

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 8 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 年度 ～ 2012 年度

課題番号：23790678

研究課題名（和文）ミトコンドリア DNA の遺伝情報に基づいた加齢性白内障の素因と早期予測

研究課題名（英文）Early prediction of senile cataract based on the elucidation of mitochondrial DNA

研究代表者

長井 紀章（NAGAI NORIAKI）

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号：90411579

研究成果の概要（和文）：急速かつ強いレベルの酸化的刺激は、ヒト水晶体上皮においてミトコンドリア傷害を引き起こすこと、また、この傷害には、刺激に対するミトコンドリアの感受性に加え、細胞膜の反応性・抵抗性が密接に関わることを明らかとした。さらに、これらミトコンドリア機能低下は、早期において可逆的であるが、機能回復には時間を有することを示した。以上、一過性のミトコンドリア傷害の繰り返しは、水障体白濁に繋がる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that the rapidly and high production of nitric oxide (NO) caused to the mitochondrial damage in the human lens epithelial cells, and the balance in sensitivity of mitochondria and cell membrane to NO were related the mitochondrial dysfunction. In addition, the recovery time for mitochondrial function is related to exposure time to NO in human lens epithelial cells. The repetition in temporary mitochondrial dysfunction may be caused the lens opacification.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	400,000	120,000	520,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：ミトコンドリア DNA、水晶体上皮細胞、シトクロム c オキシダーゼ、白内障、一酸化窒素、酸化的ストレス、ATP、Ca<sup>2+</sup>-ATPase

### 1. 研究開始当初の背景

白内障は水晶体の混濁が認められる全ての状態を示す。この治療法として、混濁した水晶体を摘出し、眼内レンズを移植する外科手術が唯一有効な方法である。しかし、この外科的手術も完全な治療法とはいえ後発白内障等の問題点が残っている。したがって、現段階では健康な状態時からビタミンなど抗酸化物の摂取を行い、加齢による白内障の進行を止めることが、白内障治療には最も効果的と考えられる。一方、白内障の中で最も発症率が高い加齢性白内障では長期に渡りゆっくりと進行するため、白内障が発症する

かわからない状態から、その予防を日々続けることは非常に困難である。このため自分が将来白内障になりやすいかどうかを早期予測することは白内障予防において非常に意義あることと考えられている。しかし、白内障発症を予防・予測するための生体因子については見つかっていない。

申請者はこれまで、白内障発症を予防・予測するための生体因子として、水晶体中でのミトコンドリアに着目し、遺伝性白内障モデルラットを用い、水晶体中の一酸化窒素 (NO) 過剰産生はミトコンドリア DNA に影響を与え、ATP 産生能が低下すること報告した。さらに、

この ATP 低下は  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の機能不全につながり ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase は ATP をエネルギー源として細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  制御を行っているため)、その結果水晶体中のイオンバランスが崩壊するという現象を明らかとするなど、ミトコンドリアが水晶体混濁に強く関与することを明らかとしていた (Toxicology, 2007;242:7-15)。

## 2. 研究の目的

上述の様に、遺伝性白内障モデルラットを用い、水晶体中の一酸化窒素過剰産生はミトコンドリア DNA に影響を与え、結果として水晶体混濁に強く関与することを報告していた (Toxicology, 2007;242:7-15)。また、これらミトコンドリア DNA は母親から子に受け継がれる特性を有しており、ミトコンドリアの傷害性と水晶体混濁の関係を明らかとすることは、白内障発症予防につながるとともに、自分が将来白内障になりやすいかどうかを簡易的に予測するための有用な生体因子になりうるものと考えた。したがって、水晶体上皮細胞でのミトコンドリア傷害と白内障発症の関係を明確にすることを主目的として本研究を企画した。

## 3. 研究の方法

(1) 実験動物及び培養細胞：実験動物は遺伝子白内障ラットである、UPL ラット (UPLR)、朱宮白内障ラット (UPLR) 及び井原白内障ラット (ICR) を用いた。また、培養細胞はヒト水晶体上皮細胞株 SRA01/04 を用いた。

(2) 前眼部画像解析：ラットの前眼部スリット像の撮影は、前眼部画像解析装置 EAS-1000 (ニデック社製) を用いて行った。また、1ヶ月の撮影において得られたスリット像から経時的に画像解析をし、水晶体混濁推移の数値化を行った。

(3) 水晶体中  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 酵素活性の測定：水晶体を氷中でホモジナイズし、このホモジネートを  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 酵素活性測定試料とした。 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 酵素活性の測定法は、上記ホモジネートを 2 本に分け、 $\text{CaCl}_2$  存在下又は非存在下での ATP 分解により放出される無機リン酸 (Pi) 量の差により算出した。得られた結果は総タンパク質量当りの量として表した。

(4) 水晶体中過酸化脂質 (LPO) 量の測定：LPO Assay Kit (BIOXYTECH® LPO-586™) を用いてマロンジアルデヒド及び 4-ヒドロキシアルケンを分析することにより測定した。得られた結果は総タンパク質量当りの量として表した。総タンパク質量は Bio-Rad Protein Assay Kit (バイオ・ラッドラボラトリーズ

