

2-Phenyl-APB-144 を用いたラット網膜色素上皮変性メカニズムに
関する研究

平井 慎一郎
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 動物細胞工学講座
(河野 憲二 教授)

平成 27 年 8 月 18 日提出

所属 (指導教員)	動物細胞工学講座 (河野憲二)		
氏名	平井 慎一郎	提出	平成 27 年 8 月 9 日
題目	2-Phenyl-APB-144 を用いたラット網膜色素上皮変性メカニズムに関する研究		
<p>要旨</p> <p>加齢黄斑変性 (Age-related macular degeneration : AMD) は網膜色素上皮 (Retinal pigment epithelium : RPE) の変性を特徴とする不可逆性視力喪失の大きな原因の一つである。RPE 細胞死の原因の一つとしてリボフスチンによる当該細胞のライソゾーム機能阻害が考えられており、同時にこれらライソゾームにおけるオートファジー消化プロセスも関与する。従って、加齢ないしは加齢に伴う疾病においてオートファジーがどのように関与するかを探索することは、AMD の病態を理解するうえで非常に大切であると考えられ、同時に網膜変性プロセスを阻害したり病態進行を予防する上での薬剤ターゲットの探索にも貢献しうると考えられる。</p> <p>2-Phenyl-APB-144 (APB) はラットにおいて特異的に RPE に障害を与え、網膜変性を引き起こす化学物質であり、医薬品では例えば抗マラリア薬として知られるクロロキンが RPE のライソゾーム酵素阻害活性を有することが報告されている。ライソゾームはカテプシンをはじめとする様々な酸性加水分解酵素を含み、不要となった細胞内小器官などを分解する役割を有することが知られていると共に、オートファジーに至る過程においてオートファゴソームと融合しオートライソゾームを形成することによって様々な細胞内物質を消化する。オートファジー機能不全はライソゾーム膜の v-ATPase 阻害剤である Bafilomycin や、細胞を飢餓状態に保つことで引き起こされ、その過程においては eIF2α キナーゼと Activating transcriptional factor 4 (ATF4) 経路がはたらき、LC3 といったオートファジーマーカー蓄積などの現象が認められる。これらの現象は表現形として神経変性を示す Atg-7 のノックアウトマウスや lysosome-associated membrane protein (LAMP)-2 のノックアウトマウスにおいて認められていることから、中枢神経システムの恒常性維持においてオートファジー機構は極めて重要と考えられている。</p> <p>しかしながら我々の知る限り、網膜 RPE において APB が与える影響をライソゾーム・オートファジーとそれに関連する分子メカニズムの観点で明らかとした報告は見受けられない。また、APB をラットに経口投与した際の全身への影響や、RPE 障害の特異性に関しても不明である。本研究では未だ不明な点の多いヒト RPE 変性の病態を探索するための APB 誘発網膜変性モデルの有用性に関して明らかとすることを試みた。</p> <p>その結果、ヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19) に対して APB は時間及び濃度依存的な細胞</p>			

障害性を示し、細胞内 pH を上昇させた。APB および Bafilomycin はライソゾーム含有酵素のプロカテプシンをカテプシンへ転換することを阻害した。このように、APB はライソゾーム活性を阻害することで細胞障害性を発揮することが示された。次に、ARPE-19 を飢餓条件培養ないしは APB 処理した際にオートファジーマーカーである LC3-II の増加することが明らかとなり、APB は飢餓条件下と同様にライソゾーム機能阻害に追隨してオートファジー経路を阻害することが示された。また、この際には飢餓条件下で活性化される転写因子 ATF4 の翻訳活性が上昇することも明らかとなった。以上から、APB はライソゾーム機能を阻害することによりオートファジー経路不全を引き起こし、細胞を飢餓条件へと導き細胞障害性を発揮することが本研究にて初めて明らかとなった。次に各種化合物の APB 誘発細胞死に対する影響を探索したところ、eIF2 α 脱リン酸化阻害剤が有効であり、RPE オートファジー不全に対する薬理的アプローチの可能性が示された。

次にラットにおいて APB 経口投与後の RPE に対する毒性発現の活性本体を探索すると共に、血液学・血液生化学的検査から APB の毒性学的プロファイルを明らかとすることを試みた。その結果、40 mg/kg 以下の用量において APB は毒性学的に有意な変化を誘発せず、生物学的利用率は 88.3% であることが明らかとなった。以上から、APB は未変化体が毒性発現本体であると共に、クロロキン類似の弱塩基性の物理化学的性質が RPE 障害誘発の原因である可能性が示唆された。これは In vitro において APB を用いて得られた知見を In vivo における実験結果考察に用いる妥当性を示すものと考えられた。

最後に APB 誘発ラット網膜変性に対する eIF2 α 脱リン酸化阻害剤の作用を検討した。その結果、APB によって引き起こされた網膜電位減弱および網膜血管関門透過性の破綻は eIF2 α 脱リン酸化阻害剤により保護されることが明らかとなった。

以上のように本研究は APB による RPE のオートファジー不全と飢餓状態の誘発による ATF4 翻訳活性の上昇などの分子メカニズムを初めて明らかとすることができた。加えて、これらの障害に対する eIF2 α 脱リン酸化阻害の可能性を In vitro および In vivo 双方において示すことができた。AMD の RPE 病理におけるオートファジー機能不全メカニズムには諸説が唱えられ安定的な見解には至っていない。しかしながら、本研究結果はこのようなオートファジー関連病理を RPE 細胞株並びにラットにおいて再現し得ることを初めて示すことができ、今後の有効な AMD および RPE 機能障害を伴う網膜症に対する治療薬の探索に活用されることが期待される。

目次

序論.....	6
略語.....	9
材料と方法.....	10
薬剤および化合物	10
実験動物.....	10
培養細胞.....	10
細胞毒性評価	10
細胞質 pH 解析	10
イムノブロッティング.....	11
免疫細胞化学	11
レポーター遺伝子アッセイ	12
定量的 RT-PCR	13
血液学および血液生化学検査.....	13
薬物動態学的解析	13
Salubrial の薬理学的効果.....	14
統計解析.....	15
結果.....	17
APB 誘発 ARPE-19 細胞死における細胞内小器官 pH 変化並びにカテプシン活性阻害に 関して	17
ARPE-19 細胞における APB のオートファジー並びにオートファジーマーカー蓄積に与 える影響.....	17
APB が ATF4 翻訳活性に及ぼす影響	18
eIF2 α 脱リン酸化阻害が APB 誘発細胞死に与える影響.....	18
APB 経口投与がラット血液学・血液生化学的パラメータに及ぼす影響.....	19
APB 経口投与時の血中動態	19

APB 誘発ラット網膜症に対する eIF2 α 脱リン酸化阻害剤の効果	20
考察	21
図表	26
謝辞	56
参考文献	57

序論

加齢黄斑変性 (Age-related macular degeneration : AMD) は光および映像に対して非常に鋭敏な網膜の黄斑 (Macula) と呼ばれる領域内の網膜色素上皮 (Retinal pigment epithelium : RPE) の変性を特徴とする不可逆性視力喪失の大きな原因の一つである (Wang et al., 2009)。全世界では約 1 億 2000 万人が罹患する本疾患に対して、各研究機関が精力的に研究開発活動を行っているものの未だ有効な治療薬は存在せず、新薬の登場が切に望まれている。AMD にはドライ型およびウェット型と呼ばれる 2 種類の病型があり、ドライ型が全体の約 90% を占めると考えられている。ドライ型は RPE が障害され細胞死を起こし、さらにそれに続いて近接する視細胞が細胞死することによって視覚の喪失を引き起こすが、その病態進行は比較的緩慢で数年から数十年を要する。このような細胞死を伴った網膜の眼底は地図状に萎縮したように見えることから萎縮型黄斑変性とも呼ばれる。ウェット型は病態の進行が急激であり網膜下の脈絡膜より新生血管が滲出することにより黄斑部分の網膜が損傷することで引き起こされる。本ウェット型に対しては Ranibizumab と呼ばれる抗 VEGF (Vascular endothelial growth factor : 血管内皮細胞成長因子) 抗体の眼球硝子体内注射が治療法として存在し、急激な視力喪失を防ぐ有効な手段であるものの、あくまでも一時的な病態進行抑制のために視力喪失を回避することはできず、根本治療とはなり得ていない。

