

総 説

メチルニトロソ尿素誘発網膜変性動物モデルの特徴と ヒト網膜色素変性症治療法開発への応用

義澤 克彦¹⁾²⁾, 螺良 愛郎¹⁾

¹⁾関西医科大学病理学第二講座, ²⁾藤沢薬品工業(株)安全性研究所

要 約

背景: ヒト網膜色素変性症(RP)は視細胞, 特に杆体細胞の進行性的変性を特徴とし, 失明を来す遺伝性疾患で, 未だ有効な治療法のない難病である。病態の理解と治療法の開発には動物モデルの存在が必須である。メチルニトロソ尿素(N-methyl-N-nitrosourea, MNU)によるヒト RP の動物モデルの確立と, その病態制御につき概説する。

結果: MNU は, マウス・ラット・ハムスター・シンス・サル¹⁾の成獣に各々の 60, 60~75, 90, 65, 40 mg/kg・体重を単回投与すると, 7日の経過で視細胞の消失を特徴とする網膜変性症を惹起する。ラットにおける MNU による網膜変性の発症機序は, Bcl-2 の発現抑制, Bax の発現亢進とカスパーゼファミリーの活性化増強が関与した視細胞アポトーシスに起因する。視細

胞アポトーシスによる網膜変性はヒト RP と同一機転である。MNU 誘発ラット網膜変性症モデルを用いて, カスパーゼ 3 阻害剤(Ac-DEVD-CHO)の硝子体内投与, ニコチン酸アミドの皮下投与, あるいはドコサヘキサエン酸の混餌投与により, 視細胞の消失を抑制した。

結論: MNU 誘発網膜変性動物モデルは, ヒト RP とは病因は異なるが, いずれも視細胞アポトーシスという共通の機構による。よって, このモデルを用いた病態制御効果は, ヒト RP の治療法樹立に有用な情報を提供するものと考えられる。(日眼会誌 109: 327-337, 2005)

キーワード: メチルニトロソ尿素, 網膜変性, 視細胞, アポトーシス, カスパーゼ 3 阻害剤, ニコチン酸アミド, ドコサヘキサエン酸

A Review

Characteristics of N-methyl-N-nitrosourea-induced Retinal Degeneration in Animals and Application for the Therapy of Human Retinitis Pigmentosa

Katsuhiko Yoshizawa¹⁾²⁾ and Airo Tsubura¹⁾

¹⁾Department of Pathology II, Kansai Medical University

²⁾Toxicology Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd. (Present address; Laboratory of Experimental Pathology, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC 27709, USA)

Abstract

Background: Retinitis pigmentosa (RP) is a human disease characterized by loss of photoreceptor cells, especially rods, leading to visual disturbance and eventually to blindness. Effective treatment for RP control is still unavailable. The establishment of reliable animal models is essential for a better understanding of this disease, and for the development of therapeutic intervention. Here we summarize the establishment of N-methyl-N-nitrosourea

(MNU)-induced retinal degeneration in animals, and success in disease control using this model.

Results: Retinal damage induced by MNU was highly reproducible and involved photoreceptor cell loss. It was obvious in all animals at approximately 7 days following a single systemic administration of MNU to adult mice (60 mg/kg), rats (60~75 mg/kg), hamsters (90 mg/kg), shrews (65 mg/kg), and monkeys (40 mg/kg). Extensive investigation in the

別刷請求先: 〒570-8506 守口市文園町 10-15 関西医科大学病理学第二講座 螺良 愛郎
(平成 16 年 10 月 1 日受付, 平成 16 年 11 月 2 日改訂受理)

Reprint requests to: Airo Tsubura, M. D., Ph. D. Department of Pathology II, Kansai Medical University, 10-15 Fumizono-cho, Moriguchi 570-8506, Japan

(Received October 1, 2004 and accepted November 2, 2004)

rats revealed that MNU-induced photoreceptor cell loss was due to apoptosis with a decrease of Bcl-2 protein, increase of Bax protein, and activation of caspase families. Therapeutic to control MNU-induced photoreceptor cell loss in rats was evaluated with caspase-3 inhibitor (Ac-DEVD-CHO), nicotinamide (NAM), and docosahexaenoic acid (DHA); 4,000 ng Ac-DEVD-CHO injected intravitreally 0 and 10 h after MNU suppressed disease progression, 25-1,000 mg/kg NAM subcutaneously injected concurrently or subsequently to MNU reversed retinal damage, and dietary supplementation of 9.5% DHA counteracted photoreceptor cell loss.

Conclusion: Although the mechanisms trigger-

ing pathogenesis and the apoptotic cascade may differ between animals and humans, MNU-induced retinal degeneration is caused by photoreceptor cell apoptosis. Thus, suppression of MNU-induced photoreceptor cell apoptosis in animals may provide therapeutic information for RP control in humans. Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 109: 327-337, 2005)

Key words: N-methyl-N-nitrosourea, Retinal Degeneration, Photoreceptor cell, Apoptosis, Caspase-3 inhibitor, Nicotinamide, Docosahexaenoic acid

I 緒 言

網膜色素変性症 (retinitis pigmentosa, RP) は幼少期より夜盲 (暗順応障害) と周辺視野狭窄を主訴とし、両眼性、進行性で中年ないし老年期に至って失明を来す重篤な遺伝性疾患で、網膜視細胞、特に杆体細胞の障害を特徴とする^{1)~5)}。遺伝形式は常染色体優性・劣性、X染色体連鎖遺伝などがあるが、日本では家族歴のない散発例が多い。現在、罹患者は世界で約200万人、日本で3~4万人で、3,500~4,000人に1人の割合で発症するといわれている。ヒトRPにおいてロドプシン遺伝子の点突然変異が報告され、以後ペリフェリン/RDS、アレステンなど機能の異なる様々な原因遺伝子が発見されてきたが、網膜変性はいずれも視細胞アポトーシスという共通の機構による^{1)~5)}。ビタミン、成長因子、カルシウム阻害剤といった薬物治療に加え、胎児網膜移植、幹細胞移植や遺伝子治療などが実験的に試みられているが^{6)~9)}、未だ有効な治療法は確立していない。我々はRPが原因の如何に拘わらず、視細胞アポトーシスという共通の機構によることに着目し、簡便かつ確実に、しかも短期間に視細胞アポトーシスを動物に誘発し得るメチルニトロソ尿素 (N-methyl-N-nitrosourea, MNU) を用い、RPの動物モデルを確立した。本稿ではこのモデルの特徴を紹介し、病態制御の実際について概説する。

II MNU 誘発網膜変性症の特徴

1. MNU とは

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、光により、あるいは体内で速やかに分解される。実験動物に投与すると、乳腺をはじめ全身諸臓器に発癌性を示し、国際癌研究機関 (IARC) によると、ヒトにも発癌性が示唆される強力な発癌物質である^{10)~13)}。過去にはジアゾメタン合成のために用いられ、また抗癌剤としても使用されていた。MNU は視細胞に標的

を持つ薬剤であり、種々の成獣に単回投与すると、種属を越えて7日の経過で、両側性に、視細胞の消失で特徴づけられる網膜変性症を惹起する^{14)~23)}。また、MNU は幼弱動物への投与により、網膜異形成の他に白内障を誘発することから^{24)~26)}、網膜のみならず眼球毒性物質としてユニークな性格を有する化学物質である。

2. MNU 誘発網膜変性の組織学的進展

50日齢雌 Sprague-Dawley ラットに 75 mg/kg MNU を単回腹腔内投与すると、時間依存性にすべてのラットに、後極部から始まる網膜変性症が起きる¹⁴⁾¹⁵⁾²¹⁾。MNU 投与 12 時間では視細胞の核濃縮を伴う外顆粒層の軽度な配列の乱れに始まり (図 1)、投与 24 時間では核濃縮および核崩壊が進み、3 日以降では視細胞核の崩壊、視細胞内節/外節の短縮・不整化がさらに進み、7 日では外顆粒層が 2~3 層以下ないしは完全な消失をみる。これら視細胞の変性・消失と平行して、MNU 投与 3 日では核分裂を示し、vimentin および神経膠原線維酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 陽性の胞体をもつ Müller 細胞が顕在化し、7 日では色素上皮細胞の網膜内遊走をみる¹⁴⁾¹⁵⁾。なお、3 週以降では網膜の囊胞変性 (cystoid degeneration) が出現する¹⁴⁾¹⁵⁾。