社製) を用いて測定した。

(5) 遺伝子発現量の測定：LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (ロシュ社製) を用い RNA から cDNA を合成した。また、PCR 装置 (LightCycler, ロシュ社製) を用いたリアルタイム PCR 法により遺伝子発現量の測定を行った。得られた結果はハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に対する比として表した。

(6) NO 産生量の測定：回収した培地にエイコム社製マイクロダイアリシスプローブ (A-1-20-05, 5 mm length) 及び酸化窒素分析システム ENA-20 (エイコム社製, 京都, 日本) を用い水晶体中 NO 量を測定した。本研究では  $\text{NO}_2$  量として表した。

(7) 水晶体中シトクロム c オキシダーゼの測定：シトクロム c オキシダーゼ (CCO) 活性測定はミトコンドリア抽出キット及び CCO 活性測定キットを用いて行った。得られた結果は総タンパク質量当りの量として表した。

(8) 総タンパク質量の測定：総タンパク質量は Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories 社製, CA, U. S. A.) を用いて測定した。

## 4. 研究成果

(1) 種々遺伝性白内障モデルを用いた酸化刺激に対するミトコンドリア及び細胞膜の反応・抵抗性

3 種の異なる遺伝性白内障モデルラット (UPLR, SCR 及び ICR) はいずれも酸化ストレス (一酸化窒素や過酸化脂質など) により水晶体混濁を引き起こすことが知られている。これらラットを用い、加齢に伴う水晶体混濁とミトコンドリア障害を検討したところ、UPLR で顕著なミトコンドリア傷害に伴う水晶体白濁がみられた。一方、SCR や ICR では細胞膜傷害による水晶体白濁がみられ、ミトコンドリア傷害に伴う水晶体混濁は、細胞膜傷害による混濁と比較し、その進行速度が遅いことを明らかとした (図 1)。

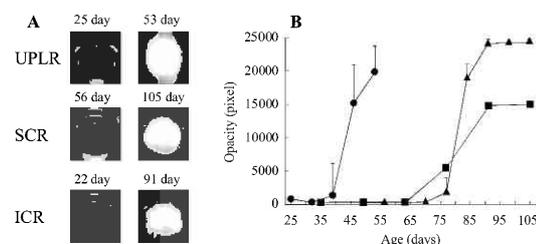


図 1 種々遺伝性白内障モデルラットにおける加齢に伴う水晶体白濁度

また、細胞膜傷害を示した ICR を用い、過酸化水素の細胞膜に対する反応・抵抗性を検討したところ、正常なラット群と比較し、細胞傷害性を受けやすく、これら脂質過酸化に伴い細胞膜及び筋小胞体  $Ca^{2+}$ -ATPase (PMCA 及び SERCA) 活性が低下することがわかった (図 2)。

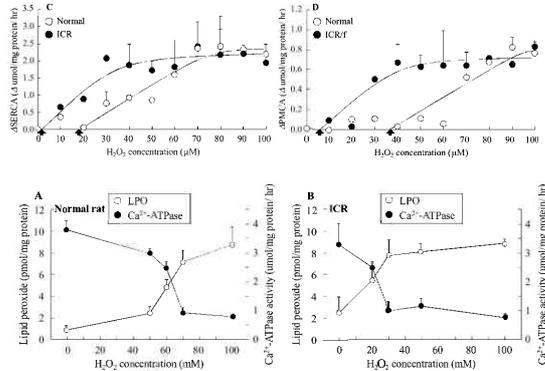


図 2 過酸化水素による脂質過酸化と  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性の低下

(2) 一酸化窒素がヒト水晶体上皮細胞中ミトコンドリア機能へ及ぼす影響

IFN- $\gamma$  及びリポポリサッカライド (LPS) によりヒト水晶体上皮細胞を併用刺激することで、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 遺伝子発現及び NO 量の増加が見られた (図 3A, C)。またこれら増加は、iNOS の阻害剤であるアミノグアニジン (AG) または ジエチルジチオカルバミン酸 (DDC) により抑制された (図 3B, D)。これらの結果から IFN- $\gamma$  及び LPS 併用刺激により、処理後 48 時間においても過剰な NO 産生が見られることが確認できた (図 3)。

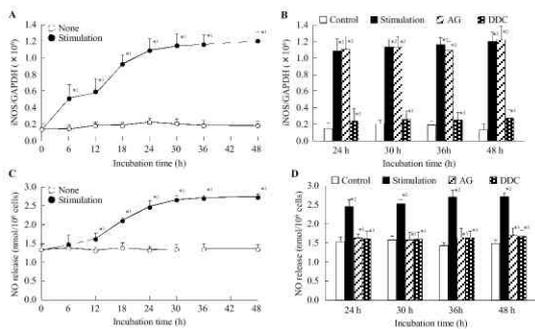


図 3 ヒト水晶体上皮細胞における一酸化窒素過剰産生

この NO 過剰産生時における CCO 活性及び脂質過酸化の変化を検討したところ、脂質過酸化の変化は見られなかった (図 4B)。一方、CCO 活性の低下及びそれに伴う ATP 量の減少がみられ (図 4A, C)、これら CCO 及び ATP 量

