



Changes in Gene Expression Profiling and Phenotype in Aged Multidrug Resistance Protein 4-Deficient Mouse Retinas

金, 景佑

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2023-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8602号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482350>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Changes in Gene Expression Profiling and Phenotype in Aged Multidrug Resistance Protein 4-Deficient Mouse Retinas

高齢 MRP4 欠損マウス網膜における遺伝子発現プロファイリングと表現型の変化

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

眼科学

(指導教員：中村 誠教授)

金 景佑

一般に、老化は様々な生理学的、病理学的プロセスを介して全ての臓器に影響を与えるが、酸化ストレスは臓器機能不全における主要な修飾因子で加齢に伴う様々な疾患に関連している。既報では、酸化ストレスは、細胞膜上の ATP 結合カセット (ABC) トランスポーターのサブセットの発現を調節することが示されている。多剤耐性タンパク質 4 (Multidrug Resistance Protein 4, MRP4) は、ABC トランスポーターの C サブファミリーに属し、排出ポンプとして機能することによって細胞環境を維持している。MRP4 欠損実験動物は、さまざまな種類のストレスに対して異常な反応を示すことから、老化と酸化ストレスの関係においても MRP4 が重要な役割を果たしている可能性がある。

近年、MRP4 は薬物の細胞外排出作用だけでなく、いくつかのシグナル伝達分子の恒常性にも寄与することが認識されるようになってきた。MRP4 阻害作用を持つ FDA 承認薬には、非ステロイド性抗炎症薬、脂質低下薬、抗血栓薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬など臨床で一般的に使用される薬剤が含まれており、全身疾患を有する高齢者の中にはこれらの薬剤に長期間曝露されている患者が存在する。

酸化ストレスの影響を受けやすい網膜は中枢神経系 (CNS) の一部であり、動物実験では MRP4 が網膜の血管内皮細胞で主に発現していることが確認されている。加齢に対する MRP4 欠乏の影響は未だによく理解されていないことから、我々は、MRP4 欠乏と CNS 老化の共効果についての見識を得るために、老化マウス網膜の遺伝子発現プロファイルと表現型の変化を調査し、これらのパラメーターを野生型 (WT) マウスと *Mrp4* 欠損マウスの間で比較した。

方法

1. マウス

C57BL / 6J の遺伝的背景を持つ *Mrp4* ノックアウトマウスが使用された。

2. 遺伝子発現マイクロアレイ

マウスの遺伝子型ごとに 4 つのサンプルを用意した (WT および *Mrp4*^{-/-})。網膜組織は、45 ～55 週齢の 3 匹のマウスから採取され、RNA 抽出と DNA マイクロアレイおよび KEGG pathway 解析を行った。次に、発現変動遺伝子群の生物学的な特徴を調べるために遺伝子オントロジー (Gene Ontology) 解析を追加した。

3. 免疫組織化学および H&E 染色

網膜フラットマウントの免疫染色、網膜切片の免疫染色、網膜切片の H&E 染色を行った。定量的解析には Image J ソフトウェアを使用した。各網膜層の厚さは、H&E 網膜切片の視神経乳頭から 100 μm の網膜層を手動で測定することによって定量化した。

4. 網膜電図記録

すべての実験動物 (マウス) は網膜電図 (electroretinogram, ERG) 記録の前に一晩暗順応され、すべての手技は薄暗い赤色光の下で実行された。マウスに麻酔をかけ、体温を 37° C に維持する内蔵の加熱パッド上に静置した。2.5% フェニレフリンと 1.0% トロピカミド点眼

薬を使用して瞳孔を散大させた後、金線を埋め込んだコンタクトレンズ電極を感電極として角膜に配置した。ERG は、Ganzfeld ドーム を備えた市販の機器を使用して記録された。暗所視閾値応答 (scotopic threshold response, STR) (網膜内層の機能を反映する) の記録には、-6.1、-5.5、-5.1、-4.6、および-4.1 log sc td の連続的に増加する発光強度を使用した。1.5 log sc td の背景光強度で 5 分間の光順応間隔の後、明所視閾値応答の記録を行った。

結果

① 高齢 *Mrp4* 欠損マウスの網膜における遺伝子発現プロファイルの変化

高齢 *Mrp4* 欠損マウス網膜に関する包括的なトランск립トーム情報を調べるために、DNA マイクロアレイ解析を行った。WT マウスとの比較で 186 個の発現変動遺伝子が高齢（約 50 週齢）*Mrp4* 欠損マウス網膜において同定された。Gene Ontology 解析では、生物学的プロセス、分子機能および細胞成分のいずれにおいても有意な変化があり、lens development in the camera-type eye, intrinsic component of autophagosome membrane, structural constituent of eye lens を含む Gene Ontology term が抽出された。その後の KEGG pathway 解析では発現変動遺伝子が主に「代謝経路」、「グリセロリン脂質代謝」、「単純ヘルペスウイルス 1 型感染」、「カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス感染」に関与していることが明らかになった。

