



Title	Impact of Proteasomal Dysfunction in Sensory Retina
Author(s)	安藤, 亮
Description	配架番号 : 2069
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11197号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11197
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58163
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Ando.pdf



学 位 論 文

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

学 位 論 文

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

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	6 頁
実験方法	7 頁
実験結果	10 頁
考察	22 頁
総括および結論	24 頁
謝辞	25 頁
引用文献	26 頁

本文における図、表の一部は *Investigative Ophthalmology & Visual Science* へ投稿中のもの
のと同じであり、アクセプト後にはその雑誌に掲載される予定である。

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Ryo Ando, Satoru Kase, Tsutomu Ohashi, Zhenyu Dong, Junichi Fukuhara, Atsuhiko Kanda, Miyuki Murata, Kousuke Noda, Nobuyoshi Kitaichi, and Susumu Ishida
“Tissue factor expression in human pterygium”
Molecular Vision 2011; 17:63-69
2. Ryo Ando, Kousuke Noda, Shiho Namba, Wataru Saito, Atsuhiko Kanda, and Susumu Ishida
“Aqueous humour levels of placental growth factor in diabetic retinopathy”
Acta Ophthalmologica 2013 Aug 3. [Epub ahead of print]
3. Ryo Ando, Kousuke Noda, Utano Tomaru, Mamoru Kamoshita, Yoko Ozawa, Shoji Notomi, Toshio Hisatomi, Mika Noda, Atsuhiko Kanda, Tatsuro Ishibashi, Masanori Kasahara, and Susumu Ishida
“Decreased Proteasomal Activity Causes Photoreceptor Degeneration in Mice”
Investigative Ophthalmology & Visual Science 〜投稿中

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Ryo Ando, Satoru Kase, Tsutomu Ohashi, Zhenyu Dong, Junichi Fukuhara, Atsuhiko Kanda, Miyuki Murata, Kousuke Noda, Susumu Ishida
“Tissue Factor Expression In Human Pterygium”
The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2011 Annual Meeting、2011年5月3日（火）、Greater Ft. Lauderdale/Broward County Convention Center（米国）
2. 安藤亮、加瀬諭、大橋勉、董震宇、福原淳一、アントンレニコフ、神田敦宏、村田美幸、野田航介、石田晋
「翼状片における Tissue Factor の発現」
第 115 回日本眼科学会総会、2011 年 5 月 12 日（木）、東京国際フォーラム（東京）

3. 安藤亮、野田航介、外丸詩野、鴨下衛、小澤洋子、納富昭司、久富智朗、神田敦宏、石田晋
「プロテアソーム機能低下と視細胞変性」
第 17 回眼科分子生物学会、2013 年 2 月 23 日（土）、ホテルアンビア松風閣（静岡）
4. 安藤亮、野田航介、外丸詩野、野田実香、高階沙織、董陽子、木下哲志、福原淳一、董震宇、神田敦宏、石田晋
「プロテアソーム機能不全による網膜変性」
第 117 回日本眼科学会総会、2013 年 4 月 5 日（金）、東京国際フォーラム（東京）
5. Ryo Ando, Kousuke Noda, Utano Tomaru, Mamoru Kamoshita, Yoko Ozawa, Shoji Notomi, Toshio Hisatomi, Atsuhiko Kanda, Susumu Ishida
「Decreased Proteasomal Activity Causes Retinal Degeneration in Mice」
The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2013 Annual Meeting、2013 年 5 月 8 日（水）、Washington State Convention Center（米国）
6. 安藤亮、野田航介、難波志帆、石嶋漢、藤谷顕雄、吉沢史子、新明康弘、齋藤航、神田敦宏、石田晋
「糖尿病網膜症における前房水中 PIGF 濃度の検討」
第 67 回日本臨床眼科学会、2013 年 11 月 2 日（土）、パシフィコ横浜（神奈川）

諸言

糖尿病網膜症や加齢黄斑変性は日本人の失明原因疾患の2位と4位であり(2006年厚生労働省)、患者数は増加の一途をたどっている。両者の共通点として生活習慣病であることと血管新生疾患であることが挙げられる。近年、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)を標的とした抗VEGF抗体の硝子体投与が可能となり、眼科学の治療は大きく前進した。しかし、今なお治療に抵抗して失明となる場合や治療に対する副作用の問題が立ちはだかっている。したがって、血管新生眼疾患についての探求が強く求められている。

そこに強い興味を抱いて進めてきた研究についてこれから述べる。まず網膜という眼球内の後部の組織よりもアプローチが容易である角結膜疾患、その中の翼状片について研究を開始した。翼状片は紫外線などの外的刺激によって結膜上皮細胞が角膜輪部を越えて伸展する良性の増殖性疾患であるが、病理学的に上皮腫瘍と類似した性質も持っている。そこで上皮腫瘍の浸潤や転移への関与が報告されている tissue factor に注目し、手術で切除した翼状片組織を用いて検討した。その結果、tissue factor が正常結膜上皮に比べ有意に多く発現し、上皮間葉移行に関わっている可能性を示した¹。

次に、糖尿病網膜症患者の前房水を用いた検討をおこなった。近年臨床応用された抗VEGF治療薬の中にはVEGFだけでなく、VEGFファミリーに属する胎盤成長因子(placental growth factor, PlGF)も抑制するものがあり、今後糖尿病網膜症治療に広く一般的に用いられると考えられている。そこで、このPlGFに注目して糖尿病黄斑浮腫、増殖糖尿病網膜症、血管新生緑内障と病期毎に群分けして前房水中の濃度を検討した。その結果、3群とも正常コントロールに比べPlGFが高値であり、特に血管新生緑内障で著明に増加していた。このことからPlGFが糖尿病網膜症の病態に関与している可能性、そしてこれまでに知られていた後眼部病変への関与だけでなく前眼部病変への強い関与を示唆していることを示した²。

最後に、プロテアソーム機能不全マウスを用いてプロテアソーム機能低下に関わる網膜変化について検討した。このマウスは加齢変化が早期に進行する早老症のモデルとして2012年に報告されている³。加齢変化が進行するとヒト加齢黄斑変性に類似した病態が作られるのではないかと興味を抱き、このマウスについての研究を始めた。実際そのマウスの眼底には白斑が多発しており、加齢黄斑変性モデルであるという思いを強めたが、組織学的に検討した結果ヒト加齢黄斑変性の特徴的所見である網膜色素上皮下の沈着物はなく、進行性の視細胞変性モデルであることが判明した。それは網膜色素変性に類似しており、このマウスの検討は網膜色素変性もしくはその他の視細胞変性疾患の病態解明に繋がられる可能性を秘めていた。網膜色素変性は前述した糖尿病網膜症や加齢黄斑変性に並び、日本人失明原因疾患の3位と上位にある遺伝性疾患である。血管新生疾患ではないものの、このマウスの検討は眼科学にとって大き

な意味のあるものと考えて研究を続けた。その結果、網膜におけるプロテアソームの機能障害が視細胞変性を起こすことを見出した。以下に、本マウスが視細胞変性を生じることが判明した後に考察した内容について述べる。

網膜色素変性は遺伝性の網膜変性疾患であり、視細胞が変性することで失明に至る。その原因遺伝子は多岐にわたるが、不明なものも多く存在している⁴。常染色体優性遺伝の中では視物質を形成しているロドプシンタンパク質の変異が最も多く、現在 100 以上の遺伝子変異が報告されている (RetNet <https://sph.uth.edu/RetNet/home.htm>)。

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⁵⁻⁷。眼においては、網膜色素変性の一つの原因である変異ロドプシンタンパク質は正常に折りたたまれずに細胞質で凝集し、UPS 機能の低下を引き起こすことが報告されている^{8,9}。また、常染色体優性遺伝を示す網膜色素変性の原因遺伝子として発見された *KLHL7* は、UPS 内の E3 ユビキチンリガーゼ複合体のサブユニットをコードしている遺伝子である^{10,11}。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 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ を含み、それぞれカスパーゼ様酵素活性、トリプシン様酵素活性、キモトリプシン様酵素活性を有する^{12,13}。プロテアソーム酵素活性、つまりプロテアソーム機能の低下はアルツハイマー病¹⁴、パーキンソン病^{15,16}などのヒト神経変性疾患の組織で報告されている。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なされていない。

2012 年、共同研究者の外丸詩野らは $\beta 5t$ 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トランスジェニックマウスを報告した³。 $\beta 5t$ は、近年発見された胸腺特異的に発現する $\beta 5$ 様の 20S プロテアソームサブユニットである¹⁷。 $\beta 5t$ は $\beta 5$ よりもキモトリプシン様活性が弱く、また $\beta 5$ よりも優先的に 20S に組み込まれるため¹⁸、生体内で $\beta 5t$ を過剰発現させるとプロテアソーム機能が低下する。プロテアソーム機能は年齢とともに低下して加齢に関連する病態や老化現象そのものに関わっていることが知られているおり¹⁹、このプロテアソーム機能が低下しているマウスでも加齢性変化が加速して脊椎の彎曲や皮下脂肪の減少、骨格筋の変性などが見られる³。

今回我々は、この $\beta 5t$ トランスジェニックマウス ($\beta 5t$ -Tg) 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起こるのかに興味を持ち検討をおこなった。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。