3. MNU による視細胞の変性機転

電子顕微鏡で MNU 投与 24 時間の視細胞をみると、無処置対照網膜 (図 2 A) に比べ、ほとんどすべての視細胞が核濃縮に陥り (図 2 B)、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-dioxigenin nick-end labeling (TUNEL) 法では、ほとんどすべての視細胞核が陽性像を示し (図 3)、DNA fragmentation assay では、180 bp の梯子状構造 (DNA ラダー) が観察される¹⁴⁾²¹⁾²⁴⁾。よって、MNU による視細胞の変性はアポトーシスによる。

4. MNU 誘発視細胞アポトーシスの分子機構

MNU は標的細胞に DNA 付加体を形成し、DNA 修復が起きなければ細胞死 (アポトーシス) を惹起する²⁷⁾。

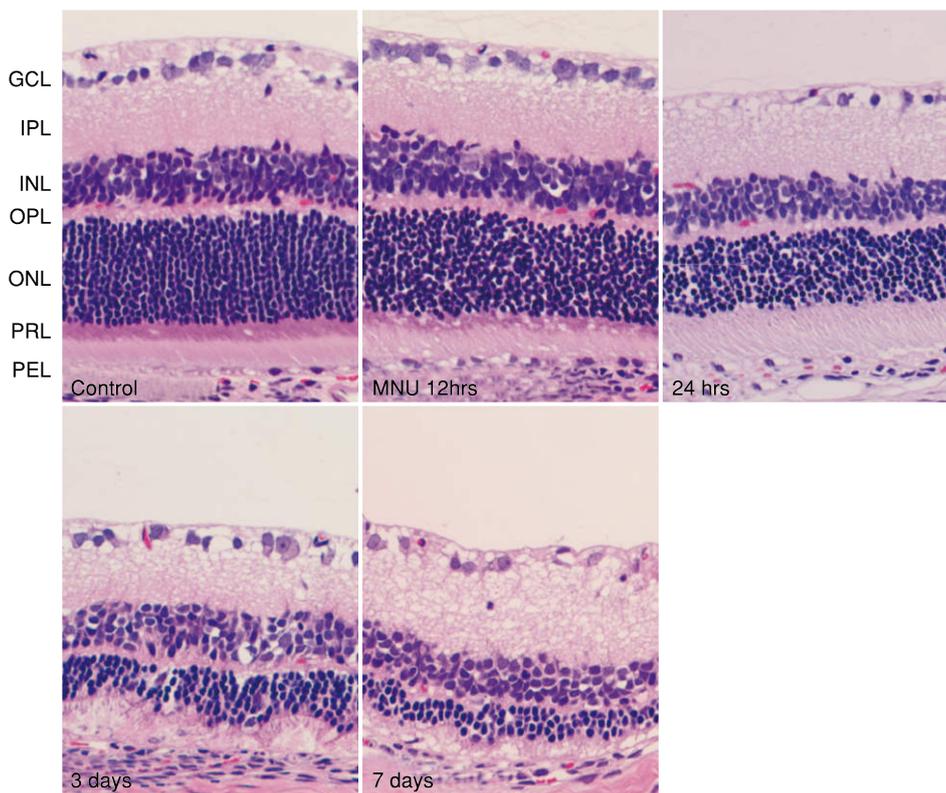


図 1 50 日齢雌 Sprague-Dawley ラットに 75 mg/kg メチルニトロソ尿素(MNU)を単回腹腔内投与 12, 24 時間, 3, 7 日後の網膜の経時的な病理組織学的変化。

GCL: 神経節細胞層, IPL: 内網状層, INL: 内顆粒層, OPL: 外網状層, ONL: 外顆粒層, PRL: 杆体/錐体層, PEL: 網膜色素上皮細胞層, Control: 無処置対照. ヘマトキシリン・エオジン染色. 撮映倍率 400 倍(文献 21 より改変, 引用).

ラットに 75 mg/kg MNU を単回腹腔内投与し, 網膜における DNA 付加体(7-methyldeoxyguanosine)の発現を免疫組織学的にみると²⁰⁾²¹⁾, 投与 12, 24 時間で視細胞核に選択的に陽性所見をみることから(図 4), MNU が直接視細胞に DNA 付加体を形成し, DNA 合成を抑制し, 細胞死を惹き起こすと考えられる. アポトーシスの実行過程には多様な分子が関与するが, Bcl-2 ファミリーとカスパーゼファミリーの網膜における発現をみると²⁰⁾²¹⁾, MNU 投与 12 時間でアポトーシスに抑制的に働く Bcl-2 蛋白の発現抑制, 24 時間でアポトーシスに促進的に働く Bax 蛋白の発現亢進(図 5), 3 日でカスパーゼ 3, 6 および 8 の活性化のピークをみる(図 6). よって, MNU 誘発視細胞アポトーシスは, 視細胞における DNA 付加体形成に始まり, Bcl-2 蛋白の発現抑制, Bax 蛋白の発現亢進と, カスパーゼ 3, 6 および 8 の活性増強が関与している.

5. MNU 誘発網膜変性症にみられる種属差

表 1 に各種成獣への MNU 誘発網膜変性症を来す用量と初発部位, ならびに色素上皮細胞の挙動について記載した. ヒト RP では, 病変は赤道部に初発し, 後極部と周辺部に拡大し, 骨小体様の形態をもつ色素斑で特徴づけられる網膜色素上皮細胞の網膜内血管周囲への集簇が現れる^{1)~5)}. ヒトの病態と各種属に生じた MNU 誘発

網膜変性症を比較すると, 病変の初発は, 霊長類(サル)ではヒトと同様に赤道部に初発するが¹⁹⁾²²⁾²³⁾, 齧歯類(ラット¹⁴⁾¹⁵⁾²⁰⁾²¹⁾, マウス¹⁶⁾¹⁷⁾, ハムスター¹⁸⁾²⁸⁾), 食虫類(スルクス¹⁹⁾²²⁾²³⁾)は何れも後極部に初発する. 初発部位の相違は, 動物種による杆体/錐体細胞の数ならびに分布の違いによると考えられる. また, ヒトと同様に色素上皮細胞の網膜内遊走がみられるのはラットおよびハムスターであり, ハムスターではヒトと同様の網膜内血管周囲集簇が観察される¹⁸⁾. よって, MNU 誘発網膜変性症はいずれも視細胞アポトーシスという, ヒト RP と同一機転によるが, 初発部位や続発する網膜色素上皮細胞の挙動は動物種属間で異なる.

III MNU 誘発ラット網膜変性症の病態制御

1. カスパーゼ 3 阻害剤(Ac-DEVD-CHO)による病態抑制

現在 12 種類以上のカスパーゼが同定されており, これまでにカスパーゼ阻害剤として YVAD-CMK, YVAD-CHO²⁹⁾³⁰⁾, IETD-FMK³¹⁾, DEVD-CHO, DEVD-FMK^{32)~34)}などが種々の網膜変性動物モデルの病態制御に試されている. ラットに 60 mg/kg MNU を単回腹腔内投与し, 0 および 10 時間後に各の 4,000 ng Ac-DEV-D-CHO を硝子体内に投与し, MNU 投与 7 日後に, 周

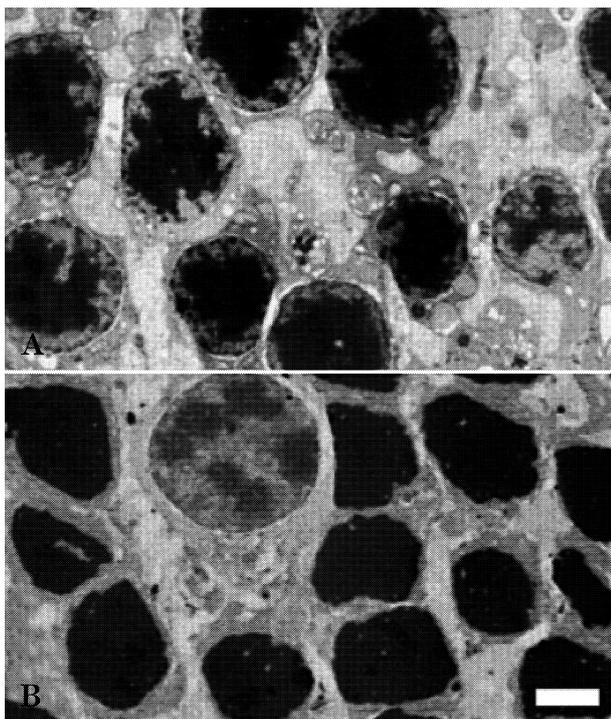


図 2 50 日齢雌 Sprague-Dawley ラットに 75 mg/kg MNU を単回腹腔内投与 24 時間後の視細胞の超微形態学的変化。

無処置対照ラットの視細胞核(A)に比べ、MNU 投与ラットの視細胞核に核濃縮をみるが(B)、Müller 支持細胞(B 図左上)には著変はみない。バーは 3.5 μ m (文献 14 より改変, 引用)

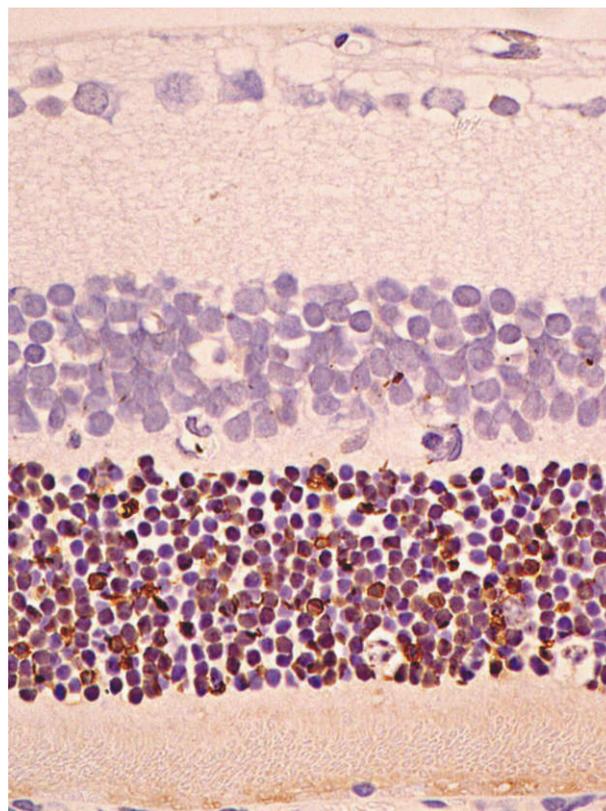


図 3 50 日齢雌 Sprague-Dawley ラットに 75 mg/kg MNU を単回腹腔内投与 24 時間後の網膜の terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-doxigenin nick-end labeling (TUNEL) 染色。

視細胞核に選択的に褐色調の陽性シグナルをみる。撮映倍率 400 倍。

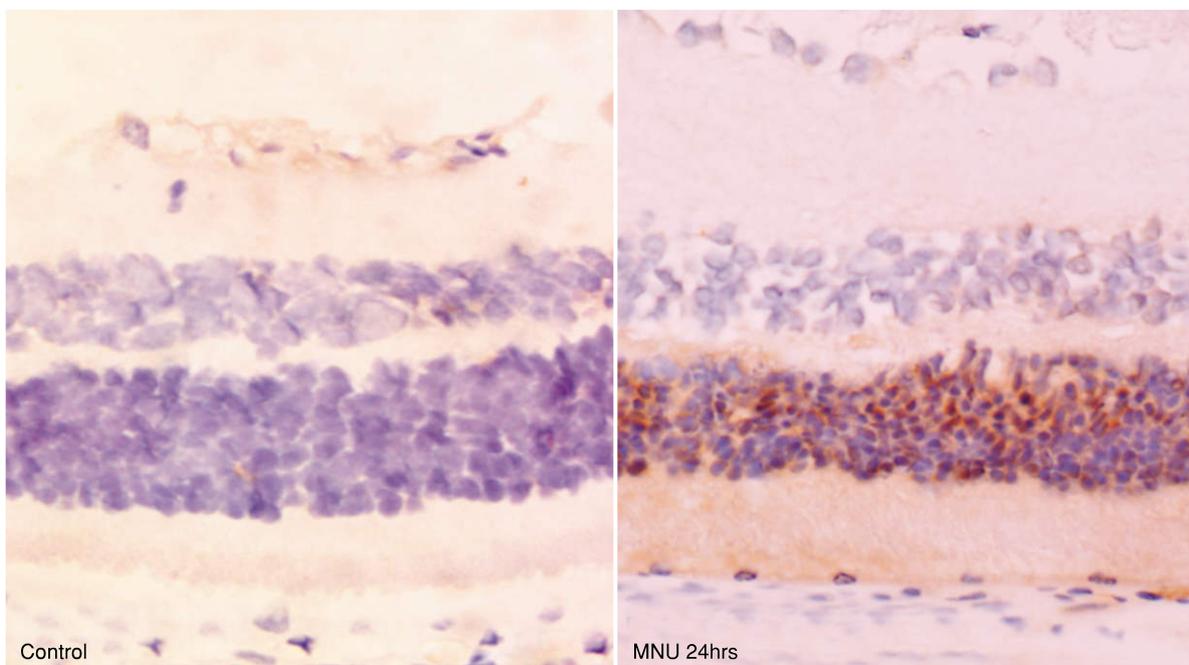


図 4 50 日齢雌 Sprague-Dawley ラットに 75 mg/kg MNU を単回腹腔内投与 24 時間後の網膜の DNA 付加体(7-methyldeoxyguanosine)免疫染色。

無処置対照ラット(左図)では反応がみられないのに対し、MNU 投与 24 時間後では視細胞核に選択的に褐色調の陽性シグナルをみる(右図)。撮影倍率 400 倍(文献 21 より改変, 引用)。

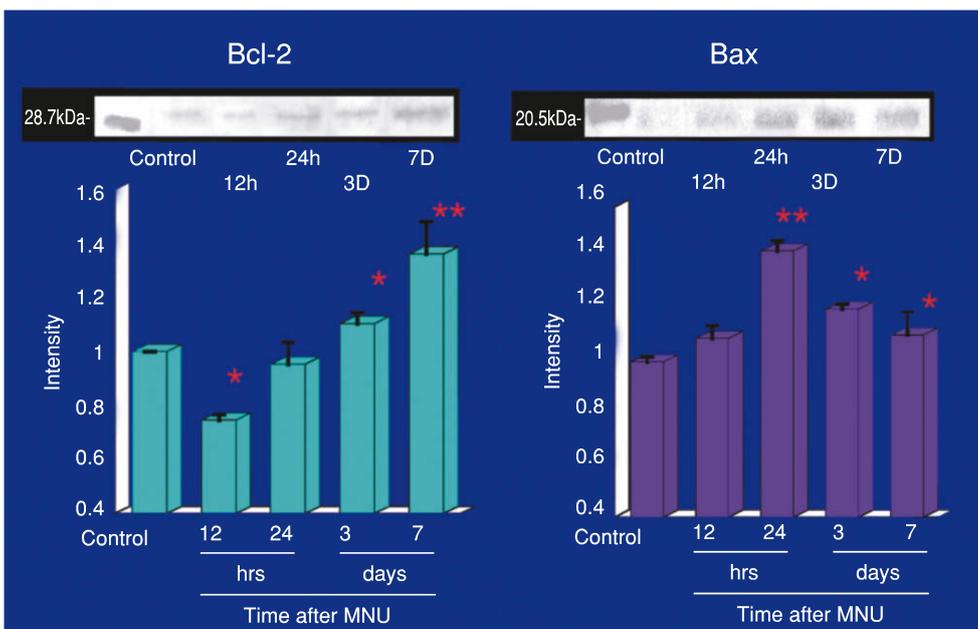


図 5 50 日齢雌 Sprague-Dawley ラットに 75 mg/kg MNU を単回腹腔内投与後の網膜における Bcl-2 と Bax 蛋白発現の経時的変化。
無処置対照網膜に対して Bcl-2 蛋白の発現抑制, Bax 蛋白の発現亢進をみる. *: p<0.05, **: p<0.01. ウェスタンブロッティング法(文献 21 より改変, 引用).

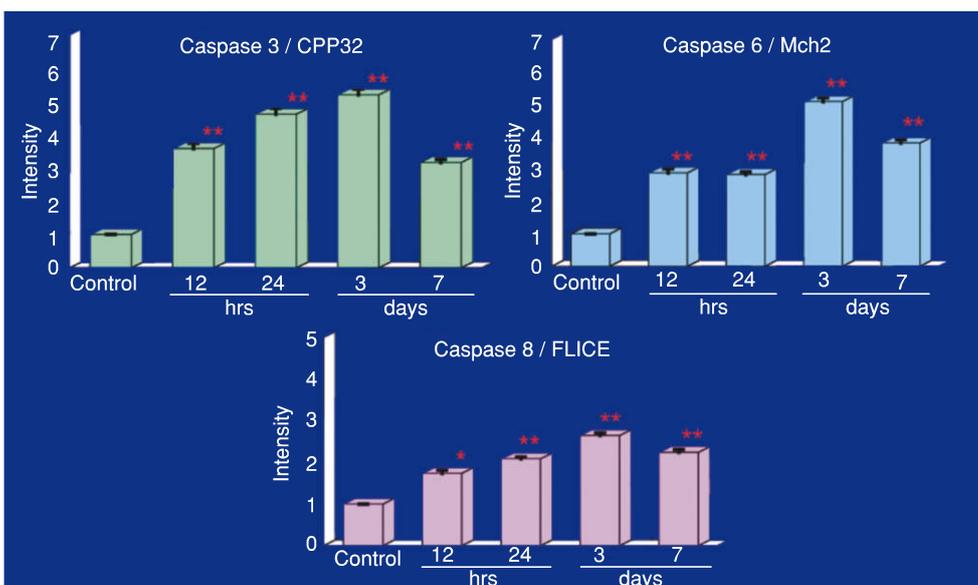


図 6 50 日齢雌 Sprague-Dawley ラットに 75 mg/kg MNU を単回腹腔内投与後の網膜におけるカスパーゼ 3, 6 および 8 活性の経時的変化。
無処置対照網膜に対していずれも 3 日でピークを呈する活性増強をみる.
*: p<0.05, **: p<0.01. Colorimetric protease assay(文献 21 より改変, 引用)

辺および後極部網膜を組織学的に評価し, 視細胞比率ならびに網膜障害率を形態計測により算出した³⁵⁾. ちなみに, 視細胞比率とは視細胞厚の総網膜厚に対する比率で, 網膜障害率とは視細胞が障害され 4 層以下になっている網膜長の総網膜長に対する比率をいう. 組織学的に, MNU 投与ラットの周辺部網膜では Ac-DEVD-CHO 投与群では対照群と比肩し得るほど視細胞が有意に残

存していたが, 後極部網膜では対照群と比して, 視細胞の減少をみた. しかし, 視細胞比率で見ると, 周辺部および後極部網膜ともに, Ac-DEVD-CHO 投与により視細胞の変性・消失の抑制を非投与の場合に比して有意に認める(図 7). また, 網膜障害率で見ても, Ac-DEVD-CHO 投与により障害域は有意に減少した(図 8). Ac-DEVD-CHO による網膜障害抑制効果は, MNU 投与

表 1 各種属の動物に網膜変性を誘発するに要するメチルニトロソ尿素(MNU)の用量ならびにその組織学的特徴.

Species	Age	Dose & Route	Site of origin	Fate of RPE cells
Mouse	7 weeks	60 mg/kg, ip	Posterior pole	No migration
Rat	50 days	60-75 mg/kg, ip	Posterior pole	Intraretinal migration without contact with blood vessels
Hamster	50 days	90 mg/kg, ip	Posterior pole	Contact with intraretinal blood vessels
Shrew	7 weeks	65 mg/kg, ip	Posterior pole	No migration
Monkey	Yong adult	40 mg/kg, iv	Equatorial zone	No migration

RPE cells: 網膜色素上皮細胞, ip: 腹腔内投与, iv: 静脈内投与.

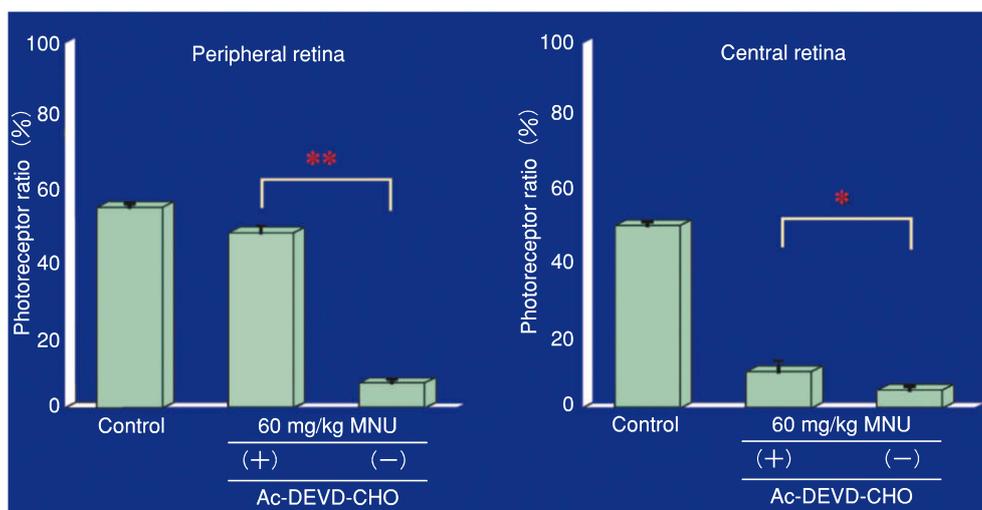


図 7 50 日齢雌 Sprague-Dawley ラットに 60 mg/kg MNU を単回腹腔内投与後にカスパーゼ 3 阻害剤 (Ac-DEVD-CHO) の硝子体内投与を行い, 7 日後の網膜厚の形態計測解析.

視細胞比率 (photoreceptor ratio) [総網膜厚に対する視細胞厚 (外顆粒層 + 杆体/錐体層) の割合] で表示した. カスパーゼ 3 阻害剤投与により MNU による視細胞の変性・消失が抑制されている.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (文献 35 より改変, 引用)

24 時間の視細胞アポトーシスの抑制に起因する³⁵⁾.

rd 遺伝子を保有する C3H マウスは生後 20 日という経過でカスパーゼファミリーが関与する視細胞アポトーシスに起因する網膜変性症を自然発症する^{36)~41)}. rd マウスに対し, 生後 8 日から 2 mg/kg の Ac-DEVD-CHO を隔日に腹腔内投与し, 生後 13 日および 17 日に周辺部および後極部網膜の視細胞比率, ならびに視細胞の TUNEL 陽性率や増殖率 (PCNA 標識率) を評価した⁴²⁾. 組織学的には, 生後 13 日の後極部網膜でカスパーゼ 3 阻害剤投与群では対照群に比して視細胞が有意に残存し, TUNEL 陽性率はカスパーゼ 3 阻害剤投与群では有意に減少し, 視細胞アポトーシスの抑制が示唆されたが, 生後 17 日では網膜障害の程度は対照群と同程度であった⁴²⁾. なお, 増殖率に差違はみなかった. Ac-DEVD-CHO は MNU 誘発モデルと同様に, rd マウスの網膜病変に対しても, 一過性ではあるが病態抑制効果を発揮する.

2. ニコチン酸アミド (NAM) による病態抑制

ビタミン B₃ 複合体である NAM は, DNA 修復酵素である poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の阻害剤として働く, PARP の基質として PARP の枯渇を抑えて DNA 修復を促す, 血流増加作用を呈する, ヒストンデアセチラーゼ阻害作用をみる, など多彩な薬理作用を有するが, 神経毒性物質や神経障害モデルに対して神経保護作用が示されている^{43)~50)}. ラットに 60 mg/kg MNU を単回腹腔内投与し, 直後に 1,000, 25, 10 mg/kg NAM を皮下投与し, MNU 投与 7 日後の網膜を評価した⁵¹⁾. 1,000 mg/kg あるいは 25 mg/kg NAM 投与では, 周辺部, 後極部を含めた網膜全域で視細胞の変性はみられず, 網膜の完全な形態保持が観察され, 病変の初発する後極部における視細胞比率をみると, 1,000 mg/kg あるいは 25 mg/kg NAM では変性の完全な抑制, 10 mg/kg NAM でも不完全ながら変性の抑制をみた (図 9). また, MNU 暴露 4, 6, 12 時間後に 1,000 mg/kg NAM を投与すると, 4 時間後の NAM 投与で

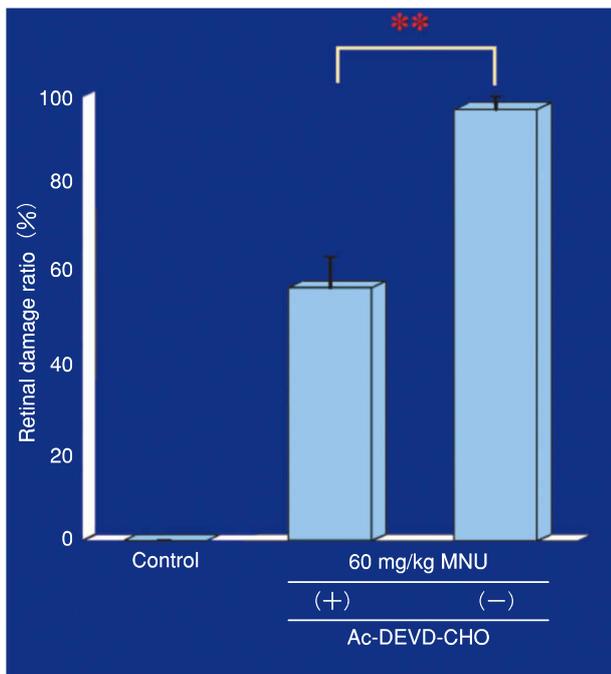


図 8 50 日齢雌 Sprague-Dawley ラットに 60 mg/kg MNU を単回腹腔内投与後 Ac-DEVD-CHO の硝子体内投与を行い、7 日後の網膜障害率解析。

網膜障害率 (retinal damage ratio) (外顆粒層が 4 層未満の場合を障害領域として全網膜長に対する割合) で表示した。カスパーゼ 3 阻害剤投与により MNU による網膜障害率が減少している。

** : $p < 0.01$ (文献 35 より改変, 引用)

は網膜変性を完全に抑制し、6 時間後でも不完全ながら抑制効果を発揮したが、12 時間後では抑制はみなかった (図 10)。MNU による視細胞の DNA 付加体形成は、NAM を投与した場合でも投与しない場合と同等に観察されることから⁵¹⁾、NAM は MNU により障害を受けた視細胞の DNA 修復に関与しているものと考えられる。なお、網膜電図 (ERG) でも MNU に 1,000 mg/kg NAM を同時併用したラットでは、MNU 非投与の動物とほぼ同じ波形をみることで、NAM は機能的にも病態抑制効果をもつ⁵²⁾⁵³⁾。NAM あるいはその誘導体が PARP 阻害剤として、1 型糖尿病、乾癬あるいは抗癌剤として臨床開発が進んできた経緯があるものの⁴⁹⁾⁵⁴⁾⁵⁵⁾、未だ眼科領域での適用の検討は進んでいない。

3. ドコサヘキサエン酸 (DHA) による病態抑制

DHA は視細胞に豊富に存在し、視細胞の成長や分化に必須である^{56)~59)}。RP 患者や rd マウスでは血清ならびに網膜での DHA 濃度の減少が報告⁶⁰⁾⁶¹⁾されている。ラットに 50 mg/kg MNU (1 週間でラットに網膜変性の完了する 60 mg/kg より少量) を単回腹腔内投与した後、リノール酸 (LA)、パルミチン酸 (PA)、エイコサペンタエン (EPA)、DHA や、EPA と DHA を等量混合した各種脂肪酸に、必須脂肪酸である LA を 0.5% 加え、脂肪酸総量を 10% として、AIN-76 A に添加し、混餌投

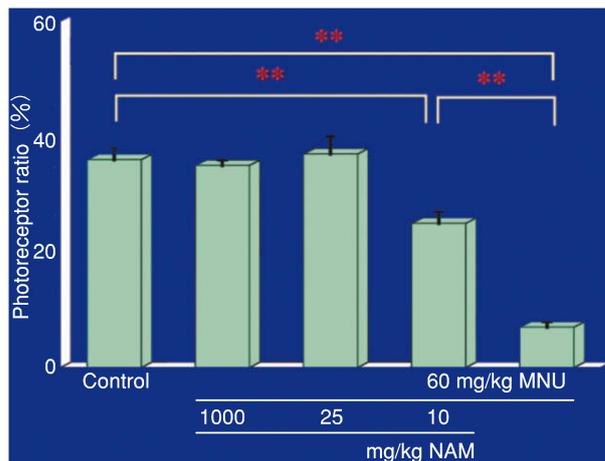


図 9 50 日齢雌 Sprague-Dawley ラットに 60 mg/kg MNU を単回腹腔内投与直後に 1000、25 および 10 mg/kg ニコチン酸アミド (NAM) を皮下投与し、7 日後の後極部における網膜厚の形態計測解析。

視細胞比率 (photoreceptor ratio) [総網膜厚に対する視細胞厚 (外顆粒層 + 杆体 / 錐体層) の割合] で表示。25 mg/kg 以上の NAM を MNU と同時に投与すると視細胞の変性が完全に抑制される。

** : $p < 0.01$ (文献 51 より改変, 引用)

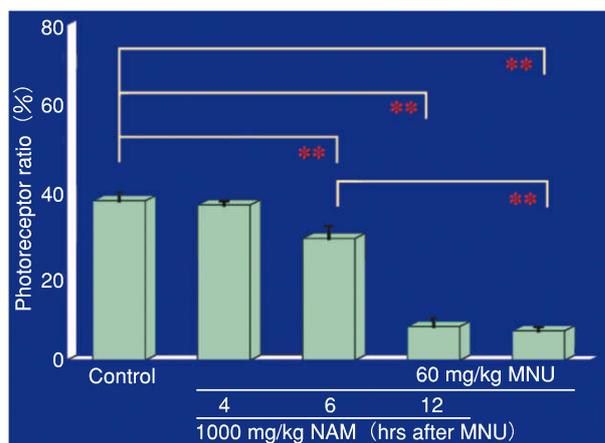


図 10 50 日齢雌 Sprague-Dawley ラットに 60 mg/kg MNU を単回腹腔内投与後 4、6、12 時間後に 1,000 mg/kg NAM を皮下投与し、7 日後の後極部における網膜厚の形態計測解析。

視細胞比率 (photoreceptor ratio) [総網膜厚に対する視細胞厚 (外顆粒層 + 杆体 / 錐体層) の割合] で表示。NAM を MNU 投与 6 時間後に投与した場合でも MNU 単独群に比べ視細胞厚が保たれている。

** : $p < 0.01$ (文献 51 より改変, 引用)

与して長期観察した。実験経過中 MNU により誘発された乳癌が 1 cm 径に達した動物は屠殺し、給餌後 20 週で実験を終了した。網膜障害率で各群を評価したところ⁶²⁾、LA 群では他の群に比して障害が高度であったのに対し、DHA 群では MNU による網膜障害を完全に抑制した (図 11)。なお、EPA と DHA の等量混合 (4.75% DHA 含有) 群では障害をみることで、網膜障害の

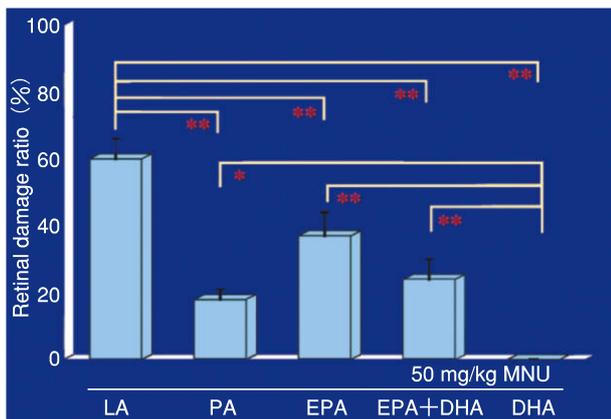


図 11 50日齢雌 Sprague-Dawley ラットに 50 mg/kg MNU を単回腹腔内投与し、網膜障害率(retinal damage ratio) [外顆粒層が 4 層未満の場合を障害領域として全網膜長に対する割合] よりみた各種 10% 脂肪酸含有 AIN-76 A 食投与による影響。

LA(リノレン酸): 10% LA, PA(パルミチン酸): 9.5% PA+0.5% LA, EPA(エイコサペンタエン酸): 9.5% EPA+0.5% LA, EPA+DHA(ドコサヘキサエン酸): 4.75% EPA+4.75% DHA+0.5% LA, DHA: 9.5% DHA+0.5% LA). DHA 群では MNU 誘発網膜症の発症を完全に抑制しており、LA 群では MNU 誘発網膜症の増悪をみる。

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (文献 62 より改変, 引用)

完全抑制には DHA 含量として 9.5% を要する。脂肪酸の種類により、網膜症発症への影響は大きく異なる。

ラットに 9.5% DHA 含有 AIN-76 A (DHA) 食あるいは基礎(basal)食として AIN-76 A を 2 週間摂取させた後、MNU を 60 mg/kg に増量して単回腹腔内投与し、食餌を継続あるいは互いに変更して、MNU 投与 3 日および 7 日の短期観察を行った⁶³。網膜障害率で評価すると、MNU 投与 3 日での網膜変性抑制効果は血中 DHA 組成と相関しており、DHA を継続投与したラットの網膜障害率は 7% であったが、MNU 投与 7 日では DHA を与えた各群の網膜障害率は 38~47% であり、DHA 非投与群の 88% に比して有意な抑制をみたが、DHA による網膜障害の完全抑制には至らなかった⁶³。DHA は視細胞の酸化的ストレスによるアポトーシスを Bax 発現抑制および Bcl-2 過剰発現を介して抑制する⁶⁴。MNU 誘発網膜変性症には Bcl-2 ファミリーが関与していることより^{20,21}、同様のメカニズムの関与が示唆される。DHA は内網膜障害の抑制に有効であることが実験的に示されており^{65~69}、MNU 誘発網膜変性に対する DHA の結果は、視細胞変性に対しても DHA の有効性を示している。最近、アメリカでの X 連鎖 RP 患者による 4 年間の 400 mg DHA/日投与における小規模臨床試験によると、12 歳未満の患者の ERG 杆体機能、12 歳以上の患者の ERG 錐体機能はプラセボ患者に比べて改善され、大規模臨床試験の必要性が示唆されてい

る⁷⁰。

IV おわりに

ヒト RP は、原因ならびに病態が単一でなく、対症療法的な薬物治療に終始している。また、RP は原因遺伝子が単一でないため、遺伝子治療も困難にしている。しかし、原因の如何に拘わらず、病像は何れも視細胞アポトーシスという共通の機構による。現在、網膜変性症モデルとして、様々な遺伝子改変動物(rd マウス, rds マウス, RCS ラット, P23H ラットなど)や、光あるいは化学物質誘発動物モデルが存在する^{71~74}が、我々が確立した MNU 誘発網膜変性症モデルは、視細胞アポトーシスを介して確実に短期間で病像が推移し、完成をみるため、ヒト RP のよいモデルと考える。我々はこのモデルを用いて、Ac-DEVD-CHO, NAM ならびに DHA により、病変制御が可能なることを明らかにしたが、ヒトへの適用には、さらなる動物モデルでの薬効評価および毒性評価(前臨床試験)が必要となるであろう。MNU 誘発網膜変性症モデルは、新規治療方策および治療薬の効果を簡便にしかも短期間に評価できる実験系であり、我々のみならず他のグループも病態解析や治療実験に用いている^{75~77}。今後、ヒト RP の治療法および治療薬開発のスクリーニング系として利用されることが期待される。

これらの研究は、関西医科大学眼科学講座所属の中嶋基麿、弓削堅志、南部裕之、埜本 慎、木内克治、森口佳映の諸兄姉とともに関西医科大学病理学第二講座において行われた研究成果である。有為の人材を派遣していただいた本学眼科学講座の宇山昌延名誉教授、松村美代教授に感謝したい。また、研究を絶えず支援して頂いた病理学第二講座の赤松孝子技師、吉田容子秘書ならびに藤沢薬品工業(株)安全性研究所の大石裕司博士、藤井登志之博士[現(株)環境バイロクス研究所]、英文校閲を頂いた米国 National Institute of Environmental Health Sciences(NIEHS)の Abraham Nyska 博士に謝意を表す。なお、本内容は Joint International Meeting of The Japanese Society of Toxicologic Pathology & The International Federation of Societies of Toxicologic Pathology 2004(Kobe, Japan)ならびに 24th Annual Meeting of the Society of Toxicologic Pathology(Salt Lake City, UT)で発表した。本研究は文部科学省科学研究費補助金(基盤研究(C)09671823, 11671763, 12671728, 13671756)の援助を受けた。

文 献

- 1) **Voaden MJ**: Retinitis pigmentosa and its models. *Prog Retin Eye Res* 10: 293-331, 1991.
- 2) **Berson EL**: Retinitis pigmentosa: The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 1659-1676, 1993.

- 3) **van Soest S, Westerveld A, de Jong PT, Bleeker-Wagemakers EM, Bergen, AAB** : Retinitis pigmentosa : Defined from a molecular point of view. *Surv Ophthalmol* 43 : 321—334, 1999.
- 4) **Yanoff M, Fine BS** : *Ocular Pathology*. 5th ed., Mosby, St Louis, 2002.
- 5) **Kalloniatis M, Fletcher EL** : Retinitis pigmentosa : Understanding the clinical presentation, mechanisms and treatment options. *Clin Exp Optom* 87 : 65—80, 2004.
- 6) **Flannery GG, Lewin AS, Drenser KA, Nishikawa S, Yasumura D, La Vail MM, et al** : Ribozyme-mediated gene therapy for autosomal dominant retinal degeneration. In : Hollyfield JG, et al (Eds) : *Retinal Degenerative Diseases and Experimental Therapy*. Kluwer Academic/Plenum, New York, 277—291, 1999.
- 7) **Tomita M, Adachi Y, Yamada H, Takahashi K, Kiuchi K, Oyaizu H, et al** : Bone-marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cell* 20 : 279—283, 2002.
- 8) **Lund RD, Ono SJ, Keegan DLJ, Lawrence JM** : Retinal transplantation : Progress and problems in clinical application. *J Leukoc Biol* 74 : 151—160, 2003.
- 9) **Delyfer MN, Leveillard T, Mohand-Said S, Hicks D, Picaud S, Sahel JA** : Inherited retinal degenerations : Therapeutic prospects. *Biol Cell* 96 : 261—269, 2004.
- 10) **IARC. International Agency for Research on Cancer** : IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Some Inorganic Substances, Chlorinated Hydrocarbons, Aromatic Amines, N-nitroso Compounds and Natural Products. Vol. 1. pp 184. Lyon, France, IARC, 1972.
- 11) **IARC. International Agency for Research on Cancer** : IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human. Some N-nitroso Compounds. Vol. 17. pp 365. Lyon, France, IARC, 1978.
- 12) **IARC. International Agency for Research on Cancer** : IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human. Overall Evaluations of Carcinogenicity. Supplement 7. pp 440. Lyon, France, IARC, 1987.
- 13) **National Toxicology Program Web site** : http://ntp-server.niehs.nih.gov/cgi/iH_Indexes/ALL_SRCH/iH_ALL_SRCH_Frames.html, 2004.
- 14) **Nakajima M, Yuge K, Senzaki H, Shikata N, Miki H, Uyama M, et al** : Photoreceptor apoptosis induced by a single systemic administration of N-methyl-N-nitrosourea in the rat retina. *Am J Pathol* 148 : 631—641, 1996.
- 15) **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.
- 16) **Yuge K, Nambu H, Senzaki H, Nakao I, Miki H, Uyama M, et al** : N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in the mouse retina. *In Vivo* 10 : 483—488, 1996.
- 17) **Nambu H, Yuge K, Nakajima M, Shikata N, Takahashi K, Miki H, et al** : Morphologic characteristics of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in C57BL mice. *Pathol Int* 47 : 377—383, 1997.
- 18) **Taomoto M, Nambu H, Senzaki H, Shikata N, Oishi Y, Fujii T, et al** : Retinal degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea in Syrian golden hamsters. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 236 : 688—695, 1998.
- 19) **Tsubura A, Yoshizawa K, Miki H, Oishi Y, Fujii T** : Phylogenetic and ontogenetic study of retinal lesions induced by N-methyl-N-nitrosourea in animals. *Anim Eye Res* 17 : 97—103, 1998 (Abstract in English, text in Japanese).
- 20) **Yoshizawa K, Nambu H, Yang J, Oishi Y, Hashimoto M, Ohara K, et al** : Mechanism of N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor cell apoptosis in SD rat : Regulation of Bcl-2 family and caspase family. *J Toxicol Sci* 24 : 367, 1999 (Proceedings of the 26th annual meeting).
- 21) **Yoshizawa K, Nambu H, Yang J, Oishi Y, Senzaki H, Shikata N, et al** : Mechanisms of photoreceptor cell apoptosis induced by N-methyl-N-nitrosourea in Sprague-Dawley rats. *Lab Invest* 79 : 1359—1367, 1999.
- 22) **Tsubura A, Yoshizawa K, Kiuchi K, Moriguchi K** : N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in animals. *Acta Histochem Cytochem* 36 : 263—270, 2003.
- 23) **Tsubura A, Yoshizawa K, Senzaki H, Shikata N** : Establishment of animal models for human retinitis pigmentosa and its disease control. *Microscopy* 38 : 42—45, 2003 (In Japanese).
- 24) **Nambu H, Yoshizawa K, Yang J, Yamamoto D, Tsubura A** : Age-specific and dose-dependent retinal dysplasia and degeneration induced by a single intraperitoneal administration of N-methyl-N-nitrosourea to rats. *J Toxicol Pathol* 11 : 127—131, 1998.
- 25) **Yoshizawa K, Oishi Y, Nambu H, Yamamoto D, Yang J, Senzaki H, et al** : Cataractogenesis in neonatal Sprague-Dawley rats by N-methyl-N-nitrosourea. *Toxicol Pathol* 28 : 555—564, 2000.
- 26) **Kiuchi K, Yoshizawa K, Moriguchi K, Airo T** : Rapid induction of cataract by a single intraperitoneal administration of N-methyl-N-nitrosourea in 15-day-old Sprague-Dawley (Jcl : SD) rats. *Exp Toxicol Pathol* 54 : 181—186, 2002.
- 27) **Tominaga Y, Tsuzuki T, Shiraishi A, Kawate H, Sekiguchi M** : Alkylation-induced apoptosis of

- embryonic stem cells in which the gene for DNA-repair, methyltransferase, had been disrupted by gene targeting. *Carcinogenesis* 18 : 889—896, 1997.
- 28) **Herrold KM** : Pigmentary degeneration of the retina induced by N-methyl-N-nitrosourea. An experimental study in syrian hamsters. *Arch Ophthalmol* 78 : 650—653, 1967.
 - 29) **Katai N, Kikuchi T, Shibuki H, Kuroiwa S, Arai J, Kurokawa T**, et al : Caspase-like proteases activated in apoptotic photoreceptors of Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1802—1807, 1999.
 - 30) **Lam TT, Abler AS, Kwong JMK, Tso MOM** : N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced apoptosis in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2391—2397, 1999.
 - 31) **Tezel G, Wax MB** : Inhibition of caspase activity in retinal cell apoptosis induced by various stimuli *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2660—2667, 1999.
 - 32) **Kermer P, Klocker N, Labes M, Bahr M** : Inhibition of CPP 32-like proteases rescues axotomized retinal ganglion cells from secondary cell death *in vivo*. *J Neurosci* 18 : 4656—4662, 1998.
 - 33) **Chaudhary P, Ahmed F, Quebada P, Sharma SC** : Caspase inhibitors block the retinal ganglion cell death following optic nerve transection. *Brain Res Mol Brain Res* 67 : 36—45, 1999.
 - 34) **Katai N, Yoshimura N** : Apoptotic retinal neuronal death by ischemia-reperfusion is executed by two distinct caspase family protease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2697—2705, 1999.
 - 35) **Yoshizawa K, Yang J, Senzaki H, Uemura Y, Kiyozuka Y, Shikata N**, et al : Caspase-3 inhibitor rescues N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in Sprague-Dawley rats. *Exp Eye Res* 71 : 629—635, 2000.
 - 36) **Sanyal S, De Ruiter A, Hawkins RK** : Development and degeneration of retina in rds mutant mice : Light microscopy. *J Comp Neurol* 194 : 193—207, 1980.
 - 37) **Chang GO, Hao Y, Wong F** : Apoptosis : Final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron* 11 : 595—605, 1993.
 - 38) **Lolley RN** : The rd gene defect triggers programmed rod cell death. The Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 4182—4191, 1994.
 - 39) **Nambu H, Yuge K, Shikata N, Tsubura A, Matsuzawa A** : Fas-independent apoptosis of photoreceptor cells in C3H mice. *Exp Anim* 45 : 309—315, 1996.
 - 40) **Kim DH, Kim JA, Joo CK** : Retinal degeneration in rd mouse is caused by apoptosis through activated caspase-9 pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : S 403, 2000.
 - 41) **Reichel MB, Paul D, Holborn M, Schlichtenbrede FC, Ali RR, Wiedemann P** : Caspases are overexpressed during photoreceptor cell apoptosis in the RD and RDS mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : S 403, 2000.
 - 42) **Yoshizawa K, Kiuchi K, Nambu H, Yang J, Senzaki H, Kiyozuka Y**, et al : Caspase-3 inhibitor transiently delays inherited retinal degeneration in C3H mice carrying the rd gene. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 240 : 214—219, 2002.
 - 43) **Huang TF, Chao CC** : The effect of nicotinamide on cerebral circulation. *Proc Soc Exp Biol Med* 105 : 551—553, 1960.
 - 44) **Render JA, Carlton WW** : Ocular lesions of 6-aminonicotinamide toxicosis in rabbits. *Vet Pathol* 22 : 72—77, 1985.
 - 45) **Klaidman LK, Mukherjee SK, Hutchin TP, Adams JD** : Nicotinamide as a precursor for NAD⁺ prevents apoptosis in the mouse brain induced by tertiary-butylhydroperoxide. *Neurosci Lett* 206 : 5—8, 1996.
 - 46) **Mukherjee SK, Adams JD** : The effects of aging and neurodegeneration on apoptosis-associated DNA fragmentation and the benefits of nicotinamide. *Mol Chem Neurobiol* 32 : 59—74, 1997.
 - 47) **Sakakibara Y, Mitha AP, Ayoub IA, Ogilvy CS, Maynard KI** : Delayed treatment with nicotinamide (vitamin B₃) reduces the infarct volume following focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats, diabetic and non-diabetic Fischer 344 rats. *Brain Res* 931 : 68—73, 2002.
 - 48) **Yang J, Klaidman LK, Chang ML, Kem S, Sugawara T, Chan P**, et al : Nicotinamide therapy protects against both necrosis and apoptosis in a stroke model. *Pharmacol Biochem Behav* 73 : 901—910, 2002.
 - 49) **Southan GJ, Szabo C** : Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Curr Med Chem* 10 : 321—340, 2003.
 - 50) **Ghosh S, Feany MB** : Comparison of pathways controlling toxicity in the eye and brain in *Drosophila* models of human neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 13 : 2011—2018, 2004.
 - 51) **Kiuchi K, Yoshizawa K, Shikata N, Matsumura M, Tsubura A** : Nicotinamide prevents N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor cell apoptosis in Sprague-Dawley rats and C57BL mice. *Exp Eye Res* 74 : 383—392, 2002.
 - 52) **Kiuchi K, Kondo M, Ueno S, Moriguchi K, Yoshizawa K, Matsumura M**, et al : Nicotinamide functionally rescues N-methyl-N-nitrosourea-induced retinopathy in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : S 117, 2003.
 - 53) **Kiuchi K, Kondo M, Ueno S, Moriguchi K, Yoshizawa K, Miyake Y**, et al : Functional rescue of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinopathy by nicotinamide in Sprague-Dawley rats. *Curr Eye Res* 26 : 355—362, 2003.