特にドライ型 AMD における RPE の機能低下は、リポフスチンと呼ばれる酸化した視細胞外節によって引き起こされると考えられている (Algvere and Seregard, 2002) (Fig.1)。RPE は主に 2 つの機能を有すると考えられており (Strauss, 2005)、第一に近接する視細胞から脱落した外節や眼内で発生した老廃物などを取り込み消化することによって自身のエネルギーとして再利用すると共に脈絡膜血管への排泄を行う。第二に、光が電気信号へと生物学的に変換される仕組み (視覚サイクル) において感光タンパク質であるロドプシンが光子によって 11-cis-レチナールから All-trans-レチナールへと変換されたものを再度ロドプシンへと再合成する際に視細胞を補佐する機能を有する。このようなプロセスが阻害されることは眼の恒常性維持に大きな影響を与える (Fig.2)。

ドライ型 AMD における RPE 細胞死はリポフスチンが当該細胞に豊富に含まれるライソゾームの機能 (Bergmann et al., 2004; Krohne et al., 2010) および抗酸化能を阻害 (Algvere and Seregard, 2002) することによって引き起こされる。このような病態形成過程において、RPE 内のライソゾームにおけるオートファジー消化プロセスの関与することが提唱されている。 (Kaarniranta, 2013; Mitter et al., 2012)。オートファジーは細胞内の分子がライソゾームに運ばれ消化・再利用されるシステムであり、細胞内の異常な蛋白質の蓄積や栄養飢餓時に蛋白質のリサイクルを行うことによって細胞の恒常性を維持する (Uchiyama et al., 2008)。従って、加齢ないしは加齢に伴う疾病においてオートファジーがどのように関

与するかを探索することは、AMD の病態を理解するうえで非常に大切であると考えられる。加えて、オートファジーの病態関与を明らかにすることは AMD における網膜変性プロセスを阻害したり病態進行を予防する上での薬剤ターゲットの探索にも貢献しうると考えられる(Kaarniranta, 2010)。

アミノ酸飢餓によって誘導されるシグナル伝達として eIF2 α キナーゼと Activating transcriptional factor 4 (ATF4) 経路が知られている。ATF4 の誘導には 4 つの因子が関与し、アミノ酸飢餓に対しては GCN2 (general control nonderepressible 2)、小胞体ストレス応答下では PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase)、ウイルス感染下では二重鎖 RNA により PKR (Protein kinase RNA-activated)、ヘム欠乏下では HRI (heme-regulated eIF2 α kinase) がそれぞれ活性化される。何れの経路によっても ATF4 は誘導され、広範な翻訳活性の抑制や CHOP (transcription factor C/EBP homologous protein) と呼ばれる細胞死関連因子の誘導 (Kilberg et al., 2009) (Fig.3)、LC3 などのオートファジーマーカー蓄積などをもたらす(Mizushima et al., 2010)。また、虚血や酸化ストレス等に伴う小胞体ストレスによって蓄積した異常蛋白質は PERK、IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) α 、 β といった膜貫通型キナーゼ、膜貫通型転写因子である ATF6 (activating transcription factor 6) を介した応答を引き起こし、BiP (immunoglobulin heavy-chain binding protein) 等のシャペロン分子や CHOP 等のアポトーシス因子の誘導といった一連の UPR (Unfolded protein response) 応答を引き起こす (Hetz, 2012) (Fig.4)。

特にオートファジーに関しては、オートファゴゾーム形成過程においてユビキチン活性化酵素としての役割を果たす Atg-7 (Autophagy-related protein 7) や、ライソゾームとオートファゴゾームの融合を促進するライソゾーム膜タンパクである lysosome-associated membrane protein (LAMP)-2 をノックアウトすると神経変性を引き起こすことが報告されている (Tanaka et al., 2000)。このように、中枢神経システムの恒常性維持において飢餓ストレスや小胞体ストレス応答と共にオートファジー機構は極めて重要と考えられている (Uchiyama et al., 2008)。

2-Phenyl-APB-144 (APB) は住血吸虫症の治療薬候補として 20 世紀初頭に合成された塩基性ジアミン芳香族に類する化合物である (Fig.5)。しかしながらラットに経口投与すると特異的に RPE に障害を与え、網膜変性を引き起こす (Lee and Valentine, 1990; 1991) ことが明らかとなったため、開発は中止となりヒトでの治療に用いられることは無かった。APB と同様に塩基性化合物で抗マラリア薬として知られるクロロキンは RPE のライソゾーム酵素阻害活性を有し (Toimera et al., 1995)、不可逆性の網膜変性を引き起こすことが知られている。ライソゾームはカテプシンをはじめとする様々な酸性加水分解酵素を含み、不要となった細胞内小器官などを分解する役割を有することが知られている (Strauss, 2005)。また、オートファジーの過程においてライソゾームはオートファゴゾームと融合しオートライソゾームを形成することによって様々な細胞内物質を消化する (Uchiyama et

al., 2008)。人為的なオートファジー機能不全はライソゾーム膜の v-ATPase 阻害剤である Bafilomycin で処置することや、飢餓状態が長く続くことによっても引き起こされる (Furuchi et al., 1993; Mizushima et al., 2010)。

一般に新薬開発を行う上で、新規に合成された候補化合物はその活性を上昇させるための種々の化学修飾が加えられたのちに、細胞レベルでの有効性・安全性検証を経て、臨床開発段階前には有効性の観点からはラットやマウスなどの実験動物を用いた病態モデルでの検証を行う必要がある。この際、よりヒトの病態に類似した症状を呈するモデルを用いる必要があるが、AMD に関してはカテプシン D (Rackozy et al., 2002)、NF-E2 related factor 2; Nrf2 (Zhao et al., 2011)、Superoxide Dismutase 1; SOD1 (Hashizume et al., 2008) などの分子のノックアウトマウスを用いた報告が多い。つまり、これらノックアウトマウスを用いた病態モデルは作製に少なくとも年単位の期間を要するために、製薬企業においてスピーディー且つ安価に候補化合物を絞り込むためには必ずしも最適とは言えない。これに対して、実験動物に化学物質を投与することによって簡便且つスピーディーに AMD 様病態を再現できる病態モデルは極めて限られている。この点において APB によって誘発される RPE を起源とした網膜症モデルの AMD 病態との類似性を探索すること、並びに薬剤の有効性を判定するためのモデルとしての有用性を検証することは非常に意義があるものと考えた。また、我々の知る限り、網膜 RPE に対して APB が与える影響をライソゾーム・オートファジーとそれに関連する分子メカニズムの観点で明らかとした報告は見受けられない。さらに、APB をラットに経口投与した際の全身への影響や、RPE 障害の特異性に関しても未だ不明である。

本研究では未だ不明な点の多いヒト RPE 変性の病態を探索するための APB 誘発網膜症モデルの有用性に関して明らかとすることを、以下の 3 つのアプローチによって試みたので報告する。1) ヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19) に対する APB の影響を、ライソゾーム・オートファジー機構とそのストレス応答メカニズムの観点から明らかとし、加えて薬理的な APB 誘発細胞死抑制経路を探索する、2) ラットにおいて APB 経口投与後の RPE に対する毒性発現の活性本体を明らかにすると共に、血液生化学的検査から APB の毒性学的プロファイルを明らかとする、3) eIF2 α 脱リン酸化阻害剤 salubrinal の APB 誘発ラット網膜症モデルに対する薬理効果を明らかとする。

略語

AMD; Age-related macular degeneration
APB; 2-Phenyl-APB-144; 1,4-bis(4-aminophenoxy)-2-phenylbenzene
Atg-7; Autophagy-related protein 7
ATF4; activating transcription factor 4
ATF6; activating transcription factor 6
BiP; immunoglobulin heavy-chain binding protein
BRB, Blood retinal barrier
CHOP; transcription factor C/EBP homologous protein
DAPI; 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
DMSO; dimethyl sulfoxide
EBSS; Earle's balanced salt solution
eIF2 α ; eukaryotic initiation factor 2
ER; Endoplasmic reticulum
ERG; electroretinogram
GADD34; growth arrest and DNA damage-inducible protein 34
GCN2; general control nonderepressible 2
HRI; heme-regulated eIF2 α kinase
IRE1 α ; inositol-requiring enzyme 1
i.v.; intravenous
LC/MS/MS; liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry
NAC; N-acetyl cysteine
Nrf2; NF-E2 related factor 2
PBS; phosphate-buffered saline
PERK; PKR-like endoplasmic reticulum kinase
PKR; Protein kinase RNA-activated
p.o.; peroral
RPE; retinal pigment epithelium
SOD1; superoxide Dismutase 1
SDS; sodium dodecyl sulfate
UPR; unfolded protein response
v-ATP ase; Vacuolar-type H⁺-ATPase

