

抗てんかん薬バルプロ酸で視覚機能回復ができるか

(代表) 公受 裕樹 (医薬保健学域医学類 4年)

指導教員

郡山 恵樹 医薬保健研究域医学系 准教授

1. 背景と研究目的

網膜色素変性症 (retinitis pigmentosa) は長い年月をかけて網膜組織中に存在する視細胞が退行変性していき、主に進行性の夜盲、視野狭窄を認める眼科疾患である¹⁾。発症初期は輪状暗点がみられ、視覚異常がはじまって5年以内に輪状暗点の外側の周辺視野が消失する。さらに視野狭窄が年々と少しずつ進行することが知られている。網膜色素変性症は成人中途視覚障害原因の第3位であり、国内には約5万人、世界では約200万人以上の患者がおり、1996年に厚生省から難病指定を受けている。近年、点眼剤による網膜神経保護や遺伝子治療²⁾、また、iPS細胞や幹細胞を用いた治療研究³⁾が全世界で行われているものの、効果的な根本的治療法が見つかっていないのが現状である。網膜色素変性症のモデルとしてこれまで先天的に視細胞や網膜色素細胞の遺伝子に変異を持ったモデルが本症の分子病態解明に使われてきた^{4)、5)}。また、持続的な光照射によっても視細胞死を誘発することができ、簡単な色素変性症モデルとして用いられてきた⁶⁾。しかし、それらは系統維持費用やモデルの不安定性に問題がある。近年、それらを解決できる新たな網膜色素変性症モデルが確立された^{7)、8)}。メチルニトロソ尿素 (N-methyl-N-nitrosourea: MNU) 誘発性の網膜色素変性モデルである。MNUは分子量103.1のメチル基を有するニトロソ化合物であり、単回の腹腔内投与により安定的で、視細胞特異的な細胞障害を数日で誘発するため網膜色素変性症モデルの誘導に用いられるようになってきた。

一方、バルプロ酸ナトリウムは抗けいれん薬と気分安定薬作用がある有機化合物であり、主にてんかんの治療として用いられてきた。その作用は、神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸 (GABA) トランスアミナーゼを阻害し、GABA濃度を増加させるために神経の興奮性を抑えると考えられてきた。しかし、近年バルプロ酸ナトリウムのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤としての役割が注目されてきた⁹⁾。ヒストン脱アセチル化酵素は、アセチル化されたヒストンタンパク質からアセチル基を除き、クロマチン構造を形成させることで遺伝子の転写を抑制する作用をする。つまり、バルプロ酸ナトリウムはヒストンをアセチル化し、

生存因子を含むさまざまなタンパク質の転写を促進する可能性を持つことが分かり、神経新生、分化促進、神経保護作用と多岐にわたる効果が認められている。

本研究は抗てんかん薬でもあるバルプロ酸ナトリウムが MNU により誘発される網膜色素変性症モデルにおける視細胞死に対して保護効果を示すかどうか調べ、治療応用への可能性を探ることを目的とした。また、MNU による視覚依存性行動の低下に対してバルプロ酸ナトリウムが回復効果を示すかどうかについて行動学的手法によって精査するものである。

2. 研究方法

・実験材料

バルプロ酸ナトリウムはシグマアルドリッチ社から購入した。

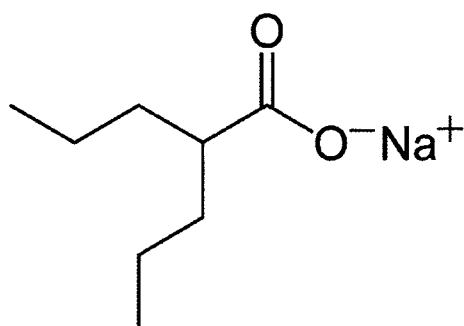


図1. バルプロ酸ナトリウムの構造

・マウスへの薬物投与およびサンプルの作成

MNU は 60 mg/kg の濃度となるように、マウス (C57BL/6, 9 週齢) の腹腔内に単回投与した。バルプロ酸ナトリウムは MNU 処理の 1 日前に 30G の注射針を用いて眼球内投与した。各処理後のマウスは 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、眼球を包埋し凍結切片を作成した。

・マウス網膜の形態観察

網膜切片はヘマトキシリン・エオジン染色を行い、主に網膜の視細胞層 (ONL) の厚さを測定・定量した。

・マウス網膜の terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labelling (TUNEL) 染色

各薬物処理された網膜切片は TUNEL 染色をし、アポトーシスの程度を観察・定量化した。

・マウスの視覚断崖試験

マウスが視野を持つかどうか調べるために視覚断崖試験¹⁰⁾を行った。視覚断崖試験(図. 5) はもともと言葉の話をしない乳児が視野を持つかどうか判定するために使用される視覚依存的な奥行き空間認識試験であり、これをマウスの視覚機能改善試験として用いた。視覚断崖試験は台の半分を透明にした状態で、台上の地柄と、ガラスを通して下に見える地柄が、勾配をなすようにし、奥行きを知覚してガラスの手前で止まるかどうかをテストした。マウスは高所に対して恐怖を示すので、視覚を持つ個体はガラス手前(机上部分)で止まる、あるいはその領域で過ごす時間が長い。それに対して、視野を持たない個体は高所も関係なくランダムに行動する。机上部分から出る時間(Latency)を測定・定量化した。

