



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Impact of Proteasomal Dysfunction in Sensory Retina [an abstract of entire text]
Author(s)	安藤, 亮
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2069 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11197号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55649
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Ando_summary.pdf



学位論文（要約）

Impact of Proteasomal Dysfunction in Sensory Retina

(感覚網膜におけるプロテアソーム機能不全の影響)

2014 年 3 月

北海道大学

安藤 亮

背景と目的

ユビキチンプロテアソームシステム (ubiquitin proteasome system, UPS) は主要なタンパク質分解経路の一つであり、細胞内におけるタンパク質の quality control に寄与している。UPS の機能不全はアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病のような神経変性疾患発症のトリガーであることが知られている。眼における神経変性疾患である網膜色素変性のうち、misfolding を引き起こすロドプシン変異や E3 ユビキチンリガーゼ構成タンパク質の変異では UPS 機能低下が示唆されている。これらの報告から、UPS 機能低下は原因が多岐にわたる網膜色素変性においてもその病態に関与していることが示唆される。

UPS においてタンパク質分解を担う酵素複合体プロテアソームは3つのタンパク質分解酵素サブユニット $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ を持つ。プロテアソーム機能の低下はアルツハイマー病、パーキンソン病などのヒト神経変性疾患の組織で報告されており、したがってプロテアソーム機能の低下が同様に網膜色素変性を引き起こすかは大変興味深い点である。しかし $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ を含んだプロテアソームサブユニットの遺伝子を欠失させることは胎生致死であるため、生体内でプロテアソーム機能を低下させることが眼組織にどのような影響を与えるのかを検討した報告は今までされていない。

近年報告された $\beta 5$ t トランスジェニックマウス ($\beta 5$ t-Tg) は、本来胸腺に特異的に発現している $\beta 5$ t を全身に遺伝子導入することでプロテアソーム機能を低下させた新奇のマウスである。今回我々はこの $\beta 5$ t-Tg マウスを用いて、網膜におけるプロテアソーム機能が低下することで網膜にどのような変化が生じるのか検討をおこなった。その結果、視細胞のある網膜外層が経時的に変性することが分かったため、さらに変性の分子機構についても若干の検討を追加しておこなった。

材料と方法

$\beta 5t$ -Tg マウスと、その littermate control (CTR) マウスを用いて比較検討をおこなった。網膜における $\beta 5t$ タンパク質について免疫染色、ウェスタンブロットを用いて検討した。眼底カメラを用いた眼底検査で表現型を、ヘマトキシリン-エオジン染色で眼球組織切片の組織学的検討および網膜厚の測定を、網膜電図を用いて網膜機能の評価をおこなった。組織学的検討では、超薄切片の電子顕微鏡検査もおこなった。ロドプシンタンパク質の細胞内異所性の有無を検討する目的では免疫染色をおこなった。組細胞死の検出は TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) assay を用い、視細胞死経路の検討では TUNEL assay と免疫染色 (caspase-3、caspase-9、apoptosis-inducing factor (AIF)) を組み合わせた。さらに網膜抽出液の caspase-3 と caspase-9 の酵素活性を assay kit を用いて測定した。

結果

網膜における $\beta 5t$ の発現と局在を確認するために、ウェスタンブロットと免疫染色をおこなった。ウェスタンブロットでは $\beta 5t$ -Tg マウスでのみ $\beta 5t$ に相当するバンドを検出した。免疫染色では $\beta 5t$ -Tg マウスの網膜全体に $\beta 5t$ が局在していたが、CTR マウスでは染色されなかった。これらのことは、 $\beta 5t$ -Tg マウスの網膜でのプロテアソーム機能の低下を間接的に示している。

$\beta 5t$ -Tg マウスの眼底検査では白点が眼底に多発し、網膜萎縮や網膜動脈の狭細化がみられた。網膜の組織学的検討では 6 ヶ月齢、9 ヶ月齢ともに、内顆粒層 (INL) の厚さは両者に差が無かったのに対し、視細胞の核である外顆粒層 (ONL) の厚さは $\beta 5t$ -Tg マウスで菲薄化していた。ONL 厚を INL 厚で補正した結果、6 ヶ月齢 (CTR マウス vs. $\beta 5t$ -Tg マウス; 1.66 ± 0.03 vs. 0.86 ± 0.02 , $p < 0.001$) でも 9 ヶ月齢 (1.49 ± 0.02 vs. 0.63 ± 0.04 ,

p<0.001)でも統計学的有意な差が認められた。電子顕微鏡による視細胞外節の検討では両マウスで差異は認められなかった。網膜電図検査では、視細胞の機能を示す a 波の振幅が $\beta 5t\text{-Tg}$ マウスで有意に低下していた。視細胞におけるタンパク質の異所性の有無を確認する目的でおこなったロドプシンの免疫染色の結果では、 $\beta 5t\text{-Tg}$ マウスにロドプシンの異所性はなく、CTR マウスと相違がなかった。TUNEL 染色では $\beta 5t\text{-Tg}$ マウスの外顆粒層に陽性細胞を有意に多く認めた。以上の結果は、視細胞が経時的に細胞死に至り、網膜外層が変性していることを示している。

最後に、視細胞死の経路の検討で行った網膜抽出液の caspase-3 と caspase-9 の活性測定では、 $\beta 5t\text{-Tg}$ マウスと CTR マウスで差は認められなかった。cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 の免疫染色と TUNEL の共染色では cleaved caspase-3 も cleaved caspase-9 も陰性であった。一方、AIF の免疫染色では TUNEL 陽性細胞に一致して AIF の核内移行がみられ、 $\beta 5t\text{-Tg}$ マウスの視細胞死には caspase-independent pathway が関与していることが示唆された。

考察

今回の検討で、i)プロテアソーム機能の低下は *in vivo* で視細胞死による網膜変性を惹起すること、ii)視細胞変性は視細胞関連タンパク質の遺伝子変異がなくても生じること、iii)プロテアソーム機能障害は caspase-independent 経路で視細胞のアポトーシスを誘導することが明らかとなった。我々の知りうる限り、この報告は *in vivo* で網膜におけるプロテアソーム機能障害について検討した初めての報告である。

前述したようにプロテアソームの機能の低下は全身の神経変性疾患、例えばパーキンソン病患者の黒質や、アルツハイマー病患者の海馬と海馬傍回で報告されている。したがって、プロテアソーム機能障害が網膜色素変性などの眼における神経変性を生

じることは十分考えられ、今回の検討結果はこの仮説を支持するものであった。

過去の報告において、様々な視細胞関連タンパク質の変異が網膜色素変性の原因として明らかにされているが、最も多いものはロドプシンの変異である。変異ロドプシンタンパク質は細胞内に異所性に蓄積することがこれまで報告されており、それが視細胞変性に関わっている可能性が示唆されている。今回の検討でも、プロテアソーム機能不全によって細胞内へのタンパク質蓄積が生じる可能性を考え、ロドプシンに注目して視細胞におけるその局在を免疫染色で調べた。しかしながら、結果としてロドプシンの異所性蓄積は認められず、 $\beta 5t$ -Tg マウスと CTR マウスの差異もなかった。

視細胞死の経路については、細胞死の機序としてアポトーシスを想定し、caspase-dependent pathway における主要因子 caspase-3 と caspase-9 について検討したが、両者の関与は否定的だった。一方 AIF 免疫染色では、TUNEL 陽性細胞に一致した AIF の核内移行がみられ、視細胞死は caspase-independent pathway を介することが示唆された。

視細胞変性疾患の中でも網膜色素変性はその患者数も多く失明数が多い。したがって、今回の研究が網膜色素変性の病態解明につながるものであれば、その意義は非常に大きい。しかしながら、当該モデルを網膜色素変性モデルと規定するには検討の不足している点がいくつかある。まず網膜におけるプロテアソーム機能低下を直接確認できていない点、そしてアポトーシスを生じた視細胞が桿体細胞か錐体細胞か、もしくは両方なのかを検討していない点などである。これらの点に関しては現在検討中である。

結論

今回の研究から得られた新知見は、網膜におけるプロテアソーム機能不全は視細胞

変性を誘導することと、その変性は caspase-independent pathway を介したアポトーシスである可能性の二点である。前述したように、ヒト網膜色素変性では変異タンパク質の蓄積によって UPS 機能が低下するものが多くあり、 $\beta 5t$ -Tg マウスはそれらの共通部分を模したものと言えるかもしれない。あるいは、原因遺伝子が不明な網膜色素変性の中にはプロテアソーム機能が低下することで発症しているものがあるということを示唆しているのかもしれない。考察で述べた今後検討すべき点を解決することで、より深い理解を得ることができるだろう。

プロテアソーム機能不全マウスという新奇のモデルマウスを用いて、その機能不全が視細胞変性を生じることを証明した今回の結果は新奇性がある。しかしながら、プロテアソーム機能不全が視細胞変性を生じる機序については今後さらに検討すべき点を多く有しており、今後はこのマウスの眼所見とヒトの眼疾患とをさらに関連付けられるように、検討をさらに重ねたいと考えている。