

〈一般研究課題〉 網膜色素変性症モデルラットを用いた
視覚機能改善の研究
助成研究者 中部大学 井上 千聖



網膜色素変性症モデルラットを用いた 視覚機能改善の研究

井上 千聖
(中部大学)

Research for improving the visual function in retinitis pigmentosa model rat.

Chisato Inoue
(Chubu University)

Abstract :

Retinitis pigmentosa (RP) is a hereditary eye disease. The symptoms progress slowly. Early symptoms are night blindness and tunnel vision, which can lead to blindness. RP occurs with a frequency of 4000 to 8000, and the number of patients in Japan is about 23,000. There is no treatment for the deterrence deterioration of visual function in RP. Since deterioration of visual function leads to a significant decrease in quality of life, a drug treatment for maintaining or improving visual function is required.

In this study that we used a transgenic rat strain, named the P347L rat, in which proline at position 347 in the rhodopsin protein was replaced with leucine. The P347L rat is exhibits rapid retinal degeneration, enabling quicker in vivo evaluation of drug efficacy. An experiment was conducted with the aim of searching for a new therapeutic agent for retinitis pigmentosa. Glycyrrhizin, which has been reported to have an autophagy-enhancing effect, was administered to the vitreous body of 8 day old rats. As a result, the glycyrrhizin-treated rats retina significantly suppressed the decrease of the outer nuclear layer as compared with the vehicle group. Additionally, the glycyrrhizin-treated group significantly reduced the number of apoptosis-positive cells in the 9day old rats compared with the vehicle group. These results indicate that glycyrrhizin is effective in protecting the retina of P347L rats.

1. はじめに

網膜色素変性症は視細胞および色素上皮細胞の変性により進行性の視覚異常をきたす。遺伝性網膜疾患のなかで最も頻度が高く、失明原因の上位に位置する重大な疾患である。本疾患は4,000人～8,000人に1人の割合で発症し、日本では約23,000人の患者がいる。本疾患の症状改善や、病状の進行を止める治療法は確立されていない。根本的な治療法としてiPS細胞を用いた再生医療や人工網膜、遺伝子治療などの可能性が模索されているが、一方で症状の進行を抑える低侵襲治療としての薬物療法が求められている。

網膜色素変性症では多くの場合、杆体視細胞から視細胞死が起こる。杆体視細胞は暗視野に働くために初期症状として夜盲が生じる。病状は緩やかに進行し、徐々に周辺視野が失われて視野狭窄が起こる。中心視野は維持されるが、病状がさらに進行すると中心視野もなくなり失明に至る場合もある。本疾患は常染色体劣性、常染色体優性、X-連鎖性に遺伝し、70種類以上の遺伝子に変異があると報告されている。ロドプシン遺伝子の突然変異はヒトの網膜色素変性症で発見された最初の原因遺伝子である^[1]。ロドプシン遺伝子の変異部位は複数存在し、それらの違いが発症年齢と症状の軽重とに関連することが報告された^[2]。ロドプシンは視細胞の外節に豊富に存在する光感受性タンパク質である。内節にはミトコンドリアや小胞体などの細胞小器官が存在し、内節で合成されたロドプシンが外節へと輸送される。ロドプシンのC末端に変異があると、ロドプシンは外節へ輸送されず視細胞の細胞質に蓄積して細胞内恒常性維持機構が破綻して網膜変性が起こる^[3]。細胞質中に蓄積する変異ロドプシンを排除することが、網膜色素変性症の治療に有効である可能性がある。

本研究では、ロドプシンC末端の347番目のプロリンをロイシンに置換した、変異ロドプシン遺伝子導入トランスジェニックラット(P347Lラット)を用いて、新たな治療薬の探索を目的とした。変異ロドプシンの蓄積による視細胞内恒常性維持機構の破綻が視細胞死を引き起こすことから、オートファジーという細胞内変性タンパク質の処理機構を促進することによる網膜保護の可能性を考えた。本研究ではオートファジー亢進作用の報告されているグリチルリチン^[4]をP347Lラットの眼球へ注入し、視細胞保護効果を検討した。

2. 試料および実験方法

すべての動物実験は中部大学実験動物委員会の審査を経て中部大学学長の承認を得て、中部大学動物実験取扱規定に従い実施した(承認番号: 3010028、3010029)。

2.1 グリチルリチンの投与

生後8日のP347Lラットの眼球硝子体へ麻酔下でグリチルリチンを注入した。薬剤注入には30Gマイクロシリンジ(ITO CORPORATION)を使用した。

2.2 組織標本の作製

ラットの眼球を4%パラホルムアルデヒド中に、4℃で3時間おいて固定をした。50%–90%エタノールシリーズで脱水後に眼球を2分割にしてパラフィンブロックを作製した。4μmの厚さでパラフィン切片を作り、ヘマトキシリン-エオジン染色(HE染色)をして視細胞の外顆粒層の変化を観察した。

2.3 TUNEL染色

TUNEL染色はTACS-XL in Situ Apoptosis Detection Kit (TREVIGEN)を使用した。手順は次のとおりである。4%パラホルムアルデヒドで固定した組織から厚さ4 μ mのパラフィン切片を作成し、脱パラフィン後、proteinase Kで室温30分処理した。3%過酸化水素/メタノールで内因性ペルオキシダーゼ不活化処理のあと、DNA末端のBrdUラベル、Anti-Brd U抗体を反応させ、3, 3'-diaminobenzidine (DAB) (DAB Peroxidase Substrate Kit, ImmPACT, VECTOR)基質の発色によりアポトーシス細胞を検出した。

2.4 統計解析

統計解析はt-testまたはtwo-way analysis of variance (ANOVA) with the Sidak's multiple comparison testを実施した。すべての解析はPrism 7 software (GraphPad)を使用した。

3. 実験結果

グリチルリチン投与後のP347Lラット網膜の形態学的解析

3.1 網膜外顆粒層の厚み評価

グリチルリチンをP347Lラットの眼球硝子体へ注入して、網膜保護効果を調べた。生後8日のP347Lラット眼球硝子体へグリチルリチンを注入し、生後9日から生後12日にかけて経時的に眼球を回収してパラフィン切片を作成しHE染色を行った。網膜保護効果の評価には溶媒投与とグリチルリチン投与とで網膜外顆粒層の厚みを比較した(図1a: i, iii, v, vii: 溶媒投与群、ii, iv, vi, viii: グリチルリチン投与群)。外顆粒層の厚みの計測は、角膜の端から視神経乳頭までの中間位置より乳頭側で内顆粒層の細胞数が一定の場所を選択した。生後9日から生後12日では、溶媒投与群と比べてグリチルリチン投与群では外顆粒層の減少が抑えられていた(図1b)。

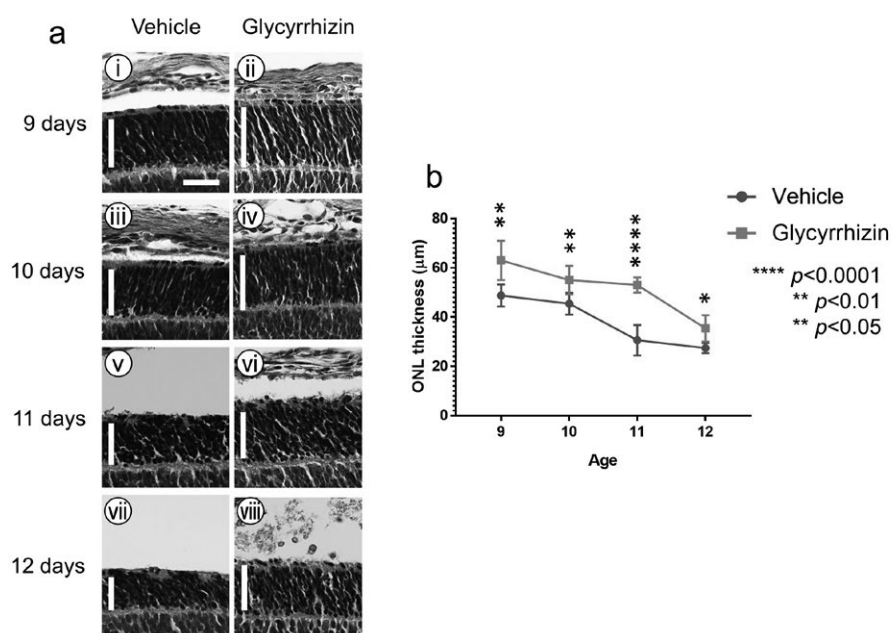


図1. 網膜外顆粒層の厚み評価
a: 薬剤投与後の9~12日齢のP347Lラット網膜のHE染色像(vertical bar: 外顆粒層、scale bar: 30 μ m)
b: 外顆粒層厚みの推移

