

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 安藤 亮

### 学位論文題名

#### 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)

【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) は主要な蛋白分解経路の一つであり、細胞内における蛋白質の 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蛋白の変異では 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 において蛋白分解を担う酵素複合体プロテアソームは 3 つの蛋白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組織で報告されており、したがって同様にプロテアソーム機能の低下が網膜色素変性を惹起する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  $\beta 5t$  トランスジェニックマウス ( $\beta 5t$ -Tg) は、本来胸腺に特異的に発現している  $\beta 5t$  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新規のマウスである。今回我々はこの  $\beta 5t$ -Tg マウスを用いて、プロテアソーム機能が primary に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した。

【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。 $\beta 5t$  蛋白について免疫染色、ウエ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。ロドプシン蛋白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】 免疫染色とウエスタンブロットで網膜の  $\beta 5t$  の発現について検討した。 $\beta 5t$ -Tg マウスでは網膜全体に  $\beta 5t$  が局在し、CTR マウスでは染色されなかった。ウエスタンブロットも  $\beta 5t$ -Tg マウスでのみ  $\beta 5t$  に相当するバンドを検出した。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た。 $\beta 5t$ -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。網膜の組織学検討では 6 ヶ月齢、9 ヶ月齢ともに、内顆粒層 (INL) 厚は両者に差が無かったのに対し、

外顆粒層 (ONL) 厚は  $\beta 5t\text{-Tg}$  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.  $\beta 5t\text{-Tg}$  マウス;  $1.66 \pm 0.03$  vs.  $0.86 \pm 0.02$ ,  $p < 0.001$ ) でも 9 ヶ月齢 ( $1.49 \pm 0.02$  vs.  $0.63 \pm 0.04$ ,  $p < 0.001$ ) でも統計学的有意な差が認められた。この結果に一致して網膜電図検査では a 波の振幅が  $\beta 5t\text{-Tg}$  マウスで有意に低下していた。

視細胞における蛋白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  $\beta 5t\text{-Tg}$  の網膜外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は cleaved caspase-3 や cleaved caspase-9 の免疫染色と TUNEL の共染色をおこなったが陰性だった。網膜抽出液を用いた caspase 活性測定も同様の結果だった。一方、AIF の免疫染色では TUNEL 陽性細胞に 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】今回の研究結果から、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) 視細胞関連蛋白の遺伝子変異がなくとも視細胞変性を生じること、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。

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十分考えられた。実際、プロテアソーム活性の低下した  $\beta 5t\text{-Tg}$  マウスでは明らかに網膜外層つまり視細胞の変性を来し、機能的にも網膜障害を示していた。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、視細胞では蛋白産生が非常に多いことから、その蛋白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。

過去の報告において、様々な視細胞関連蛋白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。変異ロドプシン蛋白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。プロテアソーム機能不全によって細胞内への蛋白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で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、 $\beta 5t\text{-Tg}$  マウスと CTR マウスの差異もなかった。

続いて視細胞死の経路について検討した。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 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 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。

【結論】今回の結果は、プロテアソーム機能の低下が *in vivo* で視細胞死のアポトーシスを惹起することを初めて示したものである。このことは、ヒト網膜色素変性の病態にプロテアソーム機能低下が関わっている可能性を示唆しており、今後さらなる検討を進めていきたい。