の減少は、iNOS の阻害剤 (AG または DDC) により抑制された (図 4D, E)。

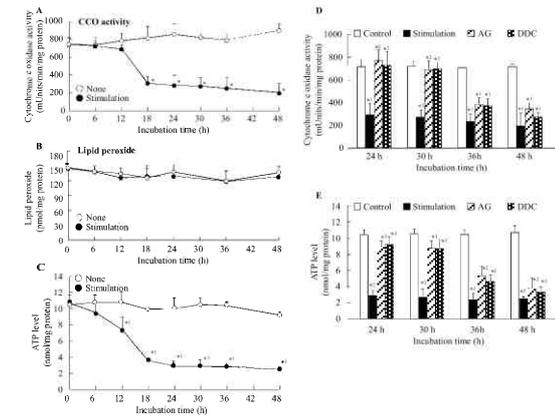


図 4 ヒト水晶体上皮細胞における一酸化窒素過剰産生と CCO 活性低下

上記過剰な NO 刺激によるミトコンドリア機能の低下が、可逆的・不可逆的であるのかを検討すべく、IFN- $\gamma$  及び LPS 併用処理 30 時間後に、刺激を取り除くことで、一度低下した CCO 活性がどのように変化するかについて検討した (図 5A)。30 時間にわたる IFN- $\gamma$  及び LPS 併用刺激により低下したミトコンドリア機能 (CCO 活性) は、12 時間に渡り回復は見られなかったが、その後徐々に機能回復がみられた。ATP 量においても CCO と同様の挙動を示した (図 5B)。

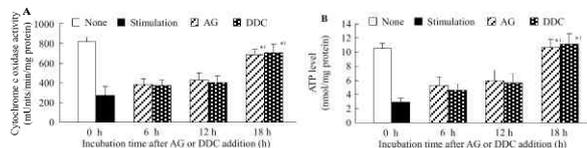


図 5 過剰な NO 刺激に伴う CCO 活性低下とその機能回復について

(3) 結論

上記の研究成果により、ヒト水晶体での急速かつ強いレベルの酸化刺激はミトコンドリア傷害を引き起こすこと、また、これら早期におけるミトコンドリア機能の低下は可逆的であるが、その回復には時間を有することを明らかとした (図 6)。水晶体は皮膚などの組織と異なり、成長に伴い細胞が内部に移動するため、これらミトコンドリア機能の低下は、水晶体でのイオン制御を一時的に弱め、結果として水晶体白濁が徐々に進むことを示唆した。したがって、母親に白内障発症みられる際には、このミトコンドリア障害の機能回復が遅い可能性が考えられ、同様の遺伝情報を有する自身も今後酸化刺激による白内障発症が起こりやすい可能性あるもの

と考えられる。本研究結果は、白内障発症の早期予測を実現する上で重要な知見であると思われる。

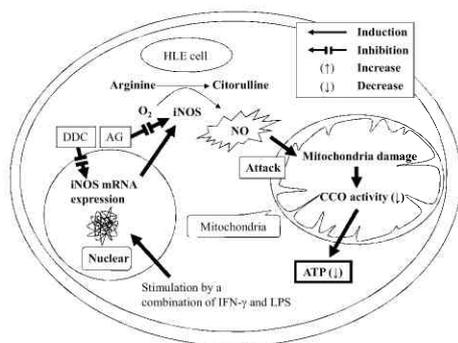


図 6 ヒト水晶体上皮細胞における一酸化窒素過剰産生とミトコンドリア傷害のイメージ

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Nagai N., Ito Y. Dysfunction in Cytochrome c Oxidase Caused by Excessive Nitric Oxide in Human Lens Epithelial Cells Stimulated with Interferon- $\gamma$  and Lipopolysaccharide, *Curr Eye Res.*, 査読有, 37, 889-897, 2012.

Nagai N., Ito Y, Takeuchi N, Correlation between Hyper-Sensitivity to Hydrogen Peroxide and Low Defense against  $Ca^{2+}$  Influx in Cataractogenic Lens of ICR/f Rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 34, 1005-1010, 2011.

[学会発表] (計 2 件)

Nagai N., Ito Y. Adverse Effect of Excessive Nitric Oxide on Cytochrome c Oxidase in UPL Rat Lens and Human Lens Epithelial Cells, XX International Congress of Eye Research, July, 21-25, 2012, Berlin, Germany.

長井紀章, 楠山侑里, 伊藤吉將. ヒト水晶体上皮細胞株 SRA01/04 での一酸化窒素過剰産生がミトコンドリア機能へ与える影響, 第 38 回 水晶体研究会, 2012 年 1 月 7-8 日, 東京.

[その他]

ホームページ:

<http://www.phar.kindai.ac.jp/pharmtec/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長井 紀章 (NAGAI NORIAKI)

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号: 90411579

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし