

小胞体ストレスによる細胞死

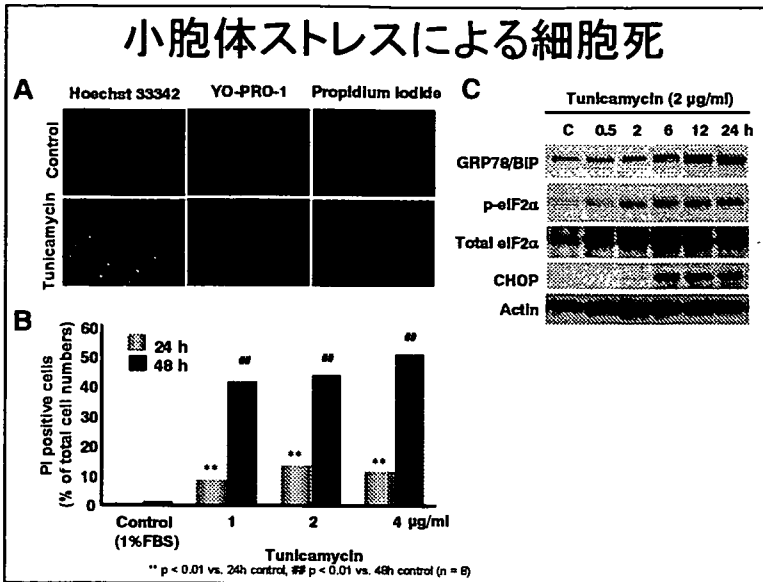


図7 RGC細胞におけるERストレス誘発細胞死に関与するER誘導シャペロン

小胞体ストレス誘導による網膜障害

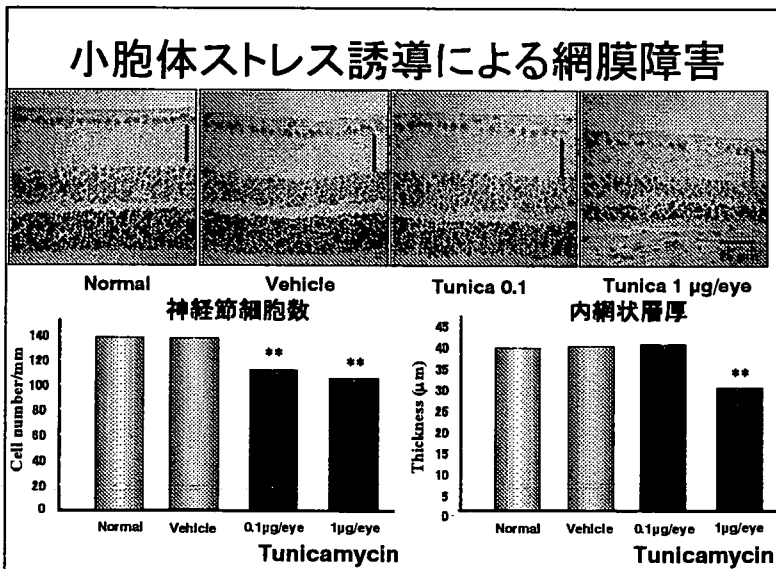


図8 マウスの硝子体内N-methyl-D-aspartate (NMDA) 投与誘発網膜障害

マウス硝子体内NMDA投与における網膜BiPの変化

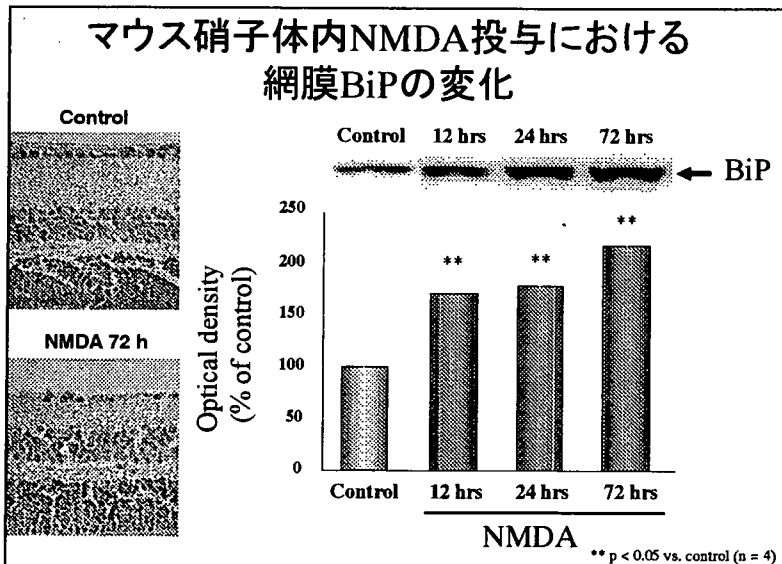


図9 マウス硝子体内NMDA投与における網膜BiPの変化

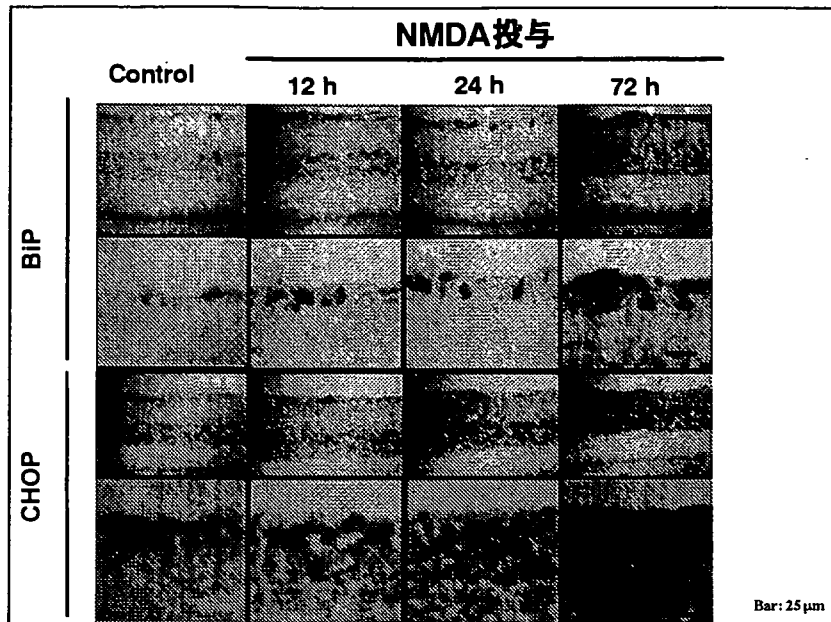


図10 マウス硝子体内NMDA投与における網膜BIP及びCHOPの変化(免疫組織化学的染色)

最近、活性化型のリン酸化double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)がアルツハイマー病患者、パーキンソン病及びALS患者脳において増加していることが報告されている^{3,4)}(図2)。PKRはインターフェロンにより誘導されるセリン/スレオニンリン酸化タンパク質で、ウイルス感染に対する防御機構の重要な因子であることが知られている⁵⁾(図1)。そこで分担研究者らは、PKRの活性化がERストレスによる網膜神経節細胞に関与しているか否かをRGC-5及びマウスNMDA網膜障害モデルを用いて検討した。RGC-5細胞にunicamycinを添加することにより細胞死に先行してリン酸化PKRの増加が観察された(図11A)。それに対してPKR阻害剤及びPKR siRNAにより、その細胞死を有意に抑制した(図11B-D、図12、図13)。