材料と方法

薬剤および化合物

2-Phenyl-APB-144; 1,4-bis(4-aminophenoxy))-2-phenylbenzene (APB、分子量 368.44) は既報(Lee and Valentine, 1990)における化学構造を元として参天製薬(株)研究室内にて合成を行った (Fig.5)。Salubrinal は Calbiochem、N-acetyl cysteine (NAC) と Bafilomycin は Sigma-Aldrich から、4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) は Alexis、z-VAD-fmk はペプチド研究所、アクリジンオレンジは Life Technologies よりそれぞれ購入した。その他の一般的な試薬は特級試薬を試薬メーカーから購入して使用した。

実験動物

全ての動物実験は the Association for Research in Vision and Ophthalmology statement for the use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に準拠し、参天製薬(株)動物倫理委員会の承認および監視下にて行われた。5 週齢の雄性 Brown Norway ラットは日本チャールズリバー社より購入し、12 時間明暗サイクル (午前 7 時照明 ON、午後 7 時照明 OFF)、室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55^{\circ}\text{C} \pm 10\%$ 、SPF 環境下で食糧並びに飲料水は自由摂取で飼育した。実験使用時の体重は 189~201g であった。

培養細胞

ヒト網膜色素上皮由来の ARPE-19 細胞株はロット CRL-2302 を ATCC (American Type Culture Collection) より購入して使用した。本細胞株は 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 環境下で培養した。培養液は Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 (penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 $\mu\text{g/mL}$) に 10%FBS を添加したものを使用した。細胞株はサブコンフルエント状態にて各種評価に使用した。

細胞毒性評価

細胞株は $10 \mu\text{M}$ 間隔にて $0 \sim 100 \mu\text{M}$ の濃度範囲で APB を処置し、3、6、24 時間培養した。APB 誘発細胞死は培養液中に放出されるホルマザンを測定する WST-8 法 (Dojindo 社) にて定量的に評価した。ホルマザンはマイクロプレートリーダー (Bio-rad 社) を用いて吸収波長 450nm にて測定を行った。APB 未処置細胞においてバックグラウンド値を差し引いたものを生存率 100%とした。各濃度、時間において APB 無処置群の生存率を 100%として WST-8 法により細胞生存率を算出した。

細胞質 pH 解析

ARPE-19 細胞はカバーガラス上に播種した後に 100 μ M の APB ないしは 100nM の Bafilomycin にて 6 時間処置し、陰性対照として無処置群を設けた。培養液にて洗浄後、ARPE-19 細胞は 10 μ g/mL のアクリジンオレンジ溶液にて 10 分間染色し、PBS にて洗浄した。洗浄した細胞は 1 μ g/mL の Hoechst 33342 (Dojindo 社) にて 5 分間核染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710、Carl Zeiss 社) を用い青色光励起 (480 nm) 下にて緑色蛍光 (510-530 nm) として染色像を可視化した。フルオレセイン強度は各サンプルにつき 20 細胞にて測定し、細胞あたりの平均強度を算出した。

イムノブロッティング

カテプシン D および L の解析において、ARPE-19 細胞は 100 μ M の APB 並びに 100nM の Bafilomycin に 0、3、6、12、18 および 24 時間処置した。処置後、ARPE-19 細胞は PBS で注意深く洗浄したのち生細胞のみを Loading buffer (500 mM Tris-HCl, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue, 10% glycerol, 0.1 M dithiothreitol) に回収し、98°C にて 5 分間加熱処理した。得られたタンパク試料は 15 μ g を 10% アクリルアミドゲルにて電気泳動した。ゲル中にて分離されたタンパクは PVDF 膜にブロッティングし、PBS にて洗浄後、200 倍希釈された抗カテプシン L ヤギ抗体 (C-18、Santa Cruz 社) ないしは抗カテプシン D ウサギ抗体 (Cell signaling 社) に 4°C オーバーナイトで反応させた。次に、1000 倍希釈した HRP 標識の抗ウサギないしはヤギ IgG (MBL 社) に PVDF 膜を 2 時間反応させた。結合したタンパク質は ECL 化学発光法 (GE healthcare 社) にて検出した。次に泳動像はイメージアナライザー LAS4000 (GE healthcare 社) を用いて取り込みを行い、解析ソフトウェア Multigauge (富士フイルム) を用いて定量化した。カテプシン L、D の検出バンド強度を、それぞれの前駆体バンド強度で除し、カテプシンとカテプシン前駆体の発現量比を算出した。

LC3 の解析において、ARPE-19 細胞は 100 μ M の APB あるいは 100nM の Bafilomycin で 0、3、6、12、18 および 24 時間処置した。もう一方で、ARPE-19 細胞は EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) 溶液にて 3 時間処置し飢餓状態を誘発させた。処置終了後、上記と同様の手法にて細胞タンパクは PVDF 膜へブロッティングした。PVDF 膜は 500 倍希釈した抗 LC3 ウサギ抗体 (MBL 社) ないしは 1000 倍希釈した抗 β アクチン抗体 (13E5、Cell signaling 社) に 4°C オーバーナイトで反応させた。その後、タンパク質は上記と同様の方法にて検出し、泳動像の取り込みを行った。次に LC3-II 発現量はバンド強度を β アクチンバンド強度で除することによって補正し、0 時間での LC3-II 発現量比を 1 とした。これに対し各処置時間での発現量比を算出した。

免疫細胞化学

ARPE-19 細胞は 100 μ M の APB あるいは 100nM の Bafilomycin を 12 時間処置し、陰性対照として無処置群を設けた。一方で、飢餓状態として EBSS 溶液にて 12 時間処置する細

胞を設定した。その後、細胞は 4%パラホルムアルデヒド含有 PBS にて 15 分間室温下で固定した後、100 μ g/mL のジギトニン PBS 溶液にて 10 分間処理した。PBS にて 3 回洗浄し、500 倍希釈の抗 LC3 ウサギ抗体 (MBL 社) にてオーバーナイト処理した。PBS にて 3 回洗浄し、500 倍希釈の Alexa 488 標識抗ウサギ IgG (Invitrogen 社) にて室温 1 時間処理し、DAPI 含有の封入剤 (VECTASHIELD、Vector Laboratories 社) にて封入した。次に共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710、Carl Zeiss 社) を用い青色光励起 (480 nm) 下にて緑色蛍光 (510-530 nm) として染色像を可視化した。次にソフトウェア ImageJ (National Institute of Health) を用いて各処置サンプル中の細胞 50 個につき、直径が 0.2 μ m を超える顆粒状 LC3 陽性反応数を計測し、1 細胞あたりの平均値 \pm 標準誤差を求めた。

レポータージーンアッセイ

pCAX-hATF4(1-285)-hRL-HA は hATF4 cDNA (1-285) の部分配列(Oikawa et al., 2012) と HA-tagged Renilla luciferase を pCAX の MCS に挿入することにより作製した。本プラスミドは ATF4 の翻訳活性のレポーターとして用いた。即ち、ATF4 上流の Upstream open reading Frame (uORF)は通常の翻訳状態では終止コドンによりリボソームが乖離するため下流の ATF4 の ORF が翻訳されない状態にある。しかしながら ATF4 上流の eIF2 α がリン酸化されるとリボソームの会合が阻害されると共に uORF での開始コドンがスキップされ、下流の ATF4 の ORF の翻訳がなされる。このような ATF4 の ORF を Luciferase に置換したものが本プラスミドである。pcDNA-FL は Firefly luciferase を pcDNA3.1 ベクターの MCS に挿入することによって作製した。pGL3-hBiP pro.-132 は京都大学・森和俊教授より供与されたものを用いた(Yoshida et al., 1998)。pTKX-ERAI-Luc プラスミドは pTKX3 ベクターの KpnI/BamHI サイトに pCAX-ERAI-Luc(Iwawaki et al, 2009)フラグメントを挿入することにより作製した。本プラスミドは IRE1 α の活性化をモニタするレポーターとして用いた。つまり、IRE1 α は活性化するとその基質である X-box binding protein 1 (XBP1) の mRNA を特異的にスプライシングする。このスプライシングにより XBP1mRNA の 26bp が切除されフレームシフトにより読み枠が変化し転写活性を有する XBP1 となる。本フレームシフトの下流で Luciferase が翻訳されることにより IRE1 α の活性化をモニタするものである。pRL-SV40 は PromegaKK 社より購入した。

ARPE-19 細胞(1 \times 10⁶ cells/mL/tube)は Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V を用いて Amaxa 社のインストラクションに従い pCAX-hATF4(1-285)-hRL-HA レポータープラスミドにトランスフェクトさせ、2 μ g の pcDNA-FL プラスミドを陰性対照として設定した。同様に、pGL3-hBiP pro.-132 と pTKX-ERAI-Luc は pRL-SV40 を用いてトランスフェクトさせた。24 時間後、ARPE-19 細胞は 12 ウェルプレートに 2 \times 10⁵ cells/ウェルの密度で播種し、オーバーナイトで培養した。その後、細胞は 100 μ M の APB で 0、3、6、9、24 時間それぞれ処置した。プロモーター活性あるいは翻訳活性は Dual-luciferase Assay System (Promega KK 社)にて測定し、蛍光強度はルミノメーター (AB-2200-R、ATTO 社) にて測