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AIF	apoptosis-inducing factor
CTR	control
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GCL	ganglion cell layer
HE	hematoxylin and eosin
INL	inner nuclear layer
IPL	inner plexiform layer
IS	inner segment
ONL	outer nuclear layer
OPL	outer plexiform layer
OS	outer segment
PBS	phosphate-buffered saline
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Tg	transgenic
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
UPS	ubiquitin proteasome system

実験方法

1. 動物

共同研究者である外丸詩野博士（北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野）³ から譲り受けた $\beta 5t$ -Tg マウスとその littermate control (CTR) マウスを用いた。マウスは温湿度の調整された昼夜 12 時間サイクルの動物実験施設においてプラスチックケース内で飼育された。動物実験は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に則り、おこなった。

2. 蛍光免疫染色

安楽死後にマウスの眼球を摘出し 4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋後に切片を作成した。キシレンとエタノールで脱パラフィンした後、10 mM クエン酸バッファー (pH 6.0) 内で電子レンジを用いて抗原賦活化を行った。切片は 5% 正常ヤギ血清と 0.05% Triton X-100 を含有する phosphate buffered saline (PBS) で室温 1 時間かけてブロッキングをおこなった。その後、以下の抗体を用いて一次抗体反応をおこなった (rabbit polyclonal antibody against $\beta 5t$ (1:250 dilution; Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan); mouse monoclonal antibody against rhodopsin (4D2, 1:1000 dilution; Merck Millipore, Billerica, MA); rabbit polyclonal antibody against cleaved caspase-3 (1:100 dilution; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), cleaved caspase-9 (1:50 dilution; Cell Signaling Technology) and apoptosis-inducing factor (AIF) (1:100 dilution; R&D Systems, Minneapolis, MN))。PBS で 5 分 3 回洗浄した後、Alexa Fluor 488 または 546 (Life Technologies, Carlsbad, CA) をラベルした二次抗体で蛍光標識し、核は 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) で染色した。切片は BZ-9000 蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) で観察した。

3. ウェスタンブロッティング

安楽死後にマウスの眼球を摘出、顕微鏡下において氷上で網膜組織を摘出して 120 μ l の RIPA buffer (Cell Signaling Technology) に入れて超音波処理を行った。溶解液を 14,000 $\times$ g、20 分間、4°C で遠心し上清を試料として得た。Sample buffer と混合した試料は、必要に応じて加熱処理した後 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で分離し、polyvinylidene fluoride membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) に転写した。メンブレンは 5% skim milk を含有する Tris buffered saline でブロッキングし、以下の抗体を用いて一次抗体反応をおこなった：rabbit polyclonal antibody against $\beta 5t$ (1:1000 dilution; Medical & Biological Laboratories)、mouse monoclonal antibody against rhodopsin (4D2, 1:1000 dilution; Merck Millipore)。その後、horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:4000 dilution; Jackson

ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)を用いて室温で1時間インキュベートした。メンブレンは chemiluminescence (Western Lightning Ultra; PerkinElmer, Waltham, MA) で蛍光発色させた後、luminescent image analyzer (LAS-4000; Fujifilm)で観察した。

4. 眼底写真

マウスに 0.5% tropicamide、0.5% phenylephrine (Santen Pharmaceutical Co., Osaka, Japan) を点眼し散瞳させた後、3CCD color video camera (Power HA-D, SONY, Tokyo, Japan)を接続した眼底カメラ(CF-60UVi, Canon, Tokyo, Japan)に 40D lens (Volk, Mentor, OH)を取り付けて眼底写真を撮影した。

5. 組織学的検討

Hematoxylin and eosin (HE)染色をおこなうにあたり、安楽死後に摘出した眼球は 4% glutaraldehyde に室温で 1 時間、その後 4%パラホルムアルデヒドを用いて固定した。パラフィン包埋後切片化し、HE 染色をおこなった。BZ-9000 顕微鏡 (Keyence)と BZ-II Analyzer (Keyence)を用いて、染色切片の観察と網膜厚測定をおこなった。網膜厚測定では、視神経乳頭から両側に 400、800、1200、1600、2000 μm 離れた 10 点の外顆粒層と内顆粒層の厚さを測定した。外顆粒層厚の比較は既報を参考に内顆粒層で補正しておこなった^{20,21}。また、視細胞外節長は視神経乳頭から約 600 μm の部分で測定し、こちらも内顆粒層厚で補正して比較した。

電子顕微鏡検査では、摘出した眼球の角膜輪部に割を入れた後に 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer に入れて 4°Cで固定した。固定眼球は 2% aqueous OsO_4 で 1.5 時間後固定し、脱水後に epoxy resin で包埋した。超薄切片を saturated aqueous uranyl acetate と Sato's lead stain で染色し、Hitachi H-7700 電子顕微鏡(Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan)で観察した。

6. 網膜電図

12 時間以上暗順応させたマウスに対し、暗赤色灯下でペントバルビタール (70 mg/kg) 腹腔内注射により麻酔し、保温パッド上で以下の処置をした。0.5% tropicamide、0.5% phenylephrine (Santen Pharmaceutical Co.)を点眼し散瞳させた。接地電極は尾の皮下に針で刺し、基準電極は口腔内に設置した。関電極として金線を角膜に設置した。応答は差動増幅され、0.313 から 1000 Hz の範囲のデジタルバンドパスフィルターを通ることで a 波と b 波が得られ、PowerLab System 2/25 (AD Instruments, New South Wales, Australia)を用いて記録した。光刺激は Ganzfeld System SG-2002 (LKC Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)を用いて 800 $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ 、0.004 秒間照射した。電極インピーダンスの監視は各動物の測定前後で行った。a 波の振幅はベースラインから a 波のトラフまでと

して測定した。

7. TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling)染色

断片化された DNA を同定するためにパラフィン切片を用いて TUNEL 染色 (Fluorescein Direct In Situ Apoptosis Detection Kit; Merck Millipore) を説明書に沿っておこなった。

8. Caspase 活性の測定

網膜の caspase-3 および caspase-9 活性をそれぞれの colorimetric protease assay kits (Medical & Biological Laboratories)を用いて測定した。安楽死後にマウスの眼球を摘出し、網膜組織を単離して cell lysate buffer 150 μ l に入れた。超音波処理を行い 10,000 $\times$ g、10 分間、4℃で遠心して得た上清を用いて説明書通りに処理をおこなった。吸光度の測定は 96-well microplate reader (Tecan Japan, Kawasaki, Japan)を用いて 415 nm 波長を測定した。

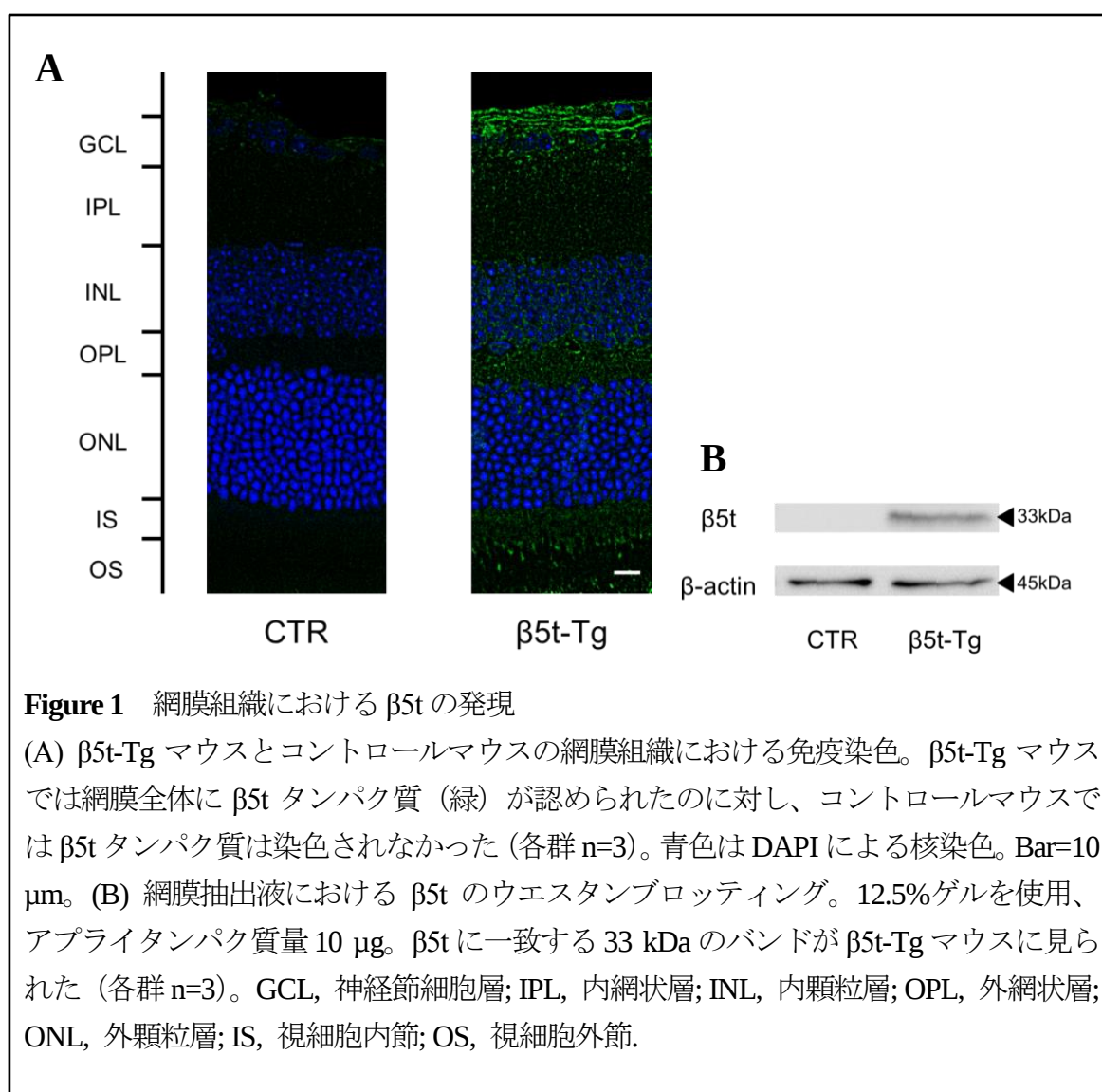
9. 統計処理

全ての結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で記載した。各グループの平均値の比較には Student's *t*-test を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。