- 54) **Gale EAM** : Theory and practice of nicotinamide trials in pre-type I diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab* 9 : 375—379, 1996.
- 55) ID db 3 web site, The Investigational Drugs database ALERTS. (<http://iddb3.com/>)
- 56) **Birch DG, Birch EE, Hoffman DR, Uauy RD** : Retinal development in very-low-birth-weight infants fed diets differing in omega-3 fatty acids. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33 : 2365—2376, 1992.
- 57) **Rotstein NP, Aveldano MI, Barrantes FJ, Politi LE** : Docosahexaenoic acid is required for the survival of rat retinal photoreceptors *in vitro*. *J Neurochem* 66 : 1851—1859, 1996.
- 58) **Politi L, Rotstein N, Carri N** : Effects of docosahexaenoic acid on retinal development : Cellular and molecular aspects. *Lipids* 36 : 927—935, 2001.
- 59) **Innis SM** : Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Pediatr* 143 : S 1—S 8, 2003.
- 60) **Anderson RE, Maude MB, Lewis RA, Newsome DA, Fishman GA** : Abnormal plasma levels of polyunsaturated fatty acid in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Exp Eye Res* 44 : 155—159, 1987.
- 61) **Scott BL, Racz E, Lolley RN, Bazan NG** : Developing photoreceptors from normal and mutant rd mouse retinas : Altered fatty acid composition early in development of the mutant. *J Neurosci Res* 20 : 202—211, 1988.
- 62) **Moriguchi K, Yuri T, Yoshizawa K, Kiuchi K, Takada H, Inoue Y, et al** : Dietary docosahexaenoic acid protects against N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in rats. *Exp Eye Res* 77 : 167—173, 2003.
- 63) **Moriguchi K, Yoshizawa K, Shikata N, Yuri T, Takada H, Hada T, et al** : Suppression of N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in rats by docosahexaenoic acid. *Ophthalmic Res* 36 : 98—105, 2004.
- 64) **Rotstein NP, Politi LE, German OL, Girotti R** : Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 2252—2259, 2003.
- 65) **Reme CE, Malnoe A, Jung HH, Wie Q, Munz K** : Effect of dietary fish oil on acute light-induced photoreceptor damage in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 78—90, 1994.
- 66) **Lam TT** : The effect of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly-ADP-ribose polymerase, on ischemia/reperfusion damage in rat retina. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 95 : 241—252, 1997.
- 67) **Miyauchi O, Mizota A, Adachi-Usami E, Nishikawa M** : Protective effect of docosahexaenoic acid against retinal ischemic injury : An electroretinographic study. *Ophthalmic Res* 33 : 191—195, 2001.
- 68) **Mizota A, sato E, Taniai M, Adachi-Usami E, Nishikawa M** : Protective effects of dietary docosahexaenoic acid against kainite-induced retinal degeneration in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 216—221, 2001.
- 69) **Murayama K, Yoneya S, Miyauchi O, Adachi-Usami E, Nishikawa M** : Fish oil (polyunsaturated fatty acid) prevents ischemic-induced injury in the mammalian retina. *Exp Eye Res* 74 : 671—176, 2002.
- 70) **Hoffman DR, Locke KG, Wheaton DH, Fish GE, Spencer R, Birch DG** : A randomized, placebo-controlled clinical trial of docosahexaenoic acid supplementation for X-linked retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 137 : 704—718, 2004.
- 71) **Yang J, Yoshizawa K, Shikata N, Kiyozuka Y, Senzaki H, Tsubura A** : Retinal damage induced by cisplatin in neonatal rats and mice. *Curr Eye Res* 20 : 441—446, 2000.
- 72) **Ishida H, Yoshizawa K, Takahashi Y, Fujii T, Oishi Y, Hashimoto M, et al** : Mechanism of retinal degeneration induced by phosphodiesterase inhibitor in rats. *J Toxicol Sci* 25 : 317, 2000 (Proceedings of the 27th annual meeting).
- 73) **Kiuchi K, Yoshizawa K, Shikata N, Moriguchi K, Tsubura A** : Morphologic characteristics of retinal degeneration induced by sodium iodate in mice. *Curr Eye Res* 25 : 373—379, 2002.
- 74) **Chader GJ** : Animal models in research on retinal degenerations : Past progress and future hope. *Vision Res* 42 : 393—399, 2002.
- 75) **Wenzel A, Grimm C, Marti A, Kueng-Hitz N, Farhad H, Niemeyer G, et al** : c-fos controls the “private pathway” of light-induced apoptosis of retinal photoreceptors. *J Neurosci* 20 : 81—88, 2000.
- 76) **Grimm C, Wenzel A, Behrens A, Hafezi F, Wagner EF, Reme CE** : AP-1 mediated retinal photoreceptor apoptosis is independent of N-terminal phosphorylation of c-Jun. *Cell Death Differ* 8 : 859—867, 2001.
- 77) **Petrin D, Baker A, Coupland SG, Liston P, Narang M, Damji K, et al** : Structural and functional protection of photoreceptors from MNU-induced retinal degeneration by the X-linked inhibitors of apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 2757—2763, 2003.