3.2 網膜外顆粒層のアポトーシス陽性細胞数の評価

生後9日の網膜のTUNEL染色によりアポトーシス陽性細胞数を計測した。溶媒投与群とグリチルリチンの投与群のTUNEL染色像を比べると、グリチルリチン投与の方がアポトーシス陽性細胞は少なかった(図2a)。視細胞45列あたりのアポトーシス陽性細胞数を計測して定量したところ、溶媒投与群よりもグリチルリチン投与群の方がアポトーシス陽性細胞数は有意に少なかった(図2b)。

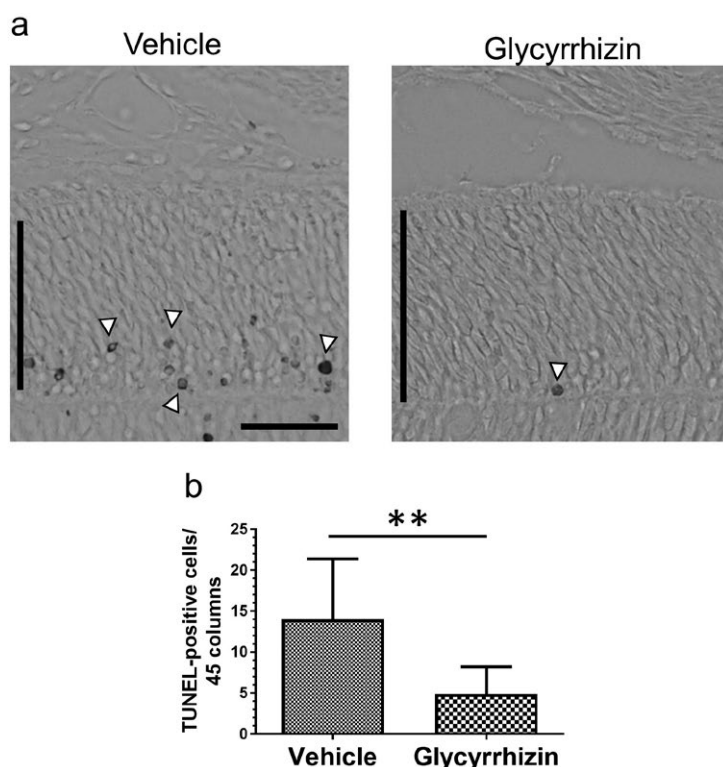


図2. アポトーシス陽性細胞数の評価

a: 薬剤投与後の9日齢のP347Lラット網膜のTUNEL染色像(vertical bar: 外顆粒層、scale bar: 30 μ m、arrowheads: アポトーシス陽性細胞) b: アポトーシス陽性細胞数の比較(** p<0.01)

3. まとめ

本研究ではP347Lラットへのグリチルリチン投与により網膜変性が抑制される結果を得た。グリチルリチンがオートファジーを亢進することで、視細胞に蓄積した変異ロドプシンが処理されてアポトーシス誘導を一時的に抑制したと考えられる。今後はグリチルリチンの効果持続性を評価するために、グリチルリチン投与後経時的に回収した網膜のアポトーシス陽性細胞数変化を解析する。またグリチルリチンのオートファジーへの関与と、アポトーシス抑制への関連を調べるために生化学的評価を行う。

本研究ではグリチルリチンの網膜色素変性症に対する治療薬としての可能性を示すことができた。急激な網膜変性を起こす網膜色素変性症モデルラットの視細胞の長期機能維持を達成することで、緩やかに進行するヒトの網膜色素変性症治療へつなげたい。

参考文献

- [1] Dryja TP, McGee TL, Hahn LB, Cowley GS, Olsson JE, Reichel E, et al. Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *N Engl J Med.* 1990;323(19):1302-7.
- [2] Aleman TS, Cideciyan AV, Sumaroka A, Windsor EA, Herrera W, White DA, et al. Retinal Laminar Architecture in Human Retinitis Pigmentosa Caused by Rhodopsin Gene Mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(4): 1580-90
- [3] Athanasiou D, Aguila M, Bellingham J, Li W, McCulley C, Reeves PJ, et al. The molecular and cellular basis of rhodopsin retinitis pigmentosa reveals potential strategies for therapy. *Prog Retin Eye Res.* 2018; 62: 1-23.
- [4] Tang ZH, Zhang LL, Li T, Lu JH, Ma DL, Leung CH, et al. Glycyrrhetic acid induces cytoprotective autophagy via the inositol-requiring enzyme 1 α -c-Jun N-terminal kinase cascade in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget* 2015; 6(41): 43911-26