過酸化脂質が認められ、酸化ストレスあるいは抗酸化機能の破綻が網膜障害へ関与する可能性が考えられている。さらに、抗酸化酵素を投与することで、網膜変性を抑制できることも報告されている¹。したがって、抗酸化酵素は視細胞に対して保護効果を示すといえるが、その分子メカニズムについてはいまだ明らかではない。グルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPx4) はヒドロペルオキシダーゼの一種であり、細胞膜に生じた過酸化脂質を除去する。GPx4 は 3 種の局在性を有し、細胞質、ミトコンドリア、核内にそれぞれ局在する²。GPx4 ノックアウトマウスは胎生 8 日において致死である。3 種の GPx4 のうち、ミトコンドリア型 GPx4 のみノックアウトしたマウスでは男性不妊となることが報告されている。神経特異的に GPx4 を欠損したコンディショナルノックアウトマウスでは神経変性を生じる³ことが知られている。最近われわれは、GPx4 の視細胞特異的ノックアウトマウスを作成し、これを用いて視細胞における GPx4 の機能について検討した。野生型マウスにおいて GPx4 は視細胞内節ミトコンドリアに局在しており、ミトコンドリア型 GPx4 が視細胞において主要なサブタイプであることを明らかにした。また Cre-loxP system を用いて、GPx4 の視細胞特異的ノックアウトマウスの解析を行った結果、視細胞は生後 12 日目までに錐体と杆体に分化する

が、生後 21 日までに著明な変性を呈し、完全に消失してしまうということが確認できた。さらに、この視細胞死にはアポトーシス誘導因子 (AIF) の核内移行が関連していた。アポトーシスを生じる前の生後 11 日目での視細胞においては、ミトコンドリアが減少することを見出した。

以上より、GPx4 は細胞の成熟化と維持に不可欠な因子であることが示唆された⁴。

GPx4 の機能をより解析することによって、視細胞の変性疾患の発症機序、治療法の開発に役立つことが期待できる。

2. 研究の目的

これまでの検討では GPx4 が視細胞の生存維持に不可欠であり、GPx4 コンディショナルノックアウトマウスの視細胞は生後すぐにアポトーシスを生じることが明らかになっている。本研究では視細胞のアポトーシスを生じることが知られている網膜変性モデルマウス Rd1 をもちいて、GPx4 がどのような役割を担っているかを検討し、さらに網膜変性モデルマウスにおける GPx4 をターゲットとした治療法の可能性を検討することを目的とした

3. 研究の方法

GPx4 コンディショナルノックアウトマウスでは、視細胞の変性が急速であり、GPx4 の機能を解析することは困難である。しかし、GPx4^{+/-}-ヘテロ欠損マウスでは正常な網膜表現形を有するため、これと GPx4^{+/+}マウスを比較検討することで、GPx4 の機能解析が可能になると考えられる。

1) GPx4 の発現減少による遺伝性網膜変性への影響

GPx4^{+/-}マウスを用いることで Rd1 のバックグラウンドで GPx4^{+/-}と GPx4^{+/+}のマウスを作成した。Rd1 マウスは遺伝性網膜変性モデルマウスであり、生後 12 から 21 日の間に完全に杆体視細胞が細胞死することがわかっている。生後 12, 16, 及び 21 日において眼球

摘出し、病理学的に視細胞層の評価を行い、GPx4の有無による視細胞萎縮の相違について検討した。

2)網膜における GPx4 のミトコンドリアへの影響

GPx4^{+/-}-マウスおよび GPx4^{+/+}マウスの網膜において、ミトコンドリア DNA を定量的に評価した。

3)網膜色素上皮細胞の貪食機能における GPx4 の役割

網膜色素上皮細胞の cell line を用いて、視細胞外節を貪食させた後の GPx4 の発現を検討した。

4. 研究成果

1)GPx4 の発現減少による遺伝性網膜変性への影響

Rd1 マウスに GPx4^{+/-}を掛けあわせたマウスは、GPx4^{+/+}を掛けあわせたマウスと比較して、GPx4 の発現が減少し、網膜変性進行がはやいという所見を得た。この結果から、遺伝性網膜変性においても抗酸化酵素 GPx4 が細胞の生存に関与していることが示唆された。眼科臨床において、遺伝性網膜変性に対して根治治療がほとんどなく、多くは進行性である。GPx4 が視細胞死滅を抑制する役割を担うのであれば、当因子をターゲットとして抗酸化サイクルを活性化させることにより、網膜変性の進行を遅延できる可能性が示唆された。