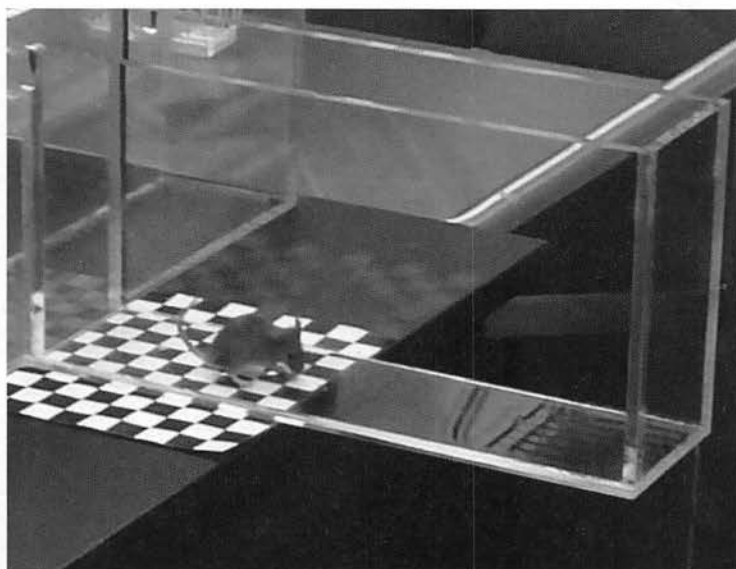


図2. 視覚断崖試験

3. 研究結果と考察

MNUの腹腔内投与により、網膜の外顆粒層(視細胞が存在する場所)において、特異的に2から3日目をピークとしたTUNEL染色陽性のアポトーシスが誘導された。(処理0日目の網膜外顆粒層における一視野あたりのTUNEL陽性細胞数は 1 ± 0.33 であったのに対し、3日目では、 79.5 ± 2.68 であった。)5日目以降は細胞体の消失が認められるため、TUNEL染色細胞数は3日目よりも低下した。また、3日目以降の形態観察では、視細胞の脱落・変性が起こり、7日目ではほとんど視細胞層が消失した(図. 3)。

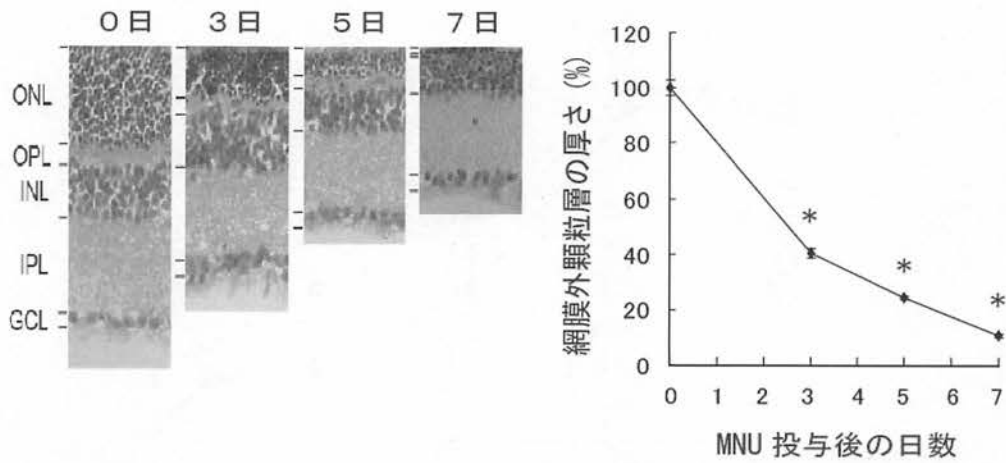


図3. MNU投与後の網膜外顆粒層の継時的な脱落変化

また、MNU処理3日目に網膜外顆粒層の厚みは対照群のおよそ40%まで低下するが、バルプロ酸ナトリウムの眼球内前処理により、およそ80%まで回復させることが分かった。

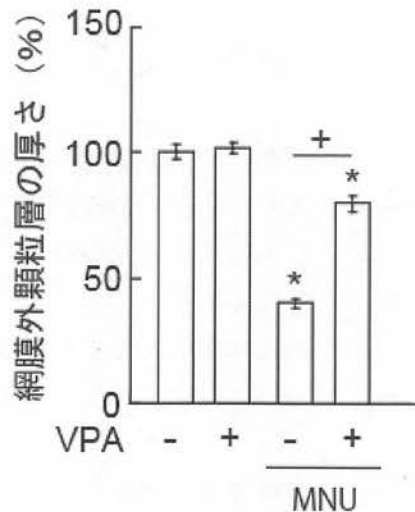


図4. バルプロ酸ナトリウム (VPA) による網膜保護作用

一方、視覚断崖試験において、MNU投与群は時間依存的に机上部分から出る時間が短くなった。これはMNUにより視覚機能が弱くなっていくことを示唆している。バルプロ酸ナトリウムの前処理群ではMNUの視覚依存性行動の低下を、3日目、5日目で有意に回復することができた(図.5)。これは網膜外顆粒層の保護作用の期間とほぼ一致するため、バルプロ酸ナトリウムの保護作用に起因する視覚依存行動の回復であることが示唆された。