実験結果

1. $\beta 5t$ -Tg マウスの網膜における $\beta 5t$ の発現

まず $\beta 5t$ -Tg マウスの網膜組織に $\beta 5t$ が発現しているかを確認するために、免疫染色とウエスタンブロットをおこなった。免疫染色の結果、 $\beta 5t$ はコントロールマウスでは染色されず、 $\beta 5t$ -Tg マウスでは感覚網膜全体にシグナルが認められた (Figure 1A)。この結果に一致して、網膜抽出液のウエスタンブロットでも $\beta 5t$ は $\beta 5t$ -Tg のみに認められた (Figure 1B)。これらの結果は、肝臓、骨格筋、脳などの臓器で $\beta 5t$ が $\beta 5$ に替わってプロテアソームに組み込まれていた既報³と同様に、網膜でも $\beta 5t$ がプロテアソームに組み込まれていることを示唆している。本結果より、 $\beta 5t$ -Tg マウスの網膜でも 20S プロテアソームのキモトリプシン活性が低下していると考えられた。



2. $\beta 5t$ -Tg マウスの眼底でみられた表現型

次に $\beta 5t$ -Tg マウスにおける眼底の特徴を検討するために、6 ヶ月齢の $\beta 5t$ -Tg マウスと同年齢のコントロールマウスの眼底写真を撮影して比較した。 $\beta 5t$ -Tg マウスの眼底では、白斑、網膜萎縮、網膜動脈の狭細化などの特徴的な所見が認められた (Figure 2)。白斑はヒト加齢黄斑変性で認められるドルーゼンに類似し、後者 2 つはヒト網膜色素変性で認められる所見に類似していた。この結果から、プロテアソーム機能の低下したマウスでは何らかの網膜病態を生じることが分かった。

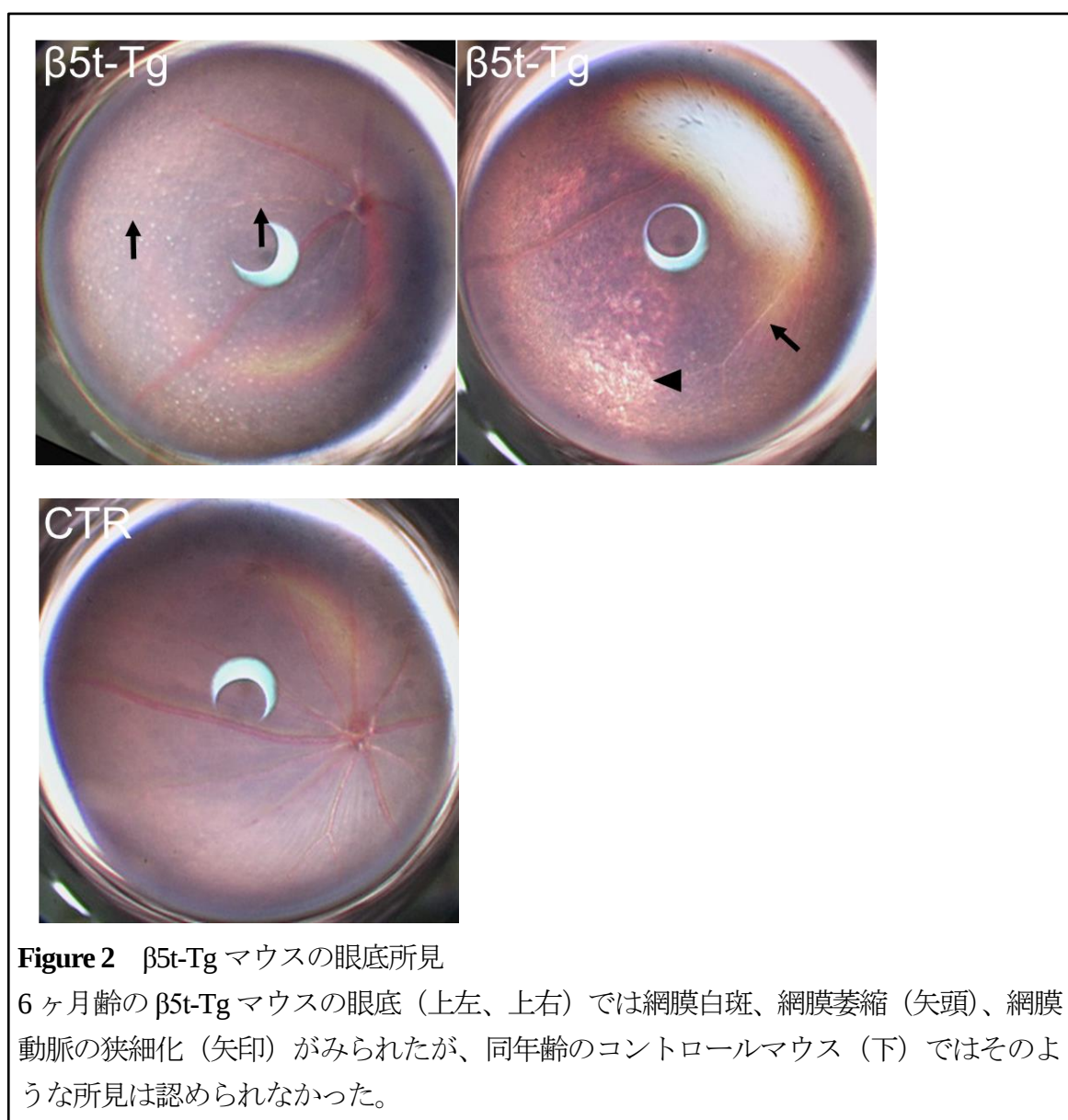


Figure 2 $\beta 5t$ -Tg マウスの眼底所見

6 ヶ月齢の $\beta 5t$ -Tg マウスの眼底（上左、上右）では網膜白斑、網膜萎縮（矢頭）、網膜動脈の狭細化（矢印）がみられたが、同年齢のコントロールマウス（下）ではそのような所見は認められなかった。

3. $\beta 5t$ -Tg マウスにおける視細胞変性

次に、 $\beta 5t$ -Tg のマウスの網膜を組織学的に検討した。6 および 9 ヶ月齢の $\beta 5t$ -Tg マウス網膜を HE 染色で観察すると、ヒト加齢黄斑変性で認められるような網膜色素上皮下の沈着物ドルーゼンは観察されなかった。しかしながら、 $\beta 5t$ -Tg マウスでコントロールマウスに比べて網膜厚が菲薄化していた (Figure 3-1A)。

