

研究結果報告書

平成 30 年 12 月 21 日

<研究課題> 高齢者の視覚をまもる網膜変性予防法の開発

代表研究者 大阪大学蛋白質研究所 教授 古川 貴久

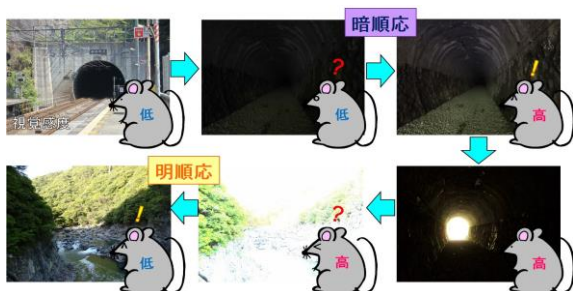
【まとめ】

網膜の視細胞は周囲の光強度に応じて光受容感を調節することにより適切な視覚を得ることを可能にしているが、その制御メカニズムに関しては不明な点が多い。本研究において、私たちは蛋白質分解を介したメカニズムが視細胞の明暗順応を制御することを明らかにしたとともに、明暗順応を司る網膜特異的蛋白質分解酵素が網膜変性疾患の変性抑制・予防薬の開発に向けた新たな創薬ターゲットとなることを見出した。

1. 研究の目的

1-1 網膜視細胞の明暗順応の分子メカニズムの解明

網膜視細胞は大きく比較的弱い光環境での視覚を司る桿体視細胞と明るい環境での視覚を担う錐体視細胞に分類される。このうち桿体視細胞は暗所において光受容感を上昇させ、最終的には1光子にも応答できるようになる。一方、桿体視細胞は明るい環境下では光受容感を減弱させ、応答の飽和を防ぐだけでなく細胞へのダメージを抑制している(図)。桿体視細胞の変性は二次的に錐体視細胞の変性を引き起こすことが知られており、桿体視細胞の保護は高齢者をはじめとして我々の視覚を保護するためにも重要である。我々は、桿体視細胞の明暗順応の分子メカニズムの解明を研究目的とした。



1-2 網膜視細胞変性を抑制・予防する分子の開発

我々が物を見るとき、網膜視細胞が光を受けて光受容反応がおこり電気信号へ変換され、最終的に脳に情報が送られて視覚に至る。その反面、光の長期暴露によって代謝老廃物や細胞ストレスの蓄積が徐々に進み、視細胞や網膜色素上皮の老化や細胞死などを引き起こし、加齢性黄斑変性症や網膜色素変性を含む視覚障害につながると考えられている。この現象は光障害として良く知られており、光の長期暴露による光障害を減弱することは網膜保護や変性予防の観点から重要である。本研究において、明暗順応を制御する蛋白質分解酵素が、網膜視細胞変性の抑制・予防を可能にする薬剤開発のターゲットになりうるかを検証した。

2. 研究方法と経過

2-1 網膜特異的蛋白質分解酵素の同定

我々は、我々が以前報告した網膜視細胞がアマクリン細胞へと分化転換する *Otx2* コンディショナル KO マウス網膜を用いて遺伝子発現のマイクロアレイ解析を行った。*Otx2* コンディショナル KO マウス網膜で発現が低下する視細胞関連遺伝子の中から、網膜視細胞の明暗順応に関わる分子の同定をおこなった。

2-2 網膜特異的蛋白質分解酵素の KO マウスの表現型の解析

網膜特異的蛋白質分解酵素の KO マウスを作製し、網膜特異的蛋白質分解酵素の欠損マウスおよび対照となる野生型マウスの網膜の組織の解析や網膜電図解析を行い、網膜視細胞の形態と機能の解析を行った。

2-3 網膜特異的蛋白質分解酵素の阻害による網膜視細胞保護効果の検証

マウス網膜に強い青色光を照射して網膜変性を誘導する光障害実験を行い、網膜電図や組織染色によって、生理活性物質や薬剤などの網膜保護の効果を検証することができる。網膜特異的蛋白質分解酵素の欠損マウスおよび対照となる野生型マウスにブルーライト（波長 400nm）を 1 日 3 時間照射させることを 6 日間続ける。この方法で引き起こした網膜光障害の程度に差があるかを、免疫染色法による網膜組織の解析や網膜電図解析によって検証した。

3. 研究の成果

3-1 網膜特異的蛋白質分解酵素の同定

ノザン解析を行って成体マウスにおける臓器ごとの発現を検証し、蛋白質分解酵素が網膜特異的に発現することを見出した。さらに、この網膜特異的蛋白質分解酵素が、標的蛋白質と結合して分解を引き起こすことを、培養細胞を用いた免疫沈降アッセイや蛋白質分解アッセイを行って確認した。

3-2 網膜特異的蛋白質分解酵素の KO マウスの表現型の解析

生後 1- 2 ヶ月齢の網膜特異的蛋白質分解酵素の KO マウスならびに野生型コントロールマウスの網膜組織を免疫染色を用いた組織解析によって解析し、視細胞に形態学的な差がないことを観察した。さらに、網膜電図解析を行って、錐体視細胞の機能に関しては KO マウスで変化がないが、桿体視細胞の暗順応機能が低下し、明順応化していることを見出した。この結果から、網膜特異的蛋白質分解酵素が網膜視細胞の明暗順応を制御することを明らかにした。

3-3 網膜特異的蛋白質分解酵素の阻害による網膜視細胞保護効果の検証

ブルーライトによる光障害を誘導した網膜特異的蛋白質分解酵素の KO マウスならびに野生型コントロールマウスマウスの網膜の免疫組織染色と ERG 測定の解析を行い、光障害の程度を比較検討した。KO マウスでは、光障害による網膜菲薄化が減弱しており、網膜電図においても野生型に比べてより高い電気生理的活性が認められた。このことから、明暗順応を司る網膜特異的蛋白質分解酵素が網膜変性疾患の変性抑制・予防薬の開発に向けた新たな創薬ターゲットとなることを見出した。

4. 今後の課題

網膜特異的蛋白質分解酵素の明暗による制御機構を明らかにする必要がある。視細胞の Ca^{2+} イオン濃度変化と明暗順応の関連が報告されていることから、 Ca^{2+} イオン濃度の変化による酵素活性や標的蛋白質の分解の変化機構を解明していく予定である。また、今回の研究結果で効果が認められた光障害に対する網膜保護効果だけでなく、遺伝的網膜色素変性症モデルマウスに対しても、網膜特異的蛋白質分解酵素の阻害によって網膜変性抑制効果が認められるかどうかを、網膜特異的蛋白質分解酵素の KO マウスと遺伝的網膜変性モデル KO マウスの交配によるダブル KO マウスを作製し、組織解析や網膜電図解析を行って検証していく予定である。

5. 研究成果の公表方法

本研究成果は第 91 会日本生化学会（京都）ならびに第 11 回 RRM レチナリサーチミーティング（東京）にて発表した。さらに、2019 年 5 月にカナダ・バンクーバーにて開催される ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) 国際学会においても発表予定である。その他の成果も含め、論文を投稿中である。

以上