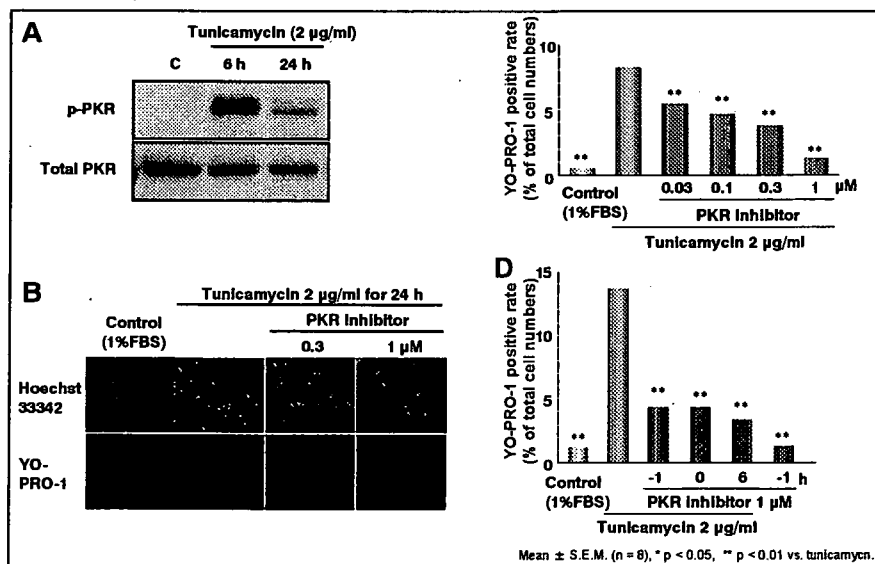


図11 小胞体ストレス細胞死に対するPKRの関与

さらに、NMDAまたはツニカマイシンをマウス硝子体内に投与することにより網膜内にリン酸化PKRの増加が認められ(図13)、PKR阻害剤の投与によりNMDA誘発網膜神経節細胞死を有意に抑制した⁶⁾(図14, 15)。