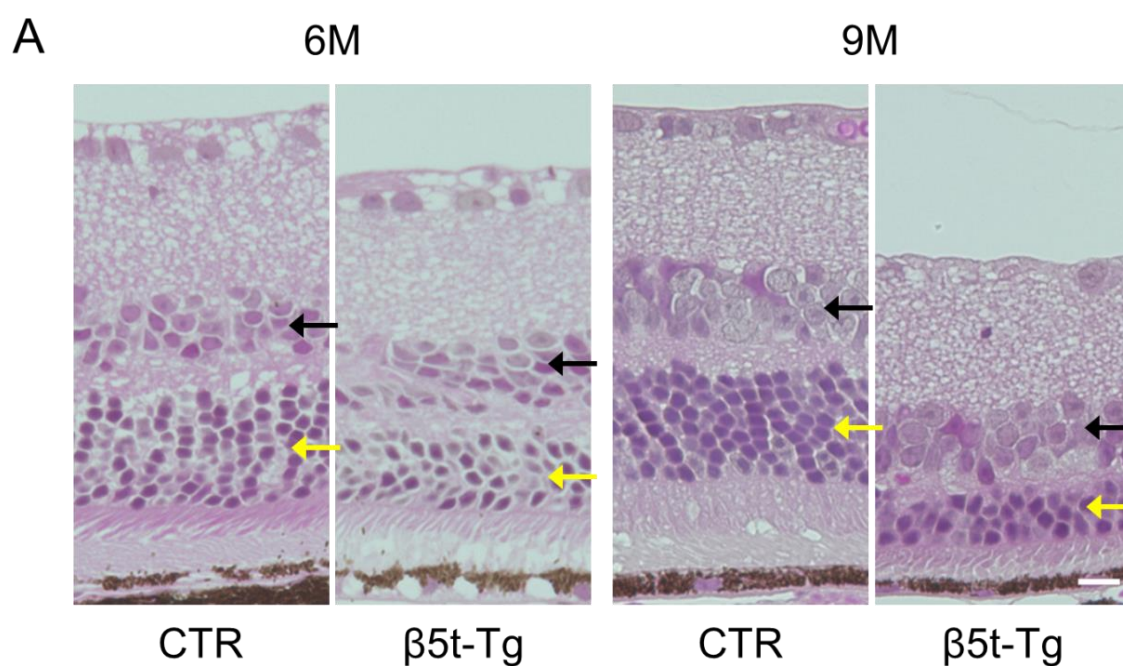
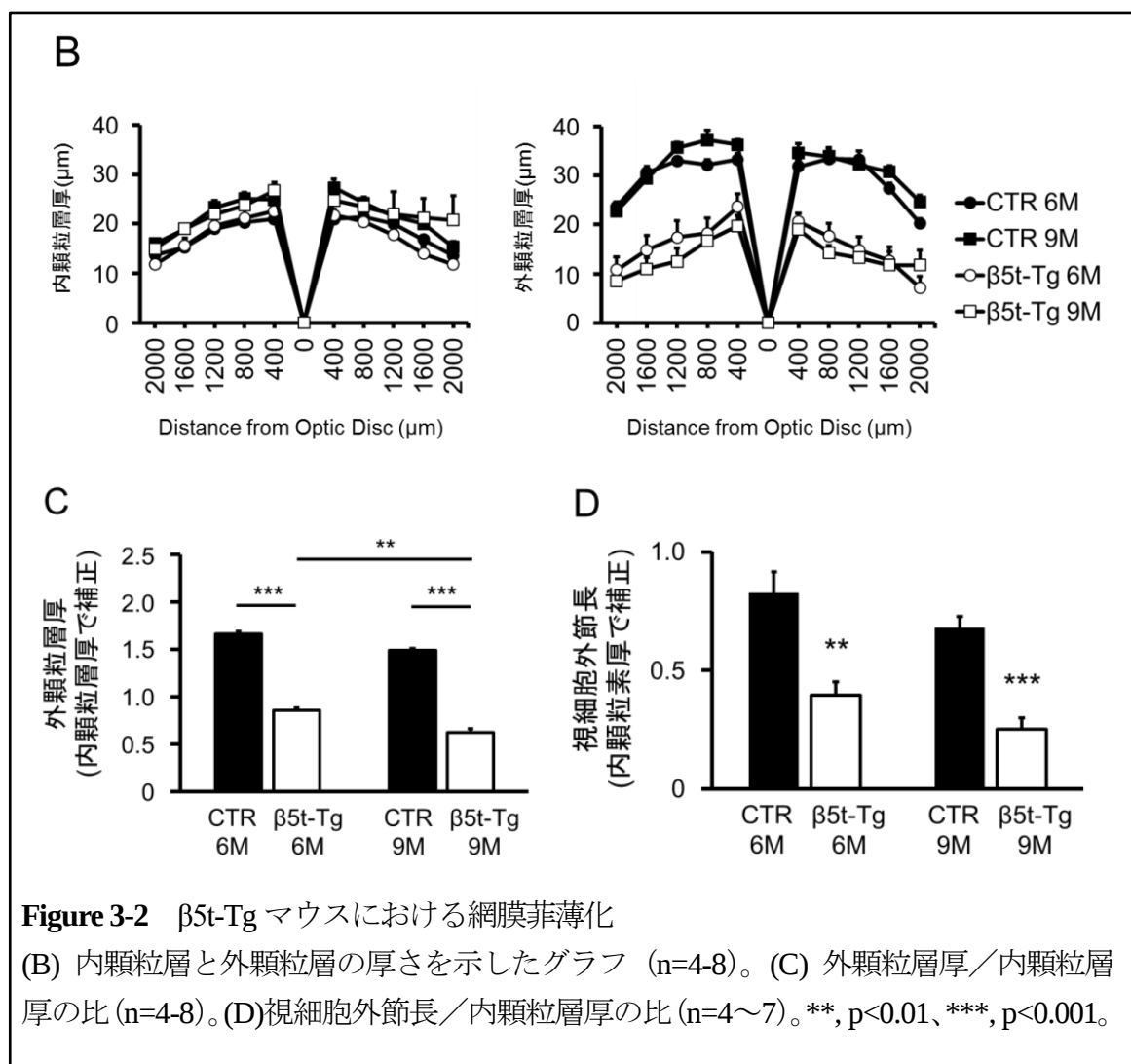


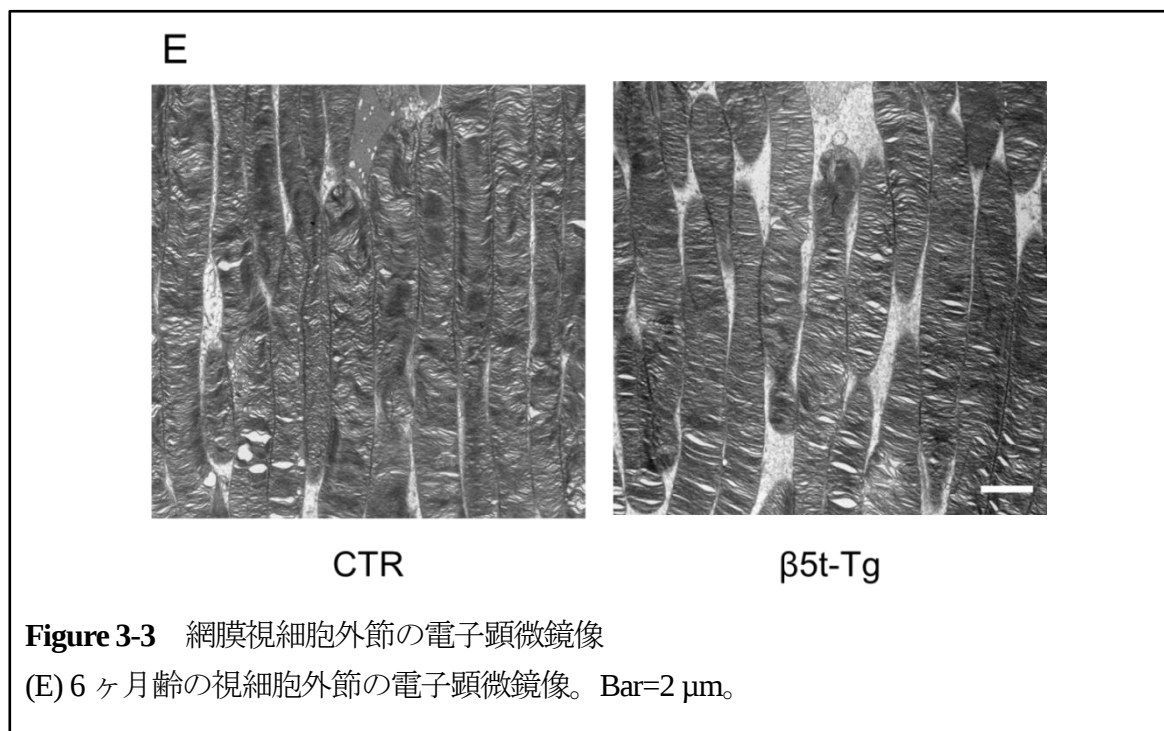
Figure 3-1 $\beta 5t$ -Tg マウスにおける網膜菲薄化

(A) HE 染色を行った 6 ヶ月齢および 9 ヶ月齢 $\beta 5t$ -Tg マウスの網膜組織切片。 $\beta 5t$ -Tg マウスでは全網膜厚が菲薄化している。黒矢印は内顆粒層、黄矢印は外顆粒層を示す。 Bar=10 μ m。

内顆粒層と外顆粒層の厚さをそれぞれ測定すると、内顆粒層は両者で差がなかったのに対し、外顆粒層は著明に $\beta 5t$ -Tg マウスで菲薄化していた (Figure 3-2B)。コントロールマウスと $\beta 5t$ -Tg マウスの外顆粒層厚/内顆粒層厚の比は 6 ヶ月齢 (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 , $p < 0.001$) でも有意に $\beta 5t$ -Tg マウスで減少していた (Figure 3-2C)。さらに視細胞外節の長さも $\beta 5t$ -Tg マウスで減少していた ($p < 0.01$, Figure 3-2D)。本結果は、プロテアソーム機能が低下した $\beta 5t$ -Tg マウスの網膜で網膜内層は保たれるのに対し、網膜外層つまり視細胞が経時的に変性していることを示していた。眼底所見を考慮すると、 $\beta 5t$ -Tg マウスの網膜における変化はヒト網膜色素変性に類似していると考えられた。



電子顕微鏡による観察では、 $\beta 5t$ -Tg マウスの視細胞外節の構造はコントロールマウスと比較して差を認めなかった (Figure 3-3E)。



4. $\beta 5t$ -Tg マウスにおける網膜機能障害

形態学的評価に続いて、網膜電図検査による網膜機能評価をおこなった。6 ヶ月齢の $\beta 5t$ -Tg マウスでは、網膜外層（視細胞）由来とされる a 波、網膜内層（双極細胞など）由来とされる b 波ともに検出されたが（Figure 4A）、 $\beta 5t$ -Tg マウスでは a 波の振幅がコントロールマウスに比べて有意に低下していた（Figure 4B）。9 ヶ月齢ではさらに a 波振幅が低下していた（Figure 4A）。本結果は、 $\beta 5t$ -Tg マウスにおいては進行性に網膜機能が障害されること、およびその進行率は比較的緩徐であることを示していた。

以上の結果から、プロテアソーム機能の低下した $\beta 5t$ -Tg マウスでは形態学的にも機能的にも視細胞が障害されていることが分かった。

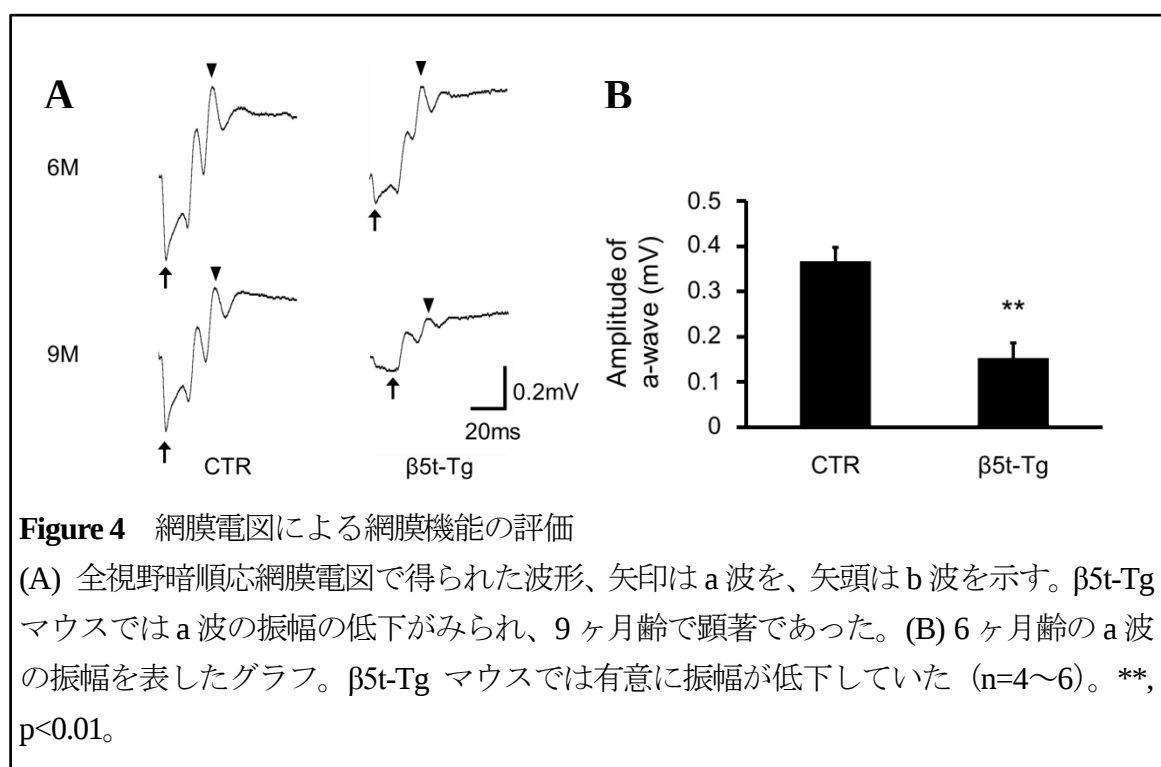
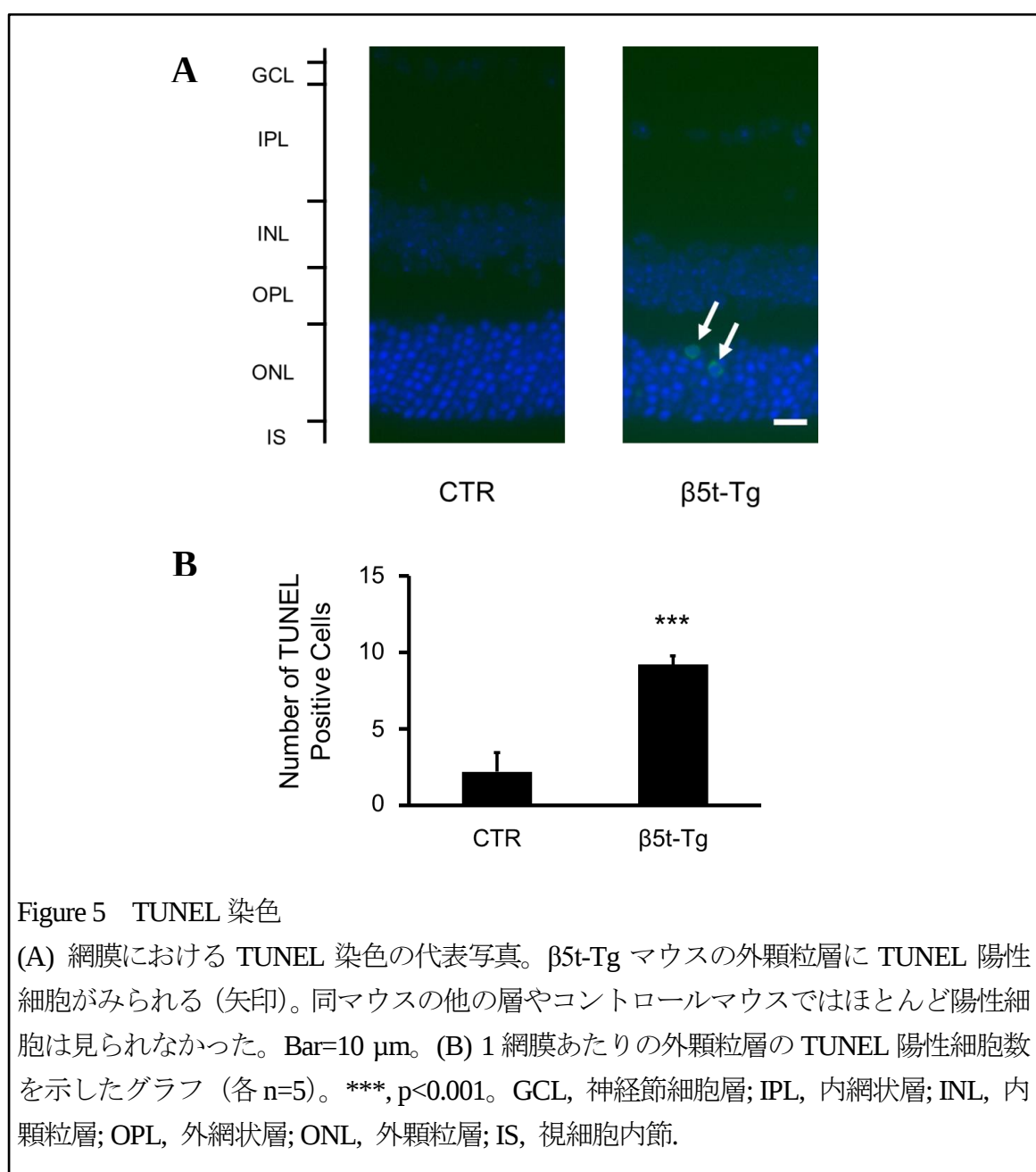


Figure 4 網膜電図による網膜機能の評価

(A) 全視野暗順応網膜電図で得られた波形、矢印は a 波を、矢頭は b 波を示す。 $\beta 5t$ -Tg マウスでは a 波の振幅の低下がみられ、9 ヶ月齢で顕著であった。(B) 6 ヶ月齢の a 波の振幅を表したグラフ。 $\beta 5t$ -Tg マウスでは有意に振幅が低下していた ($n=4\sim 6$)。**, $p<0.01$ 。

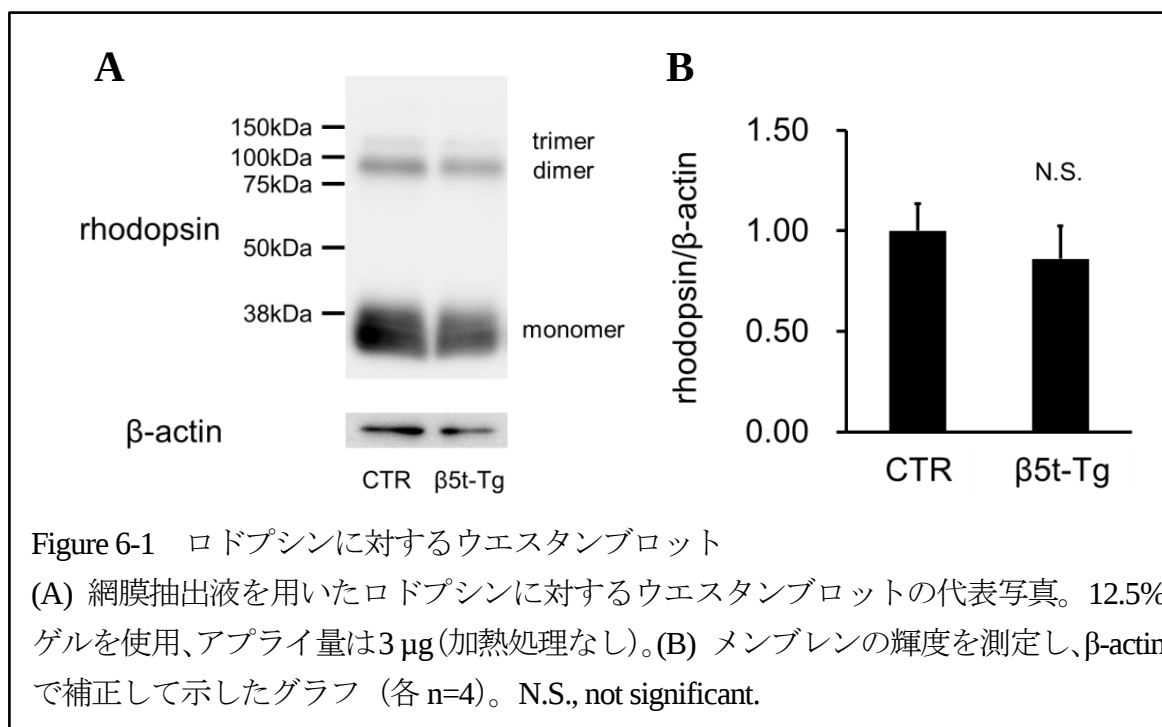
5. $\beta 5t$ -Tg マウスにおける視細胞死

続いて、 $\beta 5t$ -Tg マウスにおける視細胞死を TUNEL 染色で確認した。 $\beta 5t$ -Tg マウスの外顆粒層、つまり視細胞に TUNEL 陽性細胞を多く認め (Figure 5A)、コントロールマウスに比較して有意に増加していた (Figure 5B)。一方、網膜内層つまり内顆粒層と神経節細胞層にはほとんど TUNEL 陽性細胞は認められず、コントロールマウスと同様であった。本結果は、網膜外層が菲薄化するという Figure 3 の網膜厚の結果と一致していた。

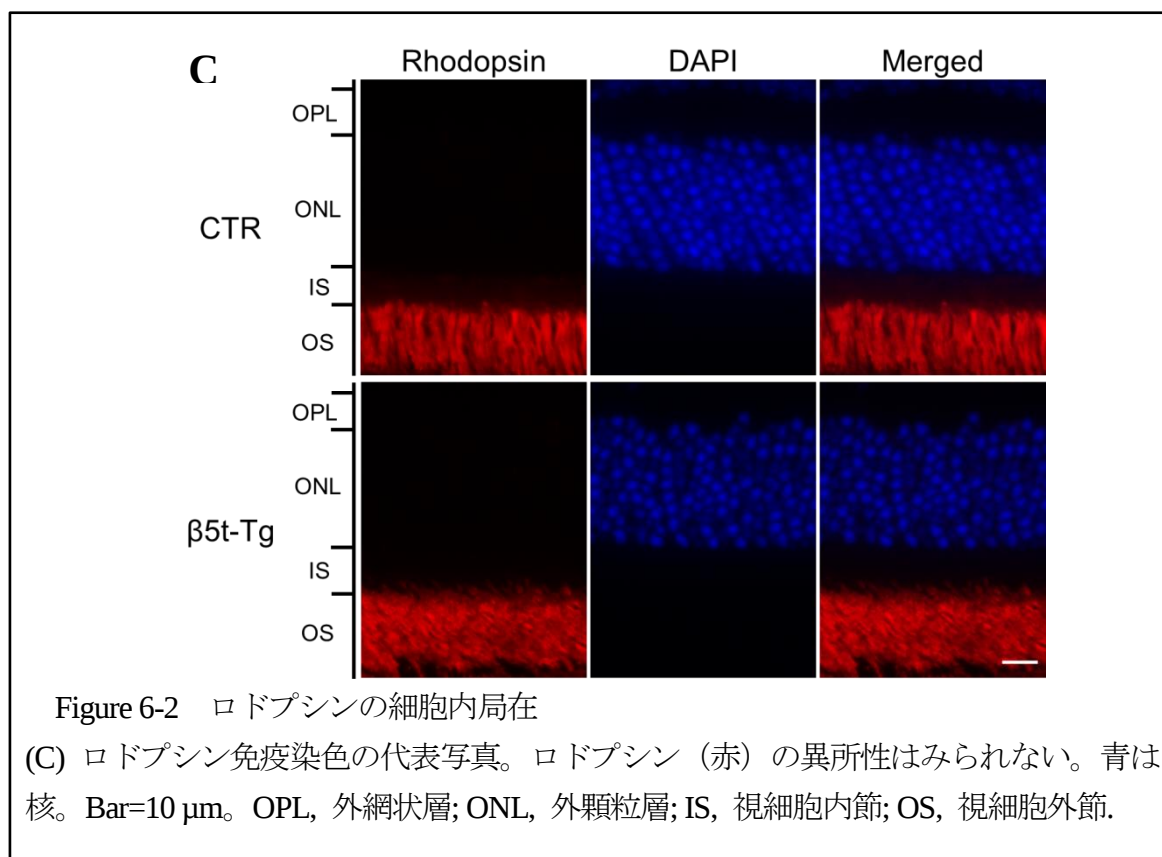


6. 視細胞死の機序についての検討

Figure 1 の結果からプロテアソーム機能の低下は網膜全層に生じているはずだが、なぜ網膜外層のみに細胞死が生じるかについて検討した。まず仮説として、過剰タンパク質の蓄積による細胞障害を考えた。ヒトの網膜には約 1.2 億の視細胞があり、毎秒 90 億個のオプシン分子が産生されている²²。視細胞外節の光受容体は常に切断と再生を繰り返しており、従ってタンパク質の産生や輸送は厳格に制御されている^{23,24}。このように視細胞とはタンパク質の産生、分解において特異性を有する細胞であり、これが $\beta 5t$ -Tg マウスの網膜外層のみに菲薄化する原因となり得ると考えた。そこで、まずロドプシタンパク質に注目して、過剰蓄積がないかをウエスタンブロットと免疫染色で確認した。しかし、 $\beta 5t$ -Tg マウスとコントロールマウスの網膜におけるロドプシタンパク質の量に差は見られなかった (Figure 6-1A,B)。

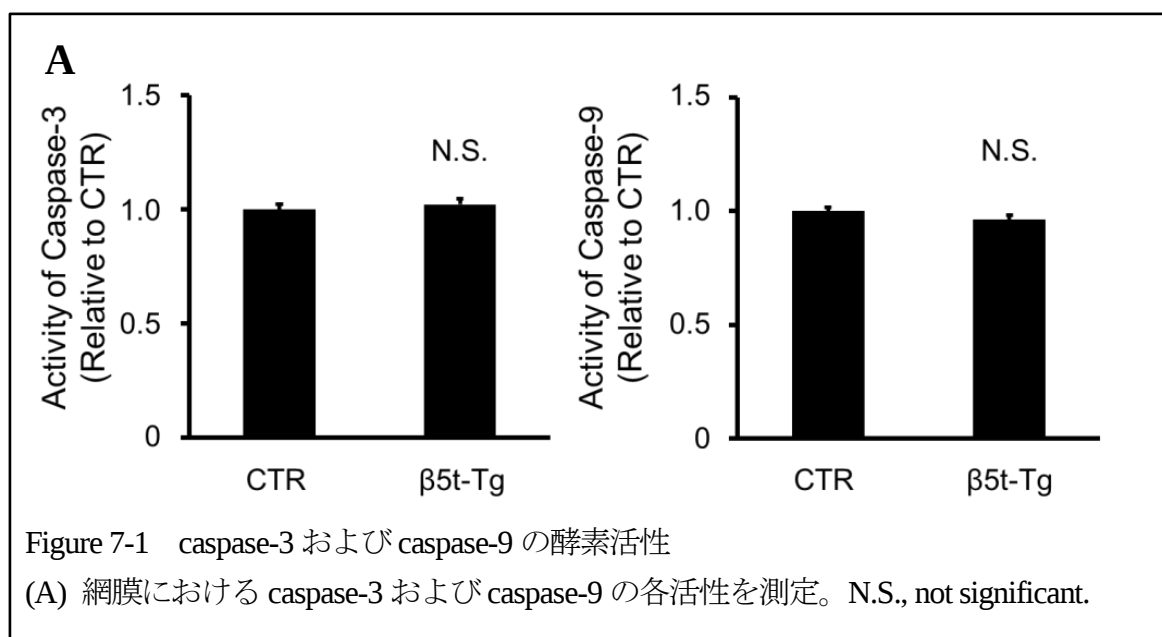


さらに、ロドプシンに対する免疫染色でも $\beta 5t$ -Tg マウスとコントロールマウスにおいて差異は認められず (Figure 6-2C)、視細胞内節や外顆粒層におけるロドプシンの異所性蓄積は存在しなかった^{25,26}。

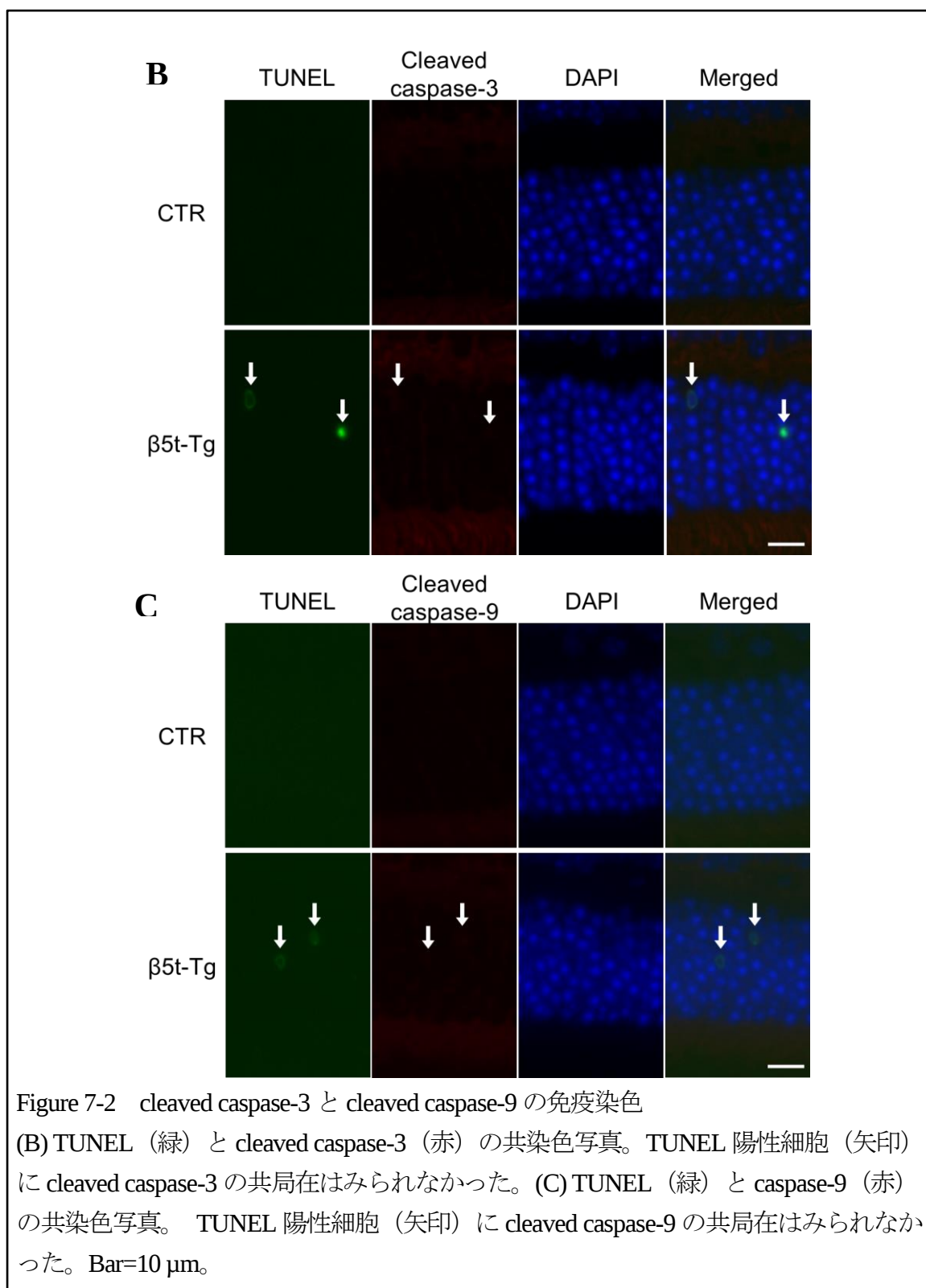


7. 視細胞死の経路に関する検討

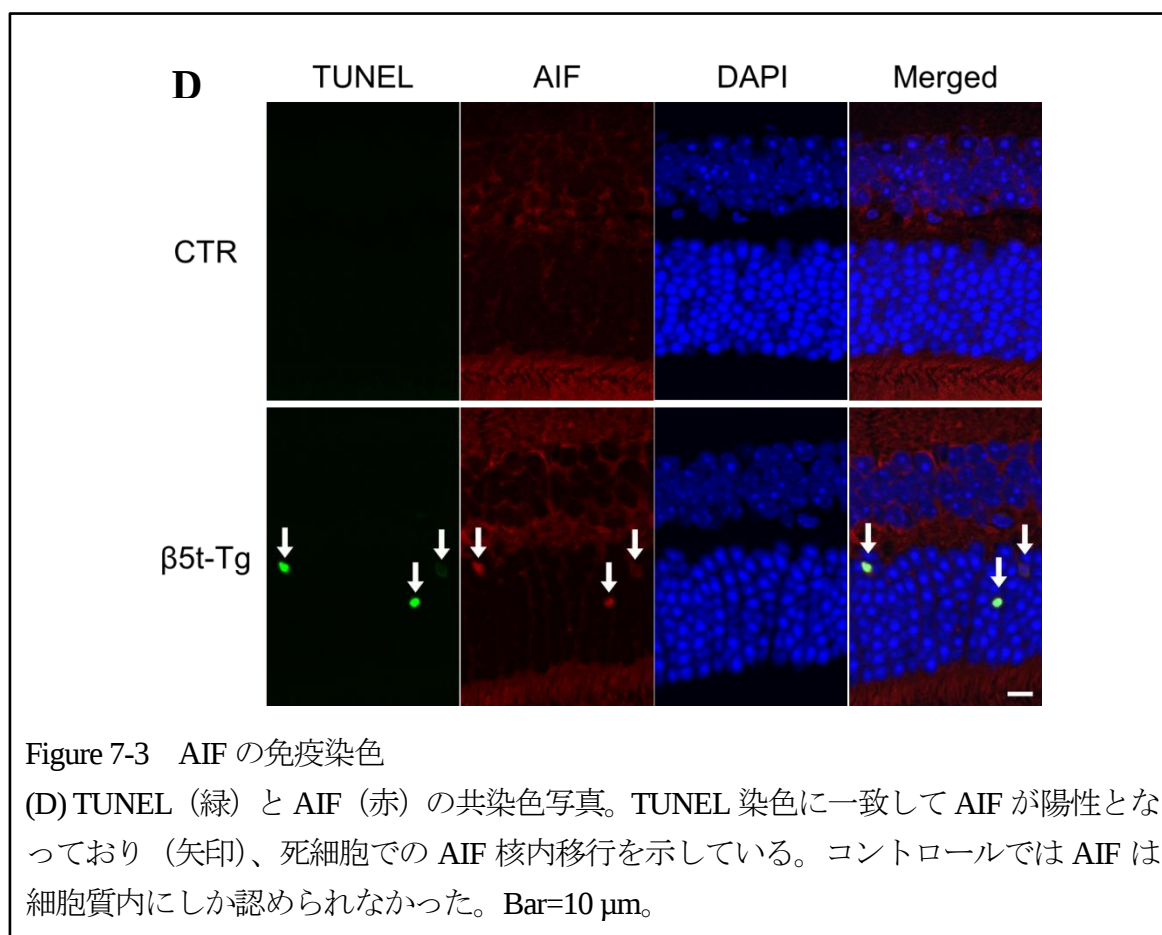
次に、視細胞死の経路について検討をおこなった。細胞死の機序としてアポトーシスを想定し、caspase-dependent pathway における主要因子 cleaved caspase-3 と cleaved caspase-9 の活性を測定した。しかし、 $\beta 5t$ -Tg マウスとコントロールマウスとで差は認められなかった (Figure 7A)。



さらに免疫染色も施行したが、TUNEL 陽性細胞に cleaved caspase-3 と cleaved caspase-9 の局在は検出できなかった (Figure 7-2B,C)。



一方、caspase-independent pathway に関与する因子 apoptosis- inducing factor (AIF)について TUNEL 染色と共染色をおこなって検討した。結果として、TUNEL 陽性視細胞に一致する AIF の核内移行が認められ (Figure 7-3D) caspase-independent pathway の関与が示唆された。



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うることを、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。

血管新生疾患を想定していた当初の予測とは異なっていたが、このプロテアソーム機能の低下した $\beta 5t$ -Tg マウスでは明らかな網膜変性が認められ、機能的にも網膜障害を示していた。前述したように、プロテアソーム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¹⁵や、アルツハイマー病患者の海馬と海馬傍回¹⁴で報告がある。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が十分考えられた。興味深かった点は、組織学的検討において変性は網膜外層に限局して生じており、網膜内層組織は比較的保たれていた点である。また、TUNEL 染色の結果も網膜外層における限局性の変性を示していた。この点については、視細胞ではタンパク質産生が非常に多いことから、そのタンパク質を分解するためのプロテアソーム機能が低下することに対して脆弱である可能性が考えられた。ただし脆弱性については裏付けるための結果が得られず、今後の検討課題として残された。

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は網膜色素変性の原因として明らかとされてきているが、最も多いものはロドプシンの変異である。常染色体優性遺伝網膜色素変性の約25%がロドプシン遺伝子のミスセンス変異によって生じることが知られている⁴。近年、ロドプシン変異は class I と class II に分類されている。Class I では、ロドプシンの C 末端が変異して post-Golgi trafficking が障害され、ロドプシンの異所性が認められる^{27,28}。一方、class II ではロドプシンの folding が障害され、やはり異所性が生じる^{25,26,29}。これらの報告は、ロドプシンの異所性が視細胞変性に関連していることを示唆している。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 マウスとコントロールマウスの差異もなかった。さらに、ヒト網膜色素変性の超微細構造で認められるような視細胞外節の disc の配置異常³⁰や高電子密度含有物³¹も、このマウスでは観察されなかった。以上のことから、変異タンパク質の蓄積なしに視細胞変性は生じうることを本検討で明らかとなった。