定した (Measure OD : 450 nm、Reference OD : 655 nm)。ルシフェラーゼ活性は APB 処置無しの細胞で得られた値を 0 として、各測定ポイント (0、3、6、9、24 時間) での相対的な百分率で現した。

定量的 RT-PCR

ARPE-19 細胞は 100 μ M の APB 単独ないしは 100 μ M APB と Salubrinal の混液により 6 時間処置した。速やかにトータル RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen 社) を用いて Qiagen 社のインストラクションに沿って抽出した。300ng のトータル RNA は 1 \times PrimeScript RT reagent (TaKaRa 社), 50 pmol/6.5 μ L Oligo dT Primer (Invitrogen Life Technologies 社) および 50 pmol/6.5 μ L Random 6 mers (Invitrogen Life Technologies 社)を用いて逆転写反応を 15 分間行った (37°C 15 min、85°C 5 sec、4°C forever)。本実験で用いたプライマーは以下の通りである(Nihon Gene Research Laboratories 社製)。

Human CHOP: Fw-5'-CAG AAC CAG CAG AGG TCA CA-3'; rev-5'-AGC TGT GCC ACT TTC CTT TC-3'

Human GAPDH: Fw-5'- GAA ATC CCA TCA CCA TCT TCC AGG-3'; rev-5'- GAG CCC CAG CCT TCT CCA TG-3'

定量的 PCR は $\Delta\Delta$ CT 法により ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied BioSystems 社)を用いて行った。すなわち、各々の PCR は 6.25 μ L の SYBR Green PCR master mix (Applied BioSystems 社)、1 μ M の各プライマー (forward と reverse プライマーの 1:1 ミクスチャー)および 3 μ L の各 cDNA テンプレートを含む溶液にて行った。反応条件は 95°C 5 分の denature の後、95°C 10 sec、60°C 30 sec の 40 サイクルとした。定量解析の際はハウスキーピングジーンの GAPDH を陰性対照として用いた。

血液学および血液生化学検査

20、40 および 80 mg/kg の APB あるいは基剤を雄性 Brown Norway ラットに経口投与した。ラットの体重は投与当日、投与後 1 および 4 日にて計測した。投与 4 日後、ラットに塩酸ケタミン (120 mg/kg) とキシラジン (6 mg/kg) 混液を筋肉内注射することによって全身麻酔を施した。血液は APB 投与・基剤投与群それぞれより腹部後大動脈より採取した。血液学検査においては、150 μ L の 3.8%クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として含むシリンジを用いて個体あたり 1.8mL の血液を採取し、prothrombin time (PT)および activated partial thromboplastin time (APTT)測定のために自動血液凝固解析装置 KC-10A (Amelung Sigma Diagnostics 社) に供した。血漿は 20 °C、1,710 \times g, 3000 rpm、15 分間の遠心分離によって得たものを解析に供した。PT および APTT 測定以外では、個体あたり約 1mL の血液を抗凝固剤として EDTA-2K を含有するシリンジを用いて採取した。得られた全血は ADVIA120 hematology system (Siemens 社) にて解析に供した。一方、血液生化学検査においては、凝固促進フィルム処置したシリンジを用いて、個体あたり 1mL の血液を採取した。20 °C、

1710×g, 3000 rpm、15 分間の遠心分離によって得られた血清は、BM6010 (JEOL) により解析した。すべての単位、方法は Table 2, 4 を参照のこと。

薬物動態学的解析

血漿中 APB 濃度は 40 mg/kg の経口投与、ないしは 1 mg/kg 静脈内投与後の雄性 Brown Norway ラットにおいて測定した。APB は、経口投与時にはコーンオイル (和光純薬)、静脈内投与時には 10% Cremophor EL 生理食塩溶液 (ナカライテスク) に溶解した。血漿は経口投与時には投与直後 (0) および投与後 0.5、1、2、4、6、24 時間後で採取し、静脈内投与時には投与後 0.25、0.5、1、2、4、6、24 時間後で採取した。採取した血漿は -80°C にて保存した。

血漿中 APB 濃度は液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS/MS) にて測定した。10 μ L の血漿に 180 μ L の 1-4-bis(4-aminophenoxy)benzene 含むアセトニトリルを加えて凝固沈殿させ内標準溶液とした。上清は 0.1% ギ酸溶液で 10 倍希釈した。5 μ L のサンプル溶液は分析カラム (XTerra Phenyl; 2.1×50 mm i.d., 3.5 μ m; Waters 社) を通し、0.5 mL/分にて 0.1% ギ酸含有アセトニトリルないしは純水にて分離した。抽出された APB と内標準溶液はターボスプレーイオン化法により positive ion mode にて MS/MS (API4000, AB Sciex 社) を用いて分析した。0.05 μ g/mL の定量下限濃度は検量線の各濃度における逆回帰値の Accuracy が 100% \pm 20% の場合に採用した。薬物動態パラメータは WinNonlin Professional ver. 5.2.1 (Pharsight 社) を用いた。Area under the time-concentration curve (AUC) は linear-logarithmic trapezoidal method により算出した。次に、経口投与された APB が体循環においてどの程度の割合で活性本体として到達し作用しているのかを生物学的利用率 (Bioavailability) を算出することによって明らかとした。すなわち、経口投与群における個体ごとの $AUC_{0-\infty}$ /投与量 (mg/kg) を静脈内投与群における $AUC_{0-\infty}$ の平均値/投与量 (mg/kg) で除し、100 倍することにより百分率で算出した。

Salubrinol の薬理学的効果

(Salubrinol の ARPE-19 細胞死に対する効果)

ARPE-19 細胞は 100 μ M の APB 単独ないしは 1、10、100 μ M の各阻害剤 (z-VAD-fmk ; 汎カスパーゼ阻害剤、NAC : 抗酸化剤、AEBSF : セリンプロテアーゼ阻害剤、Salubrinol : eIF2 α 脱リン酸化阻害剤) との混液として 24 時間処理した。その後、細胞生存率は「細胞毒性評価」の項に記したように、WST-8 法にて測定した。

(Salubrinol ラット硝子体内投与による効果)

In vivo 解析として 40 mg/kg の APB ないしは基剤をラットに経口投与し、4、10、25 μ g/eye の Salubrinol ないしは基剤を 5 μ L/eye の投与ボリュームにて単回硝子体内投与した。投与用の Salubrinol は 0.8、2、5 mg/mL の DMSO/Cremophor (終濃度は各 2.5%) の PBS 混

合液として調整した。網膜電位図 (Electroretinogram : ERG) は ERG recording system (Portable ERG&VEP LE-3000、トーマー社)を用い、投与 7 日後に測定した。すなわち、ラットは 1 時間の暗順応の後、微弱赤色光下に設置し 0.5% トロピカミド (ミドリン P、参天製薬株式会社) の点眼により散瞳させ、続いて 0.4% オキシブプロカイン点眼により眼局所麻酔を施した。ラットの尾に接地電極 (針電極)、鼻に不関電極 (針電極) を取り付け、角膜に LED 電極を装着し、スタンドで固定した。赤色光を消し、静置してノイズがないことを確認後、シャッターを切り、ERG を記録した。得られた ERG 波形のうち、a 波および b 波の振幅値 (μV) を網膜機能の指標として用いた。

血液網膜関門 (Blood retinal barrier : BRB) は小動物用アダプターを用いた硝子体フルオロメトリー法 (Ishiko et al., 1996) により、APB 投与 8 日後に評価した。ラットは上述のように散瞳および眼表面局部麻酔処置を施した。その後、1% フルオレセインナトリウム溶液を 1 mL/kg の割合で静脈内投与した。45 分後に眼内フルオレセイン強度曲線をフルオロトロンマスター (Ocumetrics 社) を用いて既報に従いデータを得た (Ishiko et al., 1996)。即ち、眼内フルオレセイン強度曲線は、網膜から 5~6mm 位置の蛍光強度を硝子体中央部の値として採用した。データ取得後、ラット腹腔内動脈より血液を速やかに採取し、1500g、5 分間遠心分離を行った。得られた血漿は PBS にて 41 倍希釈し、フルオロトロンマスターを用いて血漿中蛍光色素量を測定した。各眼の BRB 透過性 (RPE バリア機能) の指標として血漿中フルオレセイン濃度 (ng/mL) を硝子体中のそれで除したものを採用した。