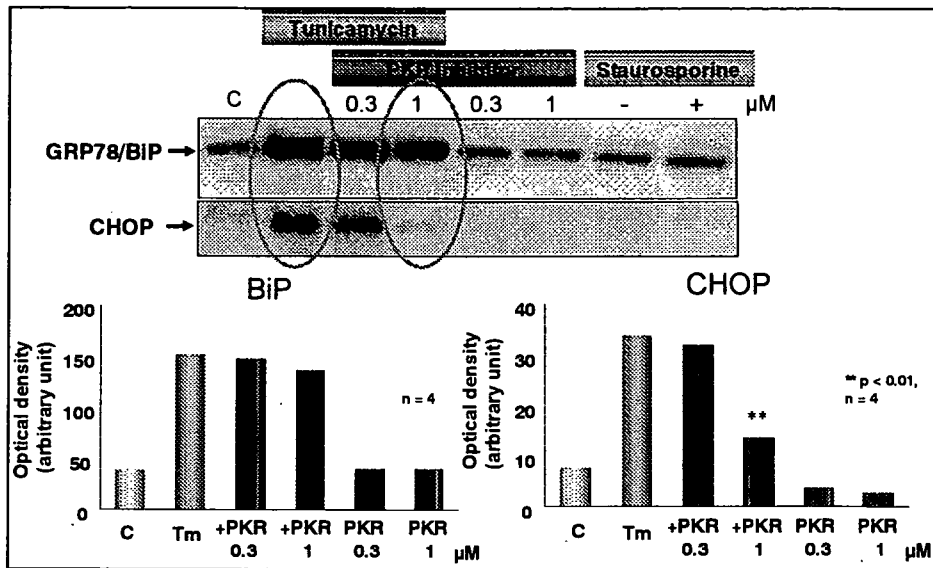


図12 BiPおよびCHOP発現に対するPKR阻害剤の効果

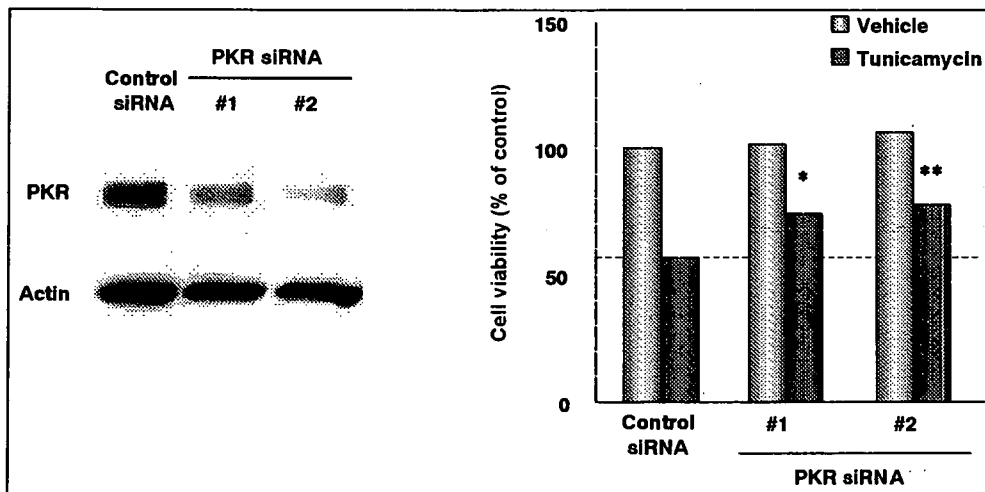


図13 小胞体ストレス細胞死に対するPKR siRNAの作用

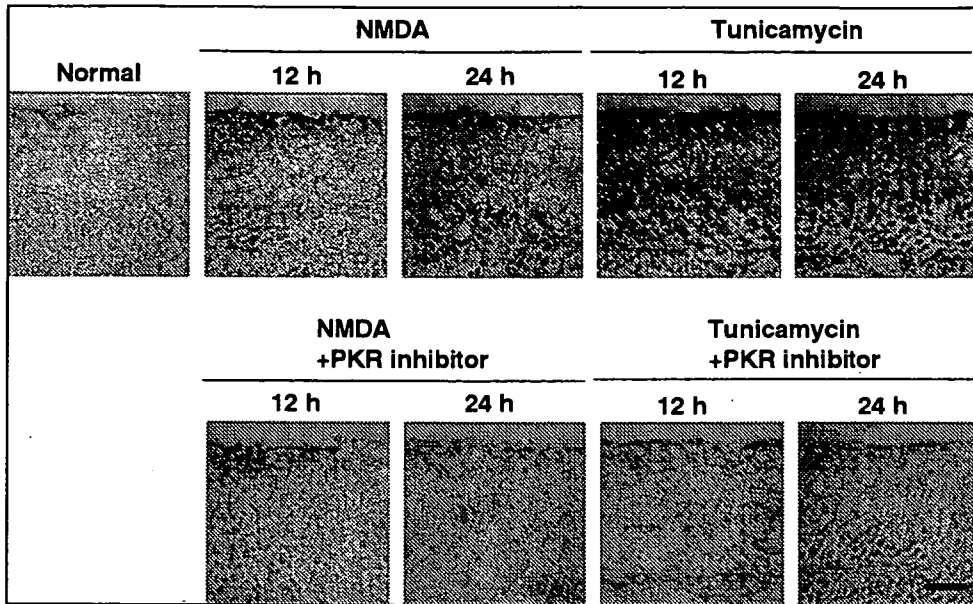


図14 マウス網膜障害モデルにおけるリン酸化PKRの変化

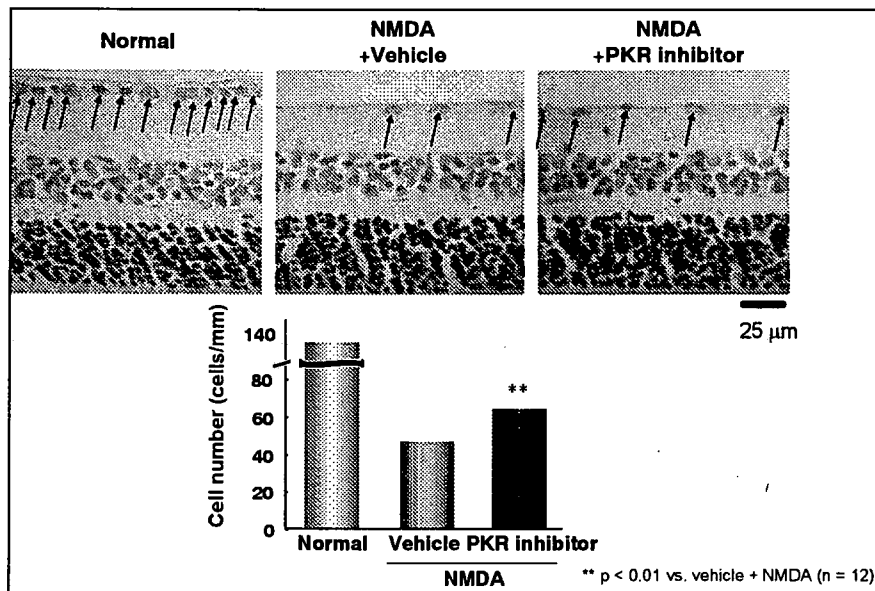


図15 マウスNMDA網膜障害モデルにおけるPKR阻害剤の作用

D. 考察

1. マウス網膜障害モデルにおいて小胞体ストレスが惹起された。
2. PKR阻害剤及びPKR siRNAが小胞体ストレスによる網膜細胞死を抑制した。
3. PKR阻害剤はマウスNMDA網膜障害モデルにおいて保護作用を示した。

以上のことから、小胞体ストレスを抑制する薬物は、網膜疾患治療薬の新規な創薬ターゲットになる可

能性が示唆された。

E. 結論

以上、PKRの活性化がERストレス網膜細胞死に関与していること、PKRの活性化の抑制がERストレスを介した網膜細胞障害に対して有効であることが示唆された。

引用文献

1. Aridor M, Balch WE : Integration of endoplasmic reticulum signaling in health and disease. *Nat Med* 5: 745-751, 1999
2. Shimazawa M, Inokuchi Y, Ito Y, Murata H, Aihara M, Miura M, Araie M and Hara H: Involvement of ER stress in retinal cell death. *Mol Vis* 13: 578-587, 2007
3. Onuki R, Bando Y, Suyama E, et al. An RNA-dependent protein kinase is involved in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease. *Embo J* 23: 959-968, 2004
4. Bando Y, Onuki R, Katayama T, et al. : Double-strand RNA dependent protein kinase (PKR) is involved in the extrastriatal degeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease. *Neurochem Int* 46:11-18, 2005