2)網膜における GPx4 のミトコンドリアへの影響

GPx4^{+/-}-マウスの網膜は、GPx4^{+/+}マウスの網膜と比較して、ミトコンドリア DNA 量が減少していた。この結果から、GPx4^{+/-}-マウスは正常な網膜表現型を呈するにも関わらず、ミトコンドリアにおける活性が低下していると考えられる。この活性低下の長期的な影響についてはさらなる検討が必要だが、GPx4 の欠損だけでなく減少においても網膜障害を呈する可能性が示唆され、各種の網膜変性疾

患における関与や、萎縮抑制のための抗酸化治療のターゲットとして GPx4 が有望な候補となりうる。

3)網膜色素上皮細胞の貪食機能における GPx4 の役割

網膜色素上皮細胞の cell line を用いて、視細胞外節を貪食させた後の GPx4 の発現を検討したところ、GPx4 の発現が上昇していた。網膜色素上皮細胞は視細胞外節の貪食・代謝を含めた様々な視細胞生存のための役割を有する。網膜色素上皮細胞下に沈着したドローゼンなどにより加齢黄斑変性などの疾患が生じることが分かっており、加齢黄斑変性の発症は酸化ストレスが関与していること、抗酸化物質の投与により加齢黄斑変性の発症が抑制されることが示されている⁵。更には GPx4^{+/-}、GPx4^{+/+}、GPx4 過剰発現マウスの比較することで、GPx4 により血管新生促進因子である血管内皮成長因子 (VEGFA) が抑制され、脈絡膜新生血管の発生が減少することを見出した⁶。脈絡膜新生血管は加齢黄斑変性において急激な網膜障害を呈する表現形であるため、GPx4 が加齢黄斑変性に対して抗酸化作用を介して進行予防に寄与する可能性も示唆される。

以上の結果から、GPx4 の欠損はミトコンドリアの活性低下を生じ、網膜変性を促進させる。今後酸化ストレスの関与が示唆される網膜変性および黄斑変性において、GPx4 の役割を更に検討する事により、進行抑制などの治療法につながる可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Lu, L., Oveson, B. C., Jo, Y. J., Lauer, T. W., Usui, S., Komeima, K., ... & Campochiaro, P. A. (2009). Increased expression of glutathione peroxidase 4 strongly protects retina from oxidative damage. *Antioxidants & redox signaling*, 11(4), 715-724.

2. Maiorino, M., Scapin, M., Ursini, F., Biasolo, M., Bosello, V., & Flohé, L. (2003). Distinct promoters determine alternative transcription of gpx-4 into phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase variants. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 34286-34290.
3. Wirth, E. K., Conrad, M., Winterer, J., Wozny, C., Carlson, B. A., Roth, S., ... & Schweizer, U. (2010). Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. *The FASEB Journal*, 24(3), 844-852.
4. Ueta, T., Inoue, T., Furukawa, T., Tamaki, Y., Nakagawa, Y., Imai, H., & Yanagi, Y. (2012). Glutathione peroxidase 4 is required for maturation of photoreceptor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7675-7682.
5. Chew, E. Y., Clemons, T. E., Agron, E., Sperduto, R. D., Sangiovanni, J. P., & Kurinij, N. (2013). Age-related Eye Disease Study Research Group Long-term effects of vitamins C and E, -carotene, and zinc on age-related macular degeneration: AREDS report no. 35. *Ophthalmology*, 120(8), 1604.
6. Roggia, M. F., Imai, H., Shiraya, T., Noda, Y., & Ueta, T. (2014). Protective role of glutathione peroxidase 4 in laser-induced choroidal neovascularization in mice. *PLoS one*, 9(6), e98864.

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:

出願年月日:

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

小畑 亮 (OBATA, Ryo)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 80625434

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：