(Salubrial ラット腹腔内投与による効果)

40 mg/kg の APB ないしは基剤をラットに経口投与し、その 6 時間後に Salubrial を 2 mg/kg 腹腔内投与した。投与翌日から Salubrial は同用量にて 1 日 1 回 8 日間連続腹腔内投与した。ERG 並びに BRB 透過性はそれぞれ APB 投与 7 日後、8 日後に Salubrial 硝子体内投与による薬効評価と同様に評価した。

硝子体フルオロメトリーによる測定実施後、速やかにラットは腹部大動脈を切開することにより安楽殺措置を行った。光学顕微鏡検査のため、眼球は摘出し 2.5% グルタルアルデヒドと 10% ホルマリンの混液 (pH7.4) にてオーバーナイト・室温にて固定し、定法に従いエタノール脱水処理を行った後にパラフィン包埋を行った。その後、3 μm の薄切切片を作製し、HE 染色に供した。染色切片は光学顕微鏡 BX50 (オリンパス社) にて鏡検し、写真撮影を行った。

統計解析

データは全て平均値 \pm 標準誤差 (S.E.M.) にて表記した。すべての実験は少なくとも 3 例のデータを取得した (薬物動態検査の際の APB 静脈内投与群および LC3 免疫細胞化学を除く)。統計解析には SAS system 8.2 (SAS Institute Inc., USA) に基づいた EXSAS® ver.

7.1.2. (Arm Co., Ltd, Japan) を使用した。2 群間検定に関しては F 検定に引き続き Student の t 検定ないしは Aspin-Welch の t 検定を行った。多群間検定には一元配置分散分析に引き続き Dunnet の多重比較検定を行った。すべての統計学的解析は有意水準を 5% に設定した。

結果

APB 誘発 ARPE-19 細胞死における細胞内小器官 pH 変化並びにカテプシン活性阻害に関して

ARPE-19 細胞は 0~100 μ M の APB で、3、6 および 24 時間処理を施した。24 時間処理群において濃度および時間依存的な細胞死が、50~100 μ M の APB 処置において認められた (Fig.6)。特に 100 μ M における細胞生存率は 10%程度であったが、安定した細胞死の再現性を考慮し、以降の実験においては本薬物濃度を採用した。

次に、APB 処理が細胞内 pH に及ぼす影響を検討した。100 μ M の APB を処理した細胞において、アクリジンオレンジ染色強度は弱く、これは APB 非処置細胞における強い細胞質内の蛍光染色像と比較して明らかであった (Fig.7)。また、ライソゾーム膜の v-ATPase 阻害剤である Bafilomycin を処理した細胞においても染色像は認められなかった (Fig.7)。次に、APB ないしは Bafilomycin 処置細胞においてアクリジンオレンジ染色強度を定量化したところ、非処置細胞と比較して有意に低いことが明らかとなった (Fig.8)。これらのことから、APB および Bafilomycin 処置により、ARPE-19 細胞小器官の pH は酸性から中性へと変化していることが示唆された。

100 μ M の APB および 100nM の Bafilomycin を 0~24 時間処置した ARPE-19 細胞におけるカテプシン活性の変化を、プロカテプシンおよびカテプシンの D、L に対する抗体を用いたウェスタンブロット法にて解析した。カテプシン L、D において、APB と Bafilomycin 処置により時間依存的なプロカテプシン(カテプシンの前駆体)の蓄積が認められた (Fig.9)。定量解析を行った結果、プロカテプシン L に対するカテプシン L の比率は APB 処置 18 および 24 時間後、Bafilomycin 処置 12、18、24 時間後にそれぞれ統計学的有意に増加した。プロカテプシン D に対するカテプシン D の比率は APB 処置 18、24 時間後、Bafilomycin 処置 24 時間後にそれぞれ有意に増加した (Fig.10)。これらのことから、APB および Bafilomycin 処置により、ARPE-19 細胞内カテプシンの前駆体から活性体への変換が阻害されていることが示唆された。

ARPE-19 細胞における APB のオートファジー並びにオートファジーマーカー蓄積に与える影響

ARPE-19 細胞に対して 100 μ M APB ないしは 100nM Bafilomycin 処理を施した細胞においては、処理 3 時間後よりオートファジーマーカーである LC3-II の増加が認められ、以後時間依存的に 24 時間にかけて更に増加することが示された (Fig.11A)。定量解析の結果、これらの変化は APB においては処置 3~24 時間後において、Bafilomycin においては処置 18、24 時間後において、それぞれ処置開始時の値に対して統計学的に有意であった (β アクチン発現量による補正值) (Fig.11B)。また、陽性対象として EBSS 溶液処理により飢餓

状態を誘発したところ、3 時間後で LC3-II 発現量比の増加が認められた (Fig.11A、B)。

更に ARPE-19 細胞を同様の飢餓条件 (EBSS 処置) および APB、Bafilomycin にて 12 時間処理し、LC3 の局在を免疫染色法にて可視化することを試みた。その結果、無処置と比較して EBSS、APB、Bafilomycin 何れの処置においても細胞質内に顆粒状の陽性反応が認められた (Fig.12)。また、細胞あたりの顆粒状陽性反応数は無処置と比較して有意に多かった (Fig.13) これらのことから、ARPE-19 細胞のライソゾーム機能不全ないしは飢餓状態と連動して、APB はオートファゴゾーム形成を阻害していることが示唆された。

APB が ATF4 翻訳活性に及ぼす影響

APB 誘発のオートファジー機構阻害に対して、飢餓状態および小胞体ストレスの何れが関与するかを明らかにする目的で ARPE-19 細胞を用いたレポータージーンアッセイを行った。すなわち、小胞体ストレスのマーカーとして BiP および IRE1 α 、飢餓ストレスのマーカーとして ATF4 をそれぞれ用いた。

その結果、ATF4 の翻訳活性は APB 処置 6 時間後より約 3 倍有意に上昇し、その後時間依存的な上昇が続き、24 時間後では約 5 倍の増加率であった (Fig.14)。一方で、BiP のプロモーター活性および IRE1 α 活性化は APB9 時間処置後でわずかな上昇が認められるのみであり、BiP は 24 時間後で約 2 倍、IRE1 α は約 1.5 倍程度の上昇に留まった。これらの結果から、APB 誘発の細胞毒性は ATF4 翻訳活性の誘導と関連している可能性が高く、BiP や IRE1 α などの小胞体ストレス関連因子はこれら ATF4 の誘導に付随して変動していることが推察された。

eIF2 α 脱リン酸化阻害が APB 誘発細胞死に与える影響

APB 誘発の ARPE-19 細胞死にどのような細胞内シグナル伝達経路が関与するのかを明らかにする目的で、各種薬理的なシグナル伝達阻害剤を用いた細胞死アッセイを実施した。1~100 μ M の AEBSF (セリンプロテアーゼ阻害剤)、100 および 1000 μ M の NAC (抗酸化剤)、1~100 μ M の z-VAD-fmk (汎カスパーゼ阻害剤) は何れも APB 誘発細胞死に対して有意な効果を示さなかった (Fig.15、16)。一方で、eIF2 α 脱リン酸化阻害剤の Salubrinal は 100 μ M の濃度においてパーシャルではあるものの、統計学的に有意に APB 誘発細胞死を抑制することが明らかとなった (Fig.16)。本結果は前実験結果と合わせて考えると、eIF2 α と ATF4 シグナル伝達経路が APB 誘発細胞死に関連することを示唆するものと考えられた。

次に細胞死シグナル伝達に関与する CHOP の mRNA 発現に対する APB および Salubrinal の影響を検討した。その結果、APB 処理により CHOP の mRNA 発現量は約 8 倍の有意な増加を示し、Salubrinal 処置は本発現量の上昇を約 4 倍へと有意に抑制することが示された (Fig.17)。これらから Salubrinal は APB 誘発細胞死を CHOP の mRNA 発現を抑制することにより阻害している可能性が示唆された。

APB 経口投与がラット血液学・血液生化学的パラメータに及ぼす影響

APB のラット経口投与が、全身性の毒性発現の結果として網膜変性を引き起こすのか、あるいはどのようなメカニズムによって RPE 特異的な障害を引き起こすのかを明らかにする目的で、0、20、40、80 mg/kg の APB を経口投与した際の血液学・血液生化学パラメータの変動を探索した。同時に APB 投与後のラット体重変動もモニタリングした。

血液学的検査の結果、無処置群、基剤投与群、20 及び 40 mg/kg の APB 投与群において各パラメータに統計学的有意差は認められなかった。80 mg/kg の APB 投与群において網赤血球数(RBC)は基剤投与群と比較して有意に低いものであった。同用量群では好中球(Neut)および単核球数(Mono)は基剤群と比較して有意に高かった (Table 1, 2)。