視細胞のアポトーシスは caspase-dependent pathway と caspase-independent pathway の両方が報告されている³²⁻³⁴。今回の検討では、 $\beta 5t$ -Tg マウスの TUNEL 陽性視細胞の核内に AIF の局在がみられた。AIF のミトコンドリア内膜から核への移行は、

caspase-independent のクロマチン凝縮と大型の DNA 断片化によるアポトーシスに関与している³⁵。つまり、このマウスの視細胞死には、caspase-dependent pathway ではなく caspase-independent pathway が関与していると推測された。過去には、プロテアソーム阻害が caspase-independent pathway を介した神経細胞死を誘導したという *in vitro* 実験の報告があり³⁶、我々と同様の結果が示されている。

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、失明数が多いことは先に記載したとおりである。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、①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、②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。①については、すでに既報で $\beta 5t$ -Tg マウスの線維芽細胞と肝細胞でキモトリプシン活性が低下していることを示されていたため、今回は $\beta 5t$ の発現をもって間接的に証明した。しかし、例えばポリユビキチン化タンパク質の蓄積を検討するなど、間接的であっても他の手段をもって裏付けることが可能である。この点に関しては現在検討中である。②についてはヒト網膜色素変性に類似していると主張するためには必要な検討である。ヒト網膜色素変性では桿体細胞がまず障害され、その後二次的に錐体細胞が障害される。今回の検討では、TUNEL 陽性となった細胞が桿体であるか錐体であるかを組織学的に検討していない。また、網膜電図を用いて桿体機能と錐体機能を評価することも可能であるが、今回おこなったのは桿体機能の評価するもののみであった。この点に関しても追加実験を予定している。

総括および結論

以上のように、予期せず血管新生とは離れた研究となったが、網膜変性モデルについて研究を行うことができたことはとても有意義であった。今回の研究から得られた新知見は以下の通りである。

- ・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
- ・その変性は **caspase-independent** 経路を介したアポトーシスである可能性

網膜におけるプロテアソームの機能不全が視細胞のアポトーシスを誘導することを示した。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。

謝辞

この論文を作成するに当たり、このような研究の機会を与えていただきご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究科眼科学分野 石田晋教授に深謝申し上げます。また、本研究の細部に至るまで多くのご指導、ご助言、ご支援を賜りました北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野 外丸詩野准教授に深謝申し上げます。さらにこれらの研究、実験、論文作成について直接ご指導いただきました野田航介准教授、神田敦宏特任講師、加瀬諭客員研究員、研究グループの方々、そして技術的なサポートをしてくださった廣瀬育代技術補助員、難波志帆研究補助員、石塚タンエルダル研究補助員に感謝申し上げます。そして苦楽を共にし、互いに切磋琢磨した大学院の仲間たちに心から感謝の意を表します。

参考文献

- 1 Ando, R. *et al.* Tissue factor expression in human pterygium. *Mol. Vis.* **17**, 63-69 (2011).
- 2 Ando, R. *et al.* Aqueous humour levels of placental growth factor in diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol.* (2013).
- 3 Tomaru, U. *et al.* Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am. J. Pathol.* **180**, 963-972 (2012).
- 4 Hartong, D. T., Berson, E. L. & Dryja, T. P. Retinitis pigmentosa. *The Lancet* **368**, 1795-1809 (2006).
- 5 Tai, H. C. *et al.* The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. *Am. J. Pathol.* **181**, 1426-1435 (2012).
- 6 Cook, C., Stetler, C. & Petrucelli, L. Disruption of protein quality control in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a009423 (2012).
- 7 Jana, N. R., Tanaka, M., Wang, G. & Nukina, N. Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2009-2018 (2000).
- 8 Illing, M. E., Rajan, R. S., Bence, N. F. & Kopito, R. R. A rhodopsin mutant linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa is prone to aggregate and interacts with the ubiquitin proteasome system. *J. Biol. Chem.* **277**, 34150-34160 (2002).
- 9 Saliba, R. S., Munro, P. M., Luthert, P. J. & Cheetham, M. E. The cellular fate of mutant rhodopsin: quality control, degradation and aggresome formation. *J. Cell Sci.* **115**, 2907-2918 (2002).
- 10 Friedman, J. S. *et al.* Mutations in a BTB-Kelch protein, KLHL7, cause autosomal-dominant retinitis pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 792-800 (2009).
- 11 Kigoshi, Y., Tsuruta, F. & Chiba, T. Ubiquitin ligase activity of Cul3-KLHL7 protein is attenuated by autosomal dominant retinitis pigmentosa causative mutation. *J. Biol. Chem.* **286**, 33613-33621 (2011).
- 12 Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. & Seemuller, E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-380 (1998).

- 13 Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T. & Huber, R. Molecular machines for protein degradation. *Chembiochem* **6**, 222-256 (2005).
- 14 Keller, J. N., Hanni, K. B. & Markesbery, W. R. Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **75**, 436-439 (2000).
- 15 McNaught, K. S. & Jenner, P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **297**, 191-194 (2001).
- 16 McNaught, K. S., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P. & Olanow, C. W. Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **179**, 38-46 (2003).
- 17 Murata, S. *et al.* Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* **316**, 1349-1353 (2007).
- 18 Murata, S., Yashiroda, H. & Tanaka, K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 104-115 (2009).
- 19 Dahlmann, B. Role of proteasomes in disease. *BMC Biochem.* **8 Suppl 1**, S3 (2007).
- 20 Nakao, T., Tsujikawa, M., Notomi, S., Ikeda, Y. & Nishida, K. The role of mislocalized phototransduction in photoreceptor cell death of retinitis pigmentosa. *PLoS One* **7**, e32472 (2012).
- 21 Tsuruma, K. *et al.* Role of oxidative stress in retinal photoreceptor cell death in N-methyl-N-nitrosourea-treated mice. *J. Pharmacol. Sci.* **118**, 351-362 (2012).
- 22 Williams, D. S. Transport to the photoreceptor outer segment by myosin VIIa and kinesin II. *Vision Res.* **42**, 455-462 (2002).
- 23 Tan, E. *et al.* The relationship between opsin overexpression and photoreceptor degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 589-600 (2001).
- 24 Lem, J. *et al.* Morphological, physiological, and biochemical changes in rhodopsin knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 736-741 (1999).
- 25 Olsson, J. E. *et al.* Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His): a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Neuron* **9**, 815-830 (1992).
- 26 Roof, D. J., Adamian, M. & Hayes, A. Rhodopsin accumulation at abnormal sites in retinas of mice with a human P23H rhodopsin transgene. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 4049-4062 (1994).
- 27 Sung, C. H., Makino, C., Baylor, D. & Nathans, J. A rhodopsin gene mutation responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa results in a protein that is defective in localization to the photoreceptor outer segment. *J. Neurosci.* **14**, 5818-5833 (1994).
- 28 Tam, B. M., Moritz, O. L., Hurd, L. B. & Papermaster, D. S. Identification of an outer segment targeting signal in the COOH terminus of rhodopsin using transgenic *Xenopus*

- laevis. *J. Cell Biol.* **151**, 1369-1380 (2000).
- 29 Lobanova, E. S., Finkelstein, S., Skiba, N. P. & Arshavsky, V. Y. Proteasome overload is a common stress factor in multiple forms of inherited retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 9986-9991 (2013).
- 30 Kolb, H. J. Biological and immunological activity of fructose 1,6-bisphosphatase. Effect of structural changes on the quantitative displacement radioimmunoassay of fructose 1,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.* **43**, 145-153 (1974).
- 31 To, K., Adamian, M., Dryja, T. P. & Berson, E. L. Retinal histopathology of an autopsy eye with advanced retinitis pigmentosa in a family with rhodopsin Glu181Lys. *Am. J. Ophthalmol.* **130**, 790-792 (2000).
- 32 Liu, C., Li, Y., Peng, M., Laties, A. M. & Wen, R. Activation of caspase-3 in the retina of transgenic rats with the rhodopsin mutation s334ter during photoreceptor degeneration. *J. Neurosci.* **19**, 4778-4785 (1999).
- 33 Donovan, M. & Cotter, T. G. Caspase-independent photoreceptor apoptosis in vivo and differential expression of apoptotic protease activating factor-1 and caspase-3 during retinal development. *Cell Death Differ.* **9**, 1220-1231 (2002).
- 34 Doonan, F., Groeger, G. & Cotter, T. G. Preventing retinal apoptosis--is there a common therapeutic theme? *Exp. Cell Res.* **318**, 1278-1284 (2012).
- 35 Susin, S. A. *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446 (1999).
- 36 Papa, L., Gomes, E. & Rockwell, P. Reactive oxygen species induced by proteasome inhibition in neuronal cells mediate mitochondrial dysfunction and a caspase-independent cell death. *Apoptosis* **12**, 1389-1405 (2007).