② 網膜厚の変化

高齢 *Mrp4* 欠損マウスの網膜で発現変動遺伝子が認められたため、網膜構造との関連の有無につき網膜層（神経線維層/神経節細胞層複合体、内網状層、内顆粒層、外網状層、外顆粒層、視細胞層）の厚さの変化を評価した。若年（8～12 週）WT マウス、高齢（45～55 週）WT マウス、若年 *Mrp4* 欠損マウス、高齢 *Mrp4* 欠損マウスの網膜層の厚さに有意な変化は認められなかった。

③ 各網膜細胞タイプの形態と分布

網膜層厚に有意な差が認められなかったことから、老化と MRP4 欠乏が網膜に及ぼす変化を細胞レベルで調べるために、各網膜細胞種の形態と分布を確認した。網膜切片を用いた免疫組織染色では、血管内皮細胞、アストロサイト、ミュラー細胞、水平細胞およびアマクリン細胞、双極細胞、視細胞光受容体について若年/高齢 WT マウスおよび若年/高齢 *Mrp4* 欠損マウスの間で細胞の形態および分布に明らかな変化はなかった。次に、網膜フラットマウントでの免疫染色による網膜血管およびアストロサイトの二次元的評価を行ったが、網膜血管およびアストロサイトに関して、若年/老齢 WT マウスおよび若年/老齢 *Mrp4* 欠損マウス間で明らかな変化は認めなかった。（一部の層では、血管面積、総血管長、またはその両方にわずかながら統計学的に有意な差を認めた。）

④ 網膜の電気生理学的機能

高齢 *Mrp4* 欠損マウスの網膜が WT マウスと比較して同様の網膜機能を有するかを調べるために、電気生理学的解析を実施した。高齢 *Mrp4* 欠損マウスに対して行われた ERG 検査は、a 波と b 波の振幅と潜時、および陽性 STR の振幅に関して、高齢 WT マウスと有意差を認めなかつた。

考察

本研究では包括的なトランск립トーム解析を実行し、高齢 *Mrp4* 欠損マウスで発現が変動する 186 遺伝子を同定した。これらの遺伝子は血液網膜関門（blood retinal barrier, BRB）の機能障害に影響している可能性がある。その理由として MRP4 が網膜の血管内皮細胞で主に発現していること、内皮細胞は BRB の主要な構成要素であること、MRP4 は経細胞輸送を制限していることなどが挙げられる。Gene Ontology 解析でこれらの遺伝子の中に生物学的プロセスとして水晶体、眼の発生と視覚に関連する遺伝子が含まれていた。網膜と水晶体はまったく異なる組織タイプであるにも関わらず、レンズ関連の Gene Ontologyにおいて豊富に発現していることは驚くべきことである。分子機能または細胞成分の Gene Ontology 解析では構造分子活性、液胞膜の固有成分、シナプス小胞膜の成分など、CNS における MRP4 の細胞バリア機能と関連している可能性が示された。高齢マウス網膜が MRP4 欠乏によって影響を受けるシグナル伝達経路には、「代謝経路」、「グリセロリン脂質代謝」、「単純ヘルペスウイルス 1 感染」、および「カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス感染」が含まれた。最初の 2 つの経路と MRP4 との関係は不明だが、抗ウイルス薬は MRP4 の基質であることから、この 2 つの経路は排出型トランスポーターとしての MRP4 機能に関連している可能性がある。

次に、網膜における老化と *Mrp4* 欠損の影響を調べた。特定の網膜層の厚さの変化は、網膜変性の良いマーカーであることから、若年/高齢 WT マウスと若年/高齢 *Mrp4* 欠損マウスの網膜層の厚さを測定し比較を行ったところ、各網膜層の厚さには有意な差は認められなかつた。さらに、免疫組織染色では、4 つの年齢/遺伝子型マウスグループ間で、細胞の形態または分布に明らかな変化が確認できなかつた。一方、網膜の中間層または深層で観察された血管表現型の違いは、*Mrp4* 欠乏、加齢、またはその両方に起因する可能性がある。なぜなら我々は以前に、新生仔マウスにおいてフォルスコリン投与後に *Mrp4* 欠乏マウスで網膜血管表現型が変化することを報告しているからである。電気生理学的解析においても高齢 WT マウスと高齢 *Mrp4* 欠損マウスの間に潜時、振幅ともに有意な ERG 応答の差がなかつたことは今回の組織学的解析の結果を裏付けている。以上の実験結果から、*Mrp4* 欠損マウス網膜に損傷を与えるには、加齢はストレスとして不十分であると考えられる。

高齢 *Mrp4* 欠損 マウスが網膜において多くの発現変動遺伝子を有するにもかかわらず明らかな網膜表現型を示さない理由を説明することは難しいが、我々は以下のとおり推察している。(1) マウスは適切に管理され特定の病原体のない条件下で飼育されていたため、蓄積された内因性および外因性のストレスは網膜障害を引き起こす閾値を下回っていた。(2) 網膜で

発現する他の排出型トランスポーターファミリータンパク質が、MRP4 の欠如を補填した。(3) MRP4 機能の損失の多面的効果は、網膜機能不全を引き起こす分子経路をキャンセルした。