血液生化学検査の結果、基剤投与群のアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) 値、総コレステロール (T-CHO) 値は無処置群と比較して有意に低値であった。またナトリウム (Na) 値は無処置群と比較して有意に高かった。80 mg/kg の APB 投与群においてアルブミン/グロブリン比 (A/G) は基剤群に比して有意に低かった (Table 3, 4)。基剤投与群、20 及び 40 mg/kg の APB 投与群間において、血液生化学検査値に統計学的に有意な差異は認められなかった。

以上から、APB は少なくとも 40 mg/kg までの用量においては、血液学的・血液生化学的パラメータの観点から毒性学的に有意な変化を引き起こさないものと考えられた。これに加えて、全群間において APB 投与前、投与 1 日・4 日後其々の時点においてラットの体重に有意な差異は認められなかった (Fig.18)。

APB 経口投与時の血中動態

APB をラットに経口投与した際、どのような吸収代謝を受け網膜症を引き起こすのかはこれまで報告されていない。また、なぜ RPE 特異的に障害を引き起こすのかのメカニズムも明らかとなっていない。これらを明らかにすることは APB の ARPE-19 細胞に対する障害メカニズムが In vivo において再現されるか否かを考察する上で重要であると考えた。そこで、APB のラットにおける薬物動態学的プロファイルを明らかにすることを試みた。

ラットに 40 mg/kg の APB を経口投与、1 mg/kg を静脈内投与した際の血漿中濃度の時間推移を Fig.19 に示す。同時に得られた薬物動態パラメータ値を Table 5 に示す。APB 血漿中濃度は経口投与後に速やかに上昇し、投与 2～6 時間後にかけて維持され、以降 25 時間後にかけて徐々に低下した。個々の薬物動態パラメータは、Tmax が 4 時間、Cmax が 2.68 μ g/mL、T1/2 が 7.7 時間、AUC_{0-∞}が 43.192 μ g/hr/mL であった。一方で、APB 静脈内投与後、血漿中濃度は速やかに低下し、T1/2 が 1.6 時間、AUC_{0-∞}が 1.233 μ g/hr/mL であった。これらのパラメータに基づく 40 mg/kg の APB 投与時の生物学的利用率は 88.3%であった。以上のように、APB 経口投与時の生物学的利用率は非常に高いことから、代謝物では無くその未変化体が RPE の変性を引き起こしていることが示唆された。

APB 誘発ラット網膜症に対する eIF2 α 脱リン酸化阻害剤の効果

これまで、*In vitro* において eIF2 α 脱リン酸化阻害剤の Salubrinal が APB 誘発 ARPE-19 細胞死を抑制することを明らかとした。加えて、*In vivo* においても 40 mg/kg までは毒性学的なラット生体への影響は無く、且つ経口投与された APB の未変化体が RPE 障害と網膜変性を引き起こしている可能性が高いことが示唆された。以上から、APB 誘発ラット網膜変性に対する Salubrinal の薬理効果を検証することを試みた。

40 mg/kg の APB をラットに経口投与した後、4、10、25 μ g/eye の Salubrinal ないしは基剤を単回硝子体内投与した。APB 投与 7 日後、基剤群において ERG の a 波および b 波は APB 投与群に比して統計学的に有意に減弱した (Fig.20)。同じく APB 投与 8 日後において、硝子体内フルオレセイン濃度は基剤投与群に比して有意に上昇していることが示された (Fig.21)。ERG および硝子体内フルオレセイン濃度、何れの指標においても Salubrinal は有意な薬理効果を示さなかった。Salubrinal は物理化学的特性として難水溶性であることから、硝子体内で適切に溶解し標的組織へ薬物到達しなかったものと考え、投与経路を腹腔内投与へと変更することによる薬効評価を試みた。

すなわち、40 mg/kg の APB をラットに経口投与した後、2 mg/kg の Salubrinal ないしは基剤を 1 日 1 回 8 日間連続腹腔内投与した。APB 投与 7 日後、基剤群において ERG の a 波および b 波は APB 投与群に比して統計学的に有意に減弱した (Fig.22)。同じく APB 投与 8 日後において、硝子体内フルオレセイン濃度は基剤投与群に比して有意に上昇していることが示された (Fig.23)。光学顕微鏡観察下において、基剤投与群での RPE は空胞化と変性所見を呈すると同時にライソゾーム様の顆粒を包含していた。加えて、視細胞の外節ならびに内節層は基剤処置眼と比較して蛇行し障害を受けていることが明らかとなった

(Fig.24)。これとは対照的に、Salubrinal 処置眼では基剤群に比して、ERG の a 波および b 波は有意に回復し (Fig.22)、硝子体内フルオレセイン濃度も有意に低かった (Fig.23)。病理学的には視細胞外節ならびに内節の障害、RPE の障害と欠損は緩和されていた (Fig.24)。以上から、eIF2 α 脱リン酸化阻害剤の Salubrinal は機能的にも形態学的にもラット APB 誘発網膜変性を保護することが明らかとなった。

考察

本研究の前半部分において APB は ARPE-19 細胞株の細胞小器官 pH を上昇させオートファジー異常とライソゾーム機能不全、さらに細胞死を引き起こすことを明らかにした。この結果は APB を投与されたラットの RPE において不溶性のライソゾーム未消化物を伴う細胞障害が病理学的検査結果として報告されていた現象(Lee and Valentine, 1990; 1991)を *In vitro* において分子レベルの現象で捉える点にまで広げることができたものと考ええる。APB は経口投与により短期間にラット RPE 特異的に障害を誘発し、それに引き続き網膜変性を引き起こすことが知られているが、その分子メカニズムの一端を示すことができたのは本研究の大きな成果の一つと考えられた。網膜変性を引き起こす化学物質として、RPE に対して pH 変化(Wennan et al., 2008)やカタレプシン D 酵素活性の阻害(Toimera et al., 1995)を誘発するクロロキンが広く知られている(Peters et al., 2006; Rosenthal et al., 1978)。クロロキンのような弱塩基性の物質はライソゾームのような酸性小器官に特異的に蓄積すると考えられており(Poole and Ohkuma, 1981)、本研究における APB についてもライソゾーム内 pH の上昇の点で共通している。一方で、ライソゾーム膜の v-ATP ase 阻害剤の Bafilomycin(Furuchi et al., 1993)はライソゾームの酸性化を阻害する(Deguchi et al., 1994; Mizushima et al., 2010)ことが報告されているが、本研究の ARPE-19 細胞株において、本剤処理は細胞内 pH の上昇を引き起こすことが明らかとなった。また、APB と Bafilomycin はいずれもカタレプシン D および L の前駆体であるプロカタレプシン D、L の蓄積を引き起こすことが明らかとなり、これはライソゾーム内の酵素活性不全を示唆するものと考えられた。

APB を含む diaminodiphenoxyalkane 類の化合物は 1950 年代に住血吸虫症の治療薬候補として精力的に研究活動が行われていた(Goodwin et al., 1957)。しかしながら、APB のような芳香族ジアミンは網膜症に代表される予期せぬ副作用を引き起こすことも同時に明らかとなった(Sorsby and Nakajima, 1958)。これらの化合物は弱塩基性の物理化学的特性を有するため、APB はクロロキンに比較的類似した作用；つまりライソゾーム膜の v-ATP ase 阻害とライソゾーム内の pH 上昇やそれに伴うカタレプシン等の消化酵素阻害作用を有するものと考えられた。これらの知見から APB はライソゾームを含む細胞小器官の pH を上昇させ、その結果としてライソゾーム内プロカタレプシンの活性体への成熟を阻害したことが示唆された。

オートファジーは網膜 RPE においてその恒常性維持に大きな役割を果たしていると考えられている(Strauss, 2005)が、加齢黄斑変性などの RPE 機能不全を伴う網膜変性疾患における役割は詳細に明らかとはなっていない。一方でオートファジーにおいて重要な役割を果たすライソゾーム膜酵素 LAMP-2 のノックアウトマウスでは、生体内の様々な器官においてオートファゴゾーム形成が亢進することが報告されている (Tanaka et al., 2000)。オ

オートファジー進行のプロセスにおいて、LC3-IはLC3-IIへと変換されオートファゴゾーム膜に結合し、このオートファゴゾームはライソゾームと融合しオートライソゾームを形成することが知られている(Uchiyama et al., 2008)。オートファゴゾームとライソゾームの結合が阻害されると、オートファジーマーカーであるLC3-IIの増加することも報告されている(Mizushima et al., 2010)。本研究においてもAPB処置を施したARPE-19細胞株で、ライソゾームにおけるカテプシン成熟阻害のみならずLC3-IIの蓄積も認められている。同様の現象はクロロキン処理を施したARPE-19においても認められている(Yoon et al., 2010)。APB投与によるラット網膜変性を最初に報告した先行研究(Lee and Valentine, 1990; 1991)では、電子顕微鏡観察下でRPE内に多数のファゴゾームの存在を認めている。また、カテプシンDのミュータントマウスのRPEにおいては、オートファゴゾーム様の未消化物が多数認められることが報告されている(Rakoczy et al., 2002)。以上の先行知見や本研究における成果から、APBはまずライソゾームの機能不全を引き起こし、二次的にオートファゴゾームの過剰な蓄積とそれによるオートファジー不全を誘発していることが示唆された。

本研究の中盤においてAPBはライソゾームとオートファジーの機能不全のみならず細胞死も引き起こし、その過程においては飢餓ストレスマーカーであるATF4の翻訳活性が上昇することを明らかにした。ARPE-19細胞株において酸化ストレスを与えると、酸化ストレス応答性転写因子であるNF-E2-related factor 2 (Nrf2)と同時にATF4の転写活性も誘導することが報告されている(Miyamoto et al., 2011)。本研究において抗酸化剤であるNAC処理はAPB誘発細胞死を抑制しなかったことから、酸化ストレスがAPB誘発細胞死のメカニズムとして関与している可能性は低いと考えられた。一般にオートファジーはアミノ酸飢餓、Unfolded protein response、ウイルス感染のようなストレス環境下において誘導されることが知られている(Kilberg et al., 2009)。本研究においてARPE-19細胞株をEBSS溶液中で培養することにより飢餓条件に暴露したところ、APB処理した際と同様にオートファジーマーカーであるLC3-IIの蓄積が認められた。ATF4はUnfolded protein response時のみならずアミノ酸飢餓状態においてGCN2キナーゼにより誘導されることが報告されている(Kilberg et al., 2009)。本研究においては誘導の程度は軽微であったものの、ATF4に続いて小胞体ストレス関連因子であるBiPやIRE1 α の誘導も認められた。これは持続的なアミノ酸飢餓状態がATF4の強い誘導に続いてマイルドな小胞体ストレスを引き起こした結果ではないかと推察された。しかしながら、本仮説を立証するためにはAPB処置によるATF4翻訳活性上昇時にGCN2キナーゼがeIF2 α をリン酸化することを立証しなければならないと考えられ、今後の研究課題としたい。

一方で、APB誘発のARPE-19細胞死に関与する可能性があると考えられるシグナル伝達としてカスパーゼあるいはセリンプロテアーゼ経路が挙げられる。しかしながら、本研究において汎カスパーゼ阻害剤であるz-VAD-fmk、セリンプロテアーゼ阻害剤であるAEBSFは何れもAPB誘発ARPE-19細胞死を抑制しなかった。従って、カスパーゼあるいはセリンプロテアーゼ経路を経たアポトーシスによる細胞死は、APB誘発ARPE-19細胞

胞死の主要メカニズムである可能性は低いと考えられた。

Salubrinal (Boyce et al., 2005)は eIF2 α の脱リン酸化阻害剤であり、本研究において APB 誘発のラット網膜変性のみならず APB 誘発の ARPE-19 細胞死をも統計学的に有意に抑制することが明らかとなった。eIF2 α のリン酸化は細胞全体の翻訳活性を抑制すると共に ATF4 や CHOP、BiP、GADD34 などのストレス応答因子も誘導する (Hetz, 2012)。一方で本研究において、APB はそれ自体がアポトーシス誘導因子の CHOP を含む ATF4 の翻訳活性を誘導することが示された。つまり、Salubrinal による eIF2 α キナーゼの脱リン酸化阻害は理論的には eIF2 α リン酸化によって ATF4 を誘導するが、APB それ自身も ATF4 を誘導する。しかしながら表現型として Salubrinal は APB 誘発 ARPE-19 細胞死を抑制し、APB は同細胞死を誘発する結果となった。また、定量的 PCR による実験結果から、Salubrinal は CHOP の mRNA 発現量を抑制することが明らかとなった。これは Salubrinal による eIF2 α の脱リン酸化は理論的には eIF2 α リン酸化によって ATF4 を誘導するが、その下流因子である CHOP 発現量は抑制したことを示唆するものと考えられた (Fig.22)。

以上の知見から Salubrinal による APB 誘発 ARPE-19 細胞死の抑制には、eIF2 α キナーゼ経路の ATF4 誘導とは独立した CHOP 発現量抑制も含む細胞全体の翻訳活性低下が関与している可能性、あるいは Salubrinal 自身が有する eIF2 α 経路以外に作用する未知のメカニズムが存在する可能性が推察された。Boyce ら (2005) は、内因性の eIF2 α 脱リン酸化阻害作用を有するセリン/スレオニンフォスファターゼの PP1 (Protein phosphatase1) と GADD34 の複合体が Salubrinal による eIF2 α 脱リン酸化を拮抗的に阻害することを明らかにしたと共に、Salubrinal が HSV (Herpes simplex virus) 複製阻害活性を有し、その作用には未知の基質が関与することを示唆している。このように Salubrinal には未知の作用メカニズムの存在することが示唆され、APB 誘発の ARPE-19 細胞死に係る分子メカニズムと共に、これらの現象の解明には更なる研究が必要であると考えられた。

APB は Lee と Valentine (1990; 1991)によってラット網膜変性を誘発することが報告されているものの、その毒性学および薬物動態学的プロファイルは十分に明らかとはなっておらず、RPE に対して特異的に作用するメカニズムも同様に不明である。その一端を明らかにすることは ARPE-19 細胞株で得られた分子メカニズムに関する知見の妥当性を検証するためにも重要であると考えられた。本研究では血液学的検査ならびに血液生化学検査の結果から、40 mg/kg 以下の用量において APB は毒性学的に特筆すべき変化を誘発しないことを明らかとした。従って、In vivo の実験を通じて 40 mg/kg をラット網膜変性誘発用量として採用した。薬物動態学的解析の結果、APB の生物学的利用率は 88.3%の高値を示したことから、薬物代謝を受けていない未変化体の APB が網膜症を誘発する主因子であることが強く示唆された。本研究結果は In vitro で得られた知見に基づいた In vivo での実験結果の考察の妥当性を一定に担保するものと考えられた。Lee と Valentine (1990)は APB 誘発ラット網膜変性がアルビノおよび有色ラットの双方で観察されたことを報告し、APB による網膜毒性において RPE の含有するメラニン色素とそれに対する化合物の親和

性が関与する可能性は低いことを示唆している。一方で、前述したように APB はクロロキンと同様に弱塩基性の物理化学的性質を有し、ライソゾームはこのような物理化学的特性を有する化合物を取り込む性質を持つ(Toimera et al., 1995)ことから、RPE 内のライソゾームに未変化体としての APB が取り込まれて蓄積した可能性が考えられる。また、RPE は脳組織における血液脳関門 (BBB ; Blood brain barrier) に類似した血液網膜柵 (BRB ; Blood retinal barrier) の一端を担い、網膜中への選択的な物質及びエネルギー供給を行っている。さらに、RPE は光受容により酸化された視細胞外節や、異物を取り込み自死したミューラー細胞等を常に取り込み消化して網膜外へ排泄する役割を持つことから、その細胞内に多量のライソゾームを包含している(Strauss, 2005)。以上から、APB はその物理化学的特性からライソゾームに取り込まれやすい性質を持つために、生体内で多量のライソゾームを包含する RPE 細胞に蓄積することによって特に強い細胞毒性を発揮するものと考えられた。

加齢黄斑変性 (AMD) は RPE のライソゾーム内に含まれるリポフスチンと呼ばれる不溶性過酸化脂質と、RPE 細胞外に蓄積するドルーゼンと呼ばれる老廃物によって、RPE 自身の細胞死が誘発されることにより引き起こされると考えられている(Algvere and Seregard, 2002)。AMD 患者の網膜サンプルにおいてはオートファジーマーカーの蓄積やライソゾーム活性の低下などが観察されたと報告されている(Wang et al., 2009)。Wang ら (2009) はオートファジーの亢進や、加齢変化を来した RPE による細胞内蛋白のエクソゾームを介した排出などがドルーゼン形成を引き起こすものとの仮説を提唱している。一方で、A2E と呼ばれるドルーゼン構成物質はライソゾーム膜の ATP 駆動性プロトンポンプを阻害し、その結果としてライソゾームの pH を上昇させることが報告されている(Bergmann et al., 2004)。さらに、過酸化脂質はオートファジーのプロセスを阻害し、RPE におけるリポフスチンの増加を引き起こすことも示されている(Krohne et al., 2010)。また、Mitter ら (2012) は AMD の RPE において、取り込まれた老廃物とライソゾームの融合が阻害され、その結果としてオートファゴゾームの増加が引き起こされるとの仮説を提唱している。これら AMD の病態における RPE 内のオートファジーの仕組みと、その機能不全による病態発現には諸説が提唱され未だ明確な病理は明らかとされていない。しかしながら、本研究では ARPE-19 細胞株においてライソゾームの機能不全やそれに伴うオートファジー障害と言った AMD 病理に類似した現象の一部を APB が引き起こすことを明らかとした。加えて、研究成果後半では In vivo においても APB 誘発による RPE 起源の網膜変性が引き起こされることを明らかとし、これに対する薬理的アプローチの一端を eIF2 α キナーゼの脱リン酸化阻害により示した。これらの所見は実験動物や細胞を用いた AMD における RPE 病理の解明と有効な薬剤探索に部分的であれ貢献出来るものと考ええる。

最後に、本研究結果をまとめると、ARPE-19 細胞株において APB はアミノ酸飢餓類似の ATF4 翻訳活性上昇を伴うライソゾーム機能障害とオートファジー不全を引き起こすことを明らかとし、APB 誘発細胞死並びにラット網膜変性は eIF2 α キナーゼの脱リン酸化阻

害剤 Salubrinal によって保護されることを示した。APB による ATF4 翻訳活性上昇や eIF2 α キナーゼ脱リン酸化阻害による薬理効果に関して未だ詳細な分子メカニズムは不明であるものの、本研究成果はオートファジー機能不全を伴う網膜変性に対する有効な治療法探索において有用なツールの一つになり得るものと考えられた。

図表

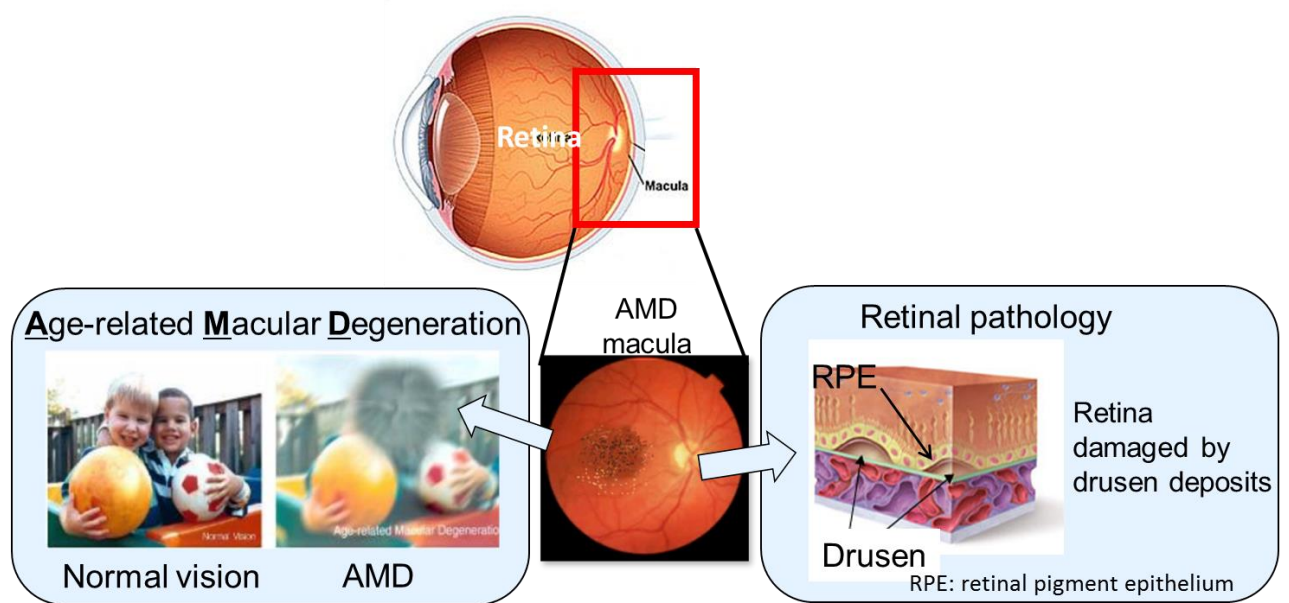


Figure 1. 加齢黄斑変性 (Age-related macular degeneration : AMD)

AMD の模式的な病態像を示す。加齢により蓄積したドルーゼンと呼ばれる老廃物により RPE が障害を受け、この障害が中心視野の視覚を司る黄斑 (Macula) において発生した場合に、不可逆性の視覚障害を引き起こす。図は参天製薬株式会社内資料より転用。

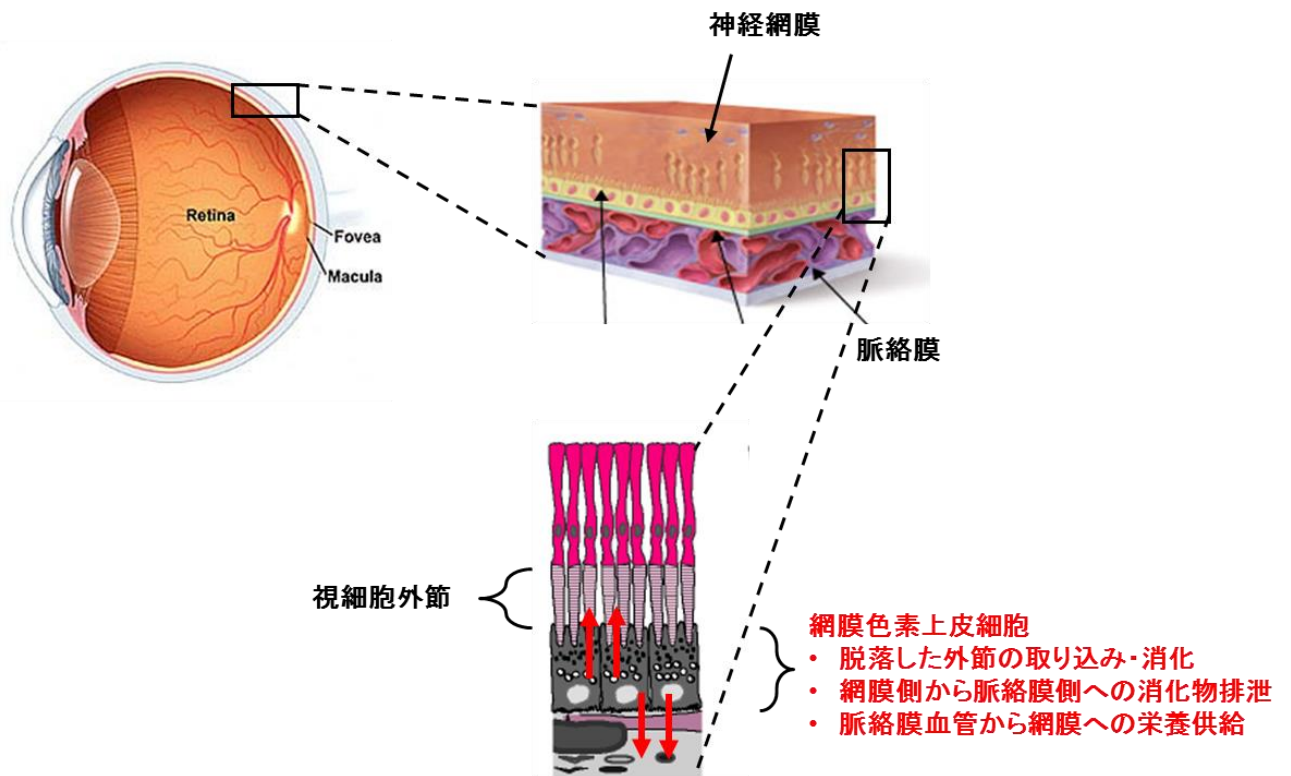


Figure 2. 網膜色素上皮細胞の役割

網膜色素上皮細胞（Retinal pigment epithelium : RPE）は眼球網膜の神経網膜と脈絡膜の間に位置する単層上皮細胞である。RPE の眼球中央硝子体側には光と映像を感知する視細胞が存在し、光受容によって酸化した視細胞外節は RPE に取り込まれた後に消化され脈絡膜側へ排泄される。また、脈絡膜側からは血管を介して RPE へ栄養が補給され、これが網膜へと運ばれる。以上のように RPE は網膜の恒常性維持に重要な役割を果たしている。特に AMD の病態においては RPE のこれらの機能が異常を来すことによって、網膜症が引き起こされると考えられている。図は参天製薬㈱社内資料より転用。