5. Gale M, Jr, Katze MG : Molecular mechanisms of interferon resistance mediated by viral-directed inhibition of PKR, the interferon-induced protein kinase. *Pharmacol Ther* 78: 29-46, 1998
6. Shimazawa M, Ito Y, Inokuchi Y and Hara H: Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase in ER stress-induced retinal neuron damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 3729-3736, 2007

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimazawa M, Inokuchi Y, Ito Y, Murata H, Aihara M, Miura M, Araie M and Hara H: Involvement of ER stress in retinal cell death. *Mol Vis* 13: 578-587, 2007
- 2) Shimazawa M, Ito Y, Inokuchi Y, and Hara H: Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase in ER stress-induced retinal neuron damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 3729-3736, 2007

- 3) 原英彰、脳虚血及び網膜障害による神経細胞死と小胞体ストレス、Pharma Medica 25, 143-144, 2007.

2. 学会発表

- 1) 井口勇太、嶋澤雅光、中島佳美、工藤喬、今泉和則、原英彰、網膜細胞死における小胞体誘導シャペロンの関与、第80回日本薬理学会年会（名古屋、2007、3）
- 2) Suemori S, Shimazawa M, Yamamoto T and Hara H, Involvement of endoplasmic reticulum stress in retinal cell death. The ARVO Annual Meeting(Fort Lauderdale, Florida, 2007, 5, 8)
- 3) 井口勇太、中島佳美、栗田貴教、嶋澤雅光、佐治木弘尚、工藤喬、今泉和則、原英彰 網膜細胞死における小胞体誘導シャペロンの関与、第27回日本眼薬理学会（岐阜、2007、9、16-17）
- 4) 嶋澤雅光、原英彰、小胞体ストレスと網膜神経細胞死、第2回小胞体ストレス研究会（吹田、2007、10、22）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）分担研究報告書