本研究から、*Mrp4* 欠損マウスの網膜にいくらかの損傷を引き起こすストレスとして加齢のみでは不十分であることが判明した。今後は、MRP4 欠乏と他のタイプのストレス（高血糖や炎症）との共効果を調べるためのさらなる研究が必要であると考える。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3267号	氏名	金 景佑
論文題目 Title of Dissertation	<p>高齢 MRP4 欠損マウス網膜における遺伝子発現プロファイリングと表現型の変化</p> <p>Changes in Gene Expression Profiling and Phenotype in Aged Multidrug Resistance Protein 4-Deficient Mouse Retinas</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 久田 亮 Chief Examiner</p> <p>副査 小川 茂 Vice-examiner</p> <p>副査 松本 理器 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【緒言】老化は様々な生理学的、病理学的プロセスを介して全ての臓器に影響を与え、また酸化ストレスは臓器機能不全における主要な修飾因子であり、加齢に伴う様々な疾患に関連している。多剤耐性タンパク質 4 (Multidrug Resistance Protein 4, MRP4) は、ABC トランスポーターの C サブファミリーに属し、排出ポンプとして機能することによって細胞環境を維持している。MRP4 欠損実験動物は、さまざまな種類のストレスに対して異常な反応を示すことから、老化と酸化ストレスとの関係においても MRP4 が重要な役割を果たしている可能性がある。

【方法・結果】本研究では、MRP4 欠乏と CNS 老化の共効果を調査するために、老化マウス網膜の遺伝子発現プロファイルと表現型の変化を調査し、これらのパラメーターを野生型 (WT) マウスと *Mrp4* 欠損マウスの間で比較した。

DNA マイクロアレイ解析では、WT マウスとの比較で 186 個の発現変動遺伝子が高齢 *Mrp4* 欠損マウス網膜において同定された。Gene Ontology 解析では、生物学的プロセス、分子機能および細胞成分のいずれにおいても有意な変化があり、lens development in the camera-type eye, intrinsic component of autophagosome membrane, structural constituent of eye lens を含む Gene Ontology term が抽出された。その後の KEGG pathway 解析では発現変動遺伝子が主に「代謝経路」、「グリセロリン脂質代謝」、「単純ヘルペスウイルス 1 型感染」、「カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス感染」に関与していることが明らかになった。

次に各網膜層の厚さの変化を評価した。若年（8～12 週）WT マウス、高齢（45～55 週）WT マウス、若年 *Mrp4* 欠損マウス、高齢 *Mrp4* 欠損マウス間で比較したが、網膜層の厚さに有意な変化は認められなかった。続いて網膜における各細胞層の形態と分布を確認するために、網膜切片を用いた免疫組織染色で評価したが、血管内皮細胞、アストロサイト、ミュラー細胞、水平細胞およびアマクリン細胞、双極細胞、視細胞光受容体について若年/高齢 WT マウスおよび若年/高齢 *Mrp4* 欠損マウスの間で細胞の形態および分布に明らかな変化はなかった。網膜フラットマウントでの免疫染色による網膜血管およびアストロサイトの二次元的評価においても、若年/高齢 WT マウスおよび若年/高齢 *Mrp4* 欠損マウス間で明らかな変化は認められなかった。

さらに、高齢 *Mrp4* 欠損マウスの網膜が WT マウスと比較して同様の網膜機能を有するかを調べるために電気生理学的解析を実施した。高齢 *Mrp4* 欠損マウスで記録された網膜電図は、a 波と b 波の振幅と潜時および陽性暗所閾値電位の振幅に関して高齢 WT マウスとの比較で有意差を認めなかった。

【考察】本研究では、高齢 *Mrp4* 欠損 マウスが網膜において多くの発現変動遺伝子を有するものの網膜表現型に明らかな差は認められなかった。その理由として (1) マウスは適切に管理され特定の病原体のない条件下で飼育されていたため、蓄積された内因性および外因性のストレスは網膜障害を引き起こす閾値を下回っていた。(2) 網膜で発現する他の排出型トランスポーターファミリータンパク質が、MRP4 の欠如を補填した。(3) MRP4 機能の損失の多面的効果は、網膜機能不全を引き起こす分子経路をキャンセルしたなどが考えられる。本研究から、*Mrp4* 欠損マウスの網膜にいくらかの障害を引き起こすストレスとして加齢のみでは不十分であることが判明した。今後は、MRP4 欠乏と他のタイプのストレス（高血糖や炎症）との共効果を調べるためのさらなる研究が必要であると考える。

本研究で、*Mrp4* 欠損マウス網膜において、加齢により 186 個の発現変動遺伝子を同定し、これらが代謝経路やウイルス感染などに関与するものであることがわかった。病原体がなく、またストレス変動の少ない動物施設の環境下では、網膜の機能・形態異常を描出するには至らなかったが、今後の MRP4 の生理学的、病理学的探索研究の基盤となる堅固な実験結果であり、価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。