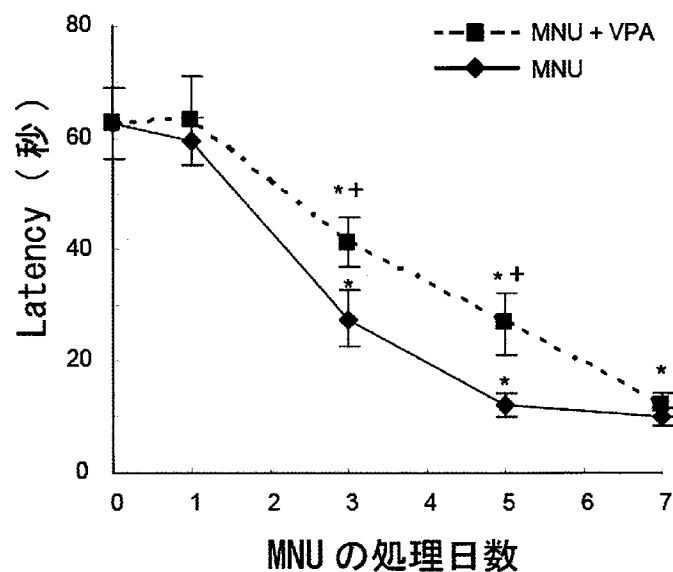


図.5 MNUによる視覚依存性行動の低下とバルプロ酸ナトリウム (VPA) によるその回復

4. 結論

1. マウス腹腔内に MNU を投与すると時間依存的に網膜視細胞層が脱落を受けた。
2. バルプロ酸ナトリウムの眼球内投与は MNU の視細胞の脱落を有意に妨げた。
3. 視覚依存的な空間認識を行動により測定する視覚断崖試験により MNU による時間依存的な視覚機能の減弱が見られた。
4. バルプロ酸ナトリウムの投与により MNU による視覚機能減弱を回復する行動が統計学的にも有意であった。

バルプロ酸ナトリウムはマウス網膜色素変性症モデルに対し、有意に視細胞の脱落を抑制することが分かった。バルプロ酸ナトリウムはヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であることから、遺伝子転写活性抑制を解除する作用が知られている。それにより多くの生存に関わる遺伝子の発現が促進されることが解明されつつある。バルプロ酸ナトリウムによって転写誘導される生存シグナルを同定し網膜色素変性症に対する治療薬開発に寄与したい。

参考文献

1. Berson EL. Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture. Invest Ophthalmol Vis Sci. 34, 1659-1676 (1993).
2. Rossmiller B, Mao H, Lewin AS. Gene therapy in animal models of autosomal dominant retinitis pigmentosa. Mol Vis. 18, 2479-2496 (2012)
3. Jin ZB, Okamoto S, Osakada F, Homma K, Assawachananont J, Hiramami Y, Iwata T, Takahashi M. Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells. PLoS One. 6, e17084 (2011).
4. Fletcher EL, Jobling AI, Vessey KA, Luu C, Guymer RH, Baird PN. Animal models of retinal disease. Prog Mol Biol Transl Sci. 100, 211-286 (2011).
5. Voaden MJ. Retinitis pigmentosa and its models. Prog Retin Eye Res. 10, 293-331 (1991).
6. Remé CE, Grimm C, Hafezi F, Marti A, Wenzel A. Apoptotic cell death in retinal degenerations. Prog Retin Eye Res. 17, 443-464 (1998).
7. Nakajima M, Nambu H, Shikata N, Senzaki H, Miki H, Tsubura A. Pigmentary degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea and the fate of pigment epithelial cells in the rat retina. Pathol Int. 46, 874-882 (1996).
8. Nambu H, Yuge K, Nakajima M, Shikata N, Takahashi K, Miki H, Uyama M, Tsubura A. Morphologic characteristics of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in C57BL mice. Pathol Int. 47, 377-383 (1997).
9. Zhang Z, Qin X, Tong N, Zhao X, Gong Y, Shi Y, Wu X. Valproic acid-mediated neuroprotection in retinal ischemia injury via histone deacetylase inhibition and transcriptional activation. Exp Eye Res. 94, 98-108 (2012).
10. de Lima S, Koriyama Y, Kurimoto T, Oliveira JT, Yin Y, Li Y, Gilbert HY, Fagiolini M, Martinez AM, Benowitz L. Full-length axon regeneration in the adult mouse optic nerve and partial recovery of simple visual behaviors. Proc Natl Acad Sci U S A. 109, 9149-9154 (2012).