緑内障性網膜神経障害に対する新規治療薬の開発

分担研究者 金本尚志・広島大学講師

研究要旨

緑内障性網膜神経障害の関連タンパクと考えられる血小板由来増殖因子受容体 α -タイプ (Platelet-derived growth factor receptor - type alpha : 以下 PDGFR α) が緑内障性網膜視神経障害に対して、神経保護効果を有することが判明した。

A. 研究目的

緑内障性網膜神経障害に関与するタンパクについてプロテオミクス解析により候補因子を確定しているが、本研究ではそれらの機能解析を行い新規神経保護薬を開発すること。

B. 研究方法

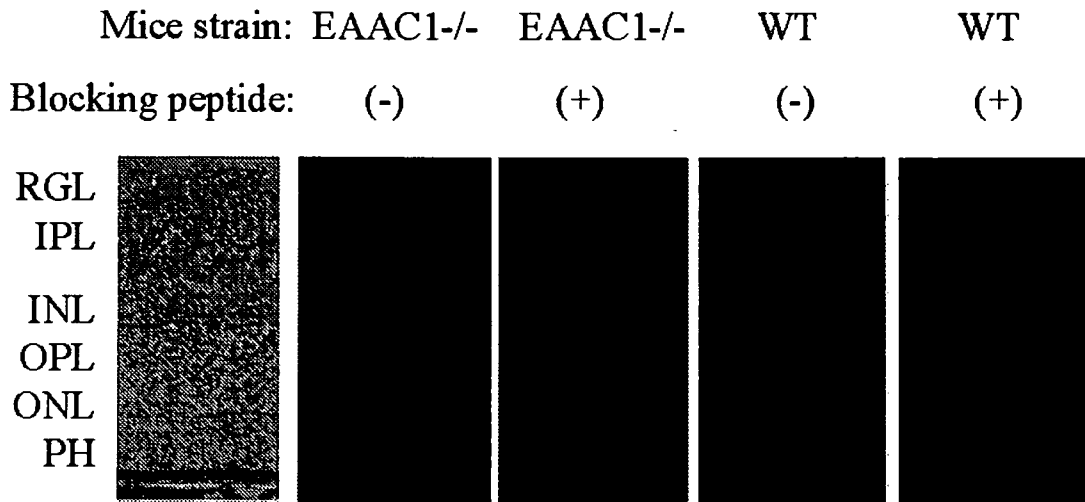
1. 緑内障性網膜神経障害の関連タンパクの可能性のあるPDGFR α を主として解析した。まずは、In vivoの実験として、網膜内におけるPDGFR α の発現部位を同定するために、マウス網膜サンプルを用いて、免疫染色を行った。次に、In vitroの実験として、PDGFR α を介した網膜神経保護効果を検討するために、その特異的リガンドであるPDGF-AAを用いて、継代培養系の網膜神経細胞であるRGC5細胞に対して酸化ストレスなどによる神経細胞死を誘導し、その生存率をMTSアッセイ等を用いて検討した。さらに、siRNA法を導入し、継代培養系の網膜神経細胞であるRGC5細胞に対してPDGFR α -siRNAを行った後、RGC5細胞に対して神経細胞死を誘導し、その生存率を検討した。

(倫理面への配慮)

文部科学省告示の「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および、広島大学動物実験指針、広島大学動物実験実施規則に則った。

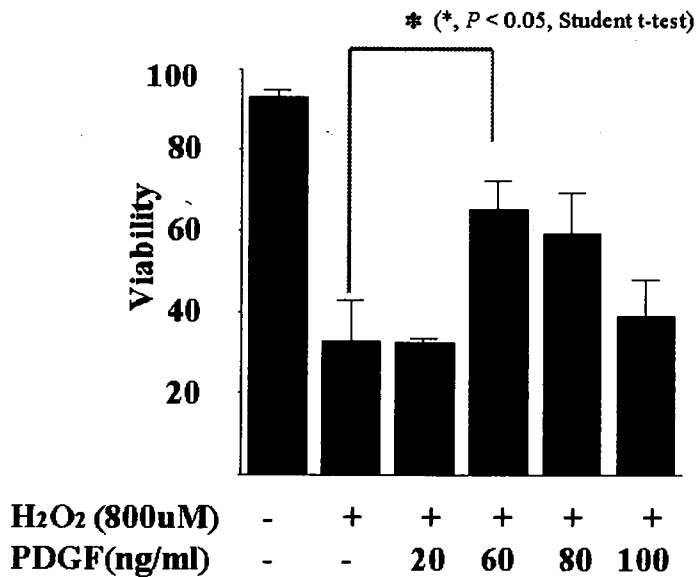
C. 研究結果

1. 免疫染色の結果から、PDGFR α は網膜神経節細胞層に豊富に存在することが明らかになった(下図)。

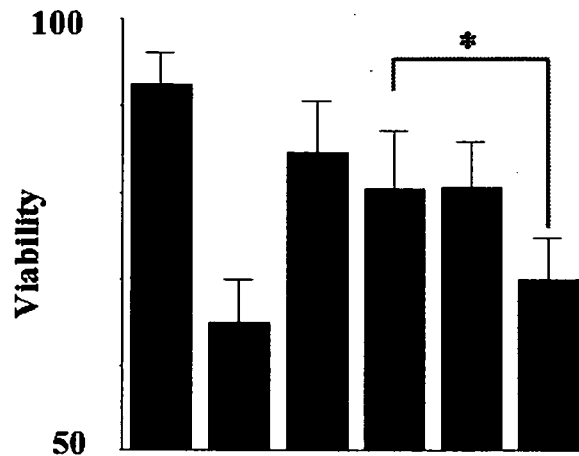


したがって、緑内障の視野障害においては、主として網膜神経節細胞 (Retinal ganglion cell : 以下RGC) の変性が主病態であるが、そのRGCの細胞体そのものにPDGFRaが存在することが判明したわけである。このことは、PDGFRaの緑内障性網膜神経障害に対する直接的な関与の可能性を示している。

2. PDGF-AAによるPDGFRaの活性化によって、酸化ストレスによって誘導される網膜神経節細胞死は抑制された。(下図)



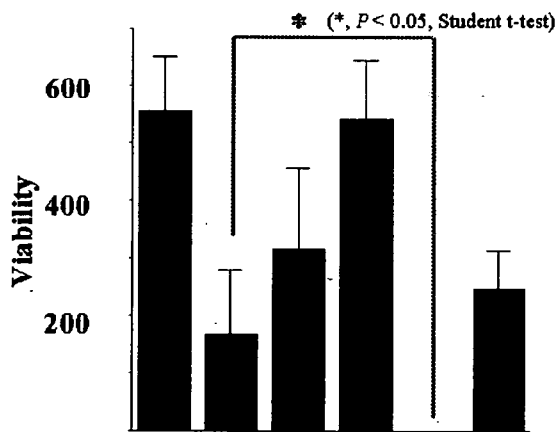
さらに、その細胞内シグナル伝達系を検討したところ、PI3キナーゼの阻害剤の前投与により、PDGF-AAによる酸化ストレス誘導性網膜神経節細胞死は抑制された。(下図)



H₂O₂ (800uM)	-	+	+	+	+	+
PDGF(60ng/ml)	-	-	+	+	+	+
Wortmanin(uM)	-	-	-	-	0.1	0.5
DMSO	-	-	-	+	-	-

以上より、PDGFRαはPI3Kを介して、神経保護作用を有する可能性が示唆された。

3. PDGFRα-siRNAにより、グルタミン酸誘導性の網膜神経節細胞死は変化なかったが、酸化ストレス誘導性網膜神経節細胞死は促進された。(下図)



PDGFRα-siRNA	-	-	-	+	+	+
H₂O₂ (600uM)	-	+	-	-	+	-
Glutamate(15mM)	-	-	+	-	-	+

この結果は、PDGFRαを介するシグナル系による、酸化ストレス誘導性網膜神経節細胞抑制効果を示している結果となった。

D. 考察

今回の In vitro assay の結果を基盤として、今後は動物モデルを用いたPDGFR α シグナル系による、神経保護効果について、検討していく必要があると考えられた。

E. 結論

1)PDGFR α は、マウスの網膜神経節細胞層に存在していた。

2)PDGFR α の発現は、酸化ストレスに反応して、上昇した。3)酸化ストレス誘導性網膜神経節細胞死は、PDGF-AAによって、抑制された。4)PDGF-AA の酸化ストレス誘導性網膜神経節細胞死に対する 抑制効果は、PI3Kを介するものであった。

5)PDGFR α のRNAノックダウンによって、酸化ストレス誘導性網膜神経節細胞死は促進された。

G. 研究発表

1.論文発表

1) Okumichi H, Mizukami M, Kiuchi Y, Kanamoto T. : GABA(A) receptors are associated with retina l ganglion cell death induced by oxidative stress. Exp Eye Res. 2008 Feb 3; in press now.

2) Mizukami M, Kanamoto T., Souchelnytskyi N, Kiuchi Y. : Proteome profiling of embryo chick retina. Proteome Sci. 2008 Jan 22;6(1):3

3)Okumichi H, Kanamoto T., Souchelmytskyi N, Tanimoto S, Tanaka K, Kiuchi Y. Proteomic analyses of retina of excitatory amino acid carrier 1 deficient mice. Proteome Sci. 2007 Aug 21;5(1):13

2.学会発表

1) 金本 尚志、水上 皆、谷本 誠治、木内 良明 : PDGFR α 受容体の神経保護効果 : 第27回日本眼薬理学会、岐阜、2007年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1.特許取得

なし。

2.実用新案登録

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yu ZK, Chen YN, Aihara M, Mao W, Uchida S, Ara ie M	Effects of beta-adrenergi c receptor antagonists on oxidative stress in purif ied rat retinal ganglion cells	Mol Vis	11	833-839	2007
Saito H, Tomidok oro A, Yanagisaw a M, Aihara M, T omita G, Araie M	Scanning laser polarimetr y with enhanced corneal compensation in patient s with open-angle glauco ma	J Glaucoma	17	24-29	2008
Shimazawa M, Ino kuchi Y, Ito Y, Murata H, Aihara M, Miura M, Arai e M and Hara H:	Involvement of ER stres s in retinal cell death	Mol Vis	13	578-587	2007

Shimazawa M, Ito Y, Inokuchi Y, and Hara H	Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase in ER stress-induced retinal neuron damage	Invest Ophthalmol Vis Sci	48	3729-3736	2007
原英彰	脳虚血及び網膜障害による神経細胞死と小胞体ストレス	Pharma Medica	25	143-144	2007
Yi-Ning Chen, Hideyuki Yamada, Wei Mao, Shigemitsu Matsuyama, Makoto Aihara, Makoto Araie.	Hypoxia-Induced Retinal Ganglion Cell Death and the Neuroprotective Effects of Beta-adrenergic Antagonists	Brain Research	7	28-37	2007
Okumichi H, Mizukami M, Kiuchi Y, Kanamoto T.	GABA(A) receptors are associated with retinal ganglion cell death induced by oxidative stress	Exp Eye Res	3	In press	2008
Mizukami M, Kanamoto T, Souchelnitskiy N, Kiuchi Y	Proteome profiling of embryonic chick retina	Proteome Sci	22	3-6	2008
Okumichi H, Kanamoto T, Souchelnitskiy N, Tanimoto S, Tanaka K, Kiuchi Y	Proteomic analyses of retina of excitatory amino acid carrier 1 deficient mice	Proteome Sci	21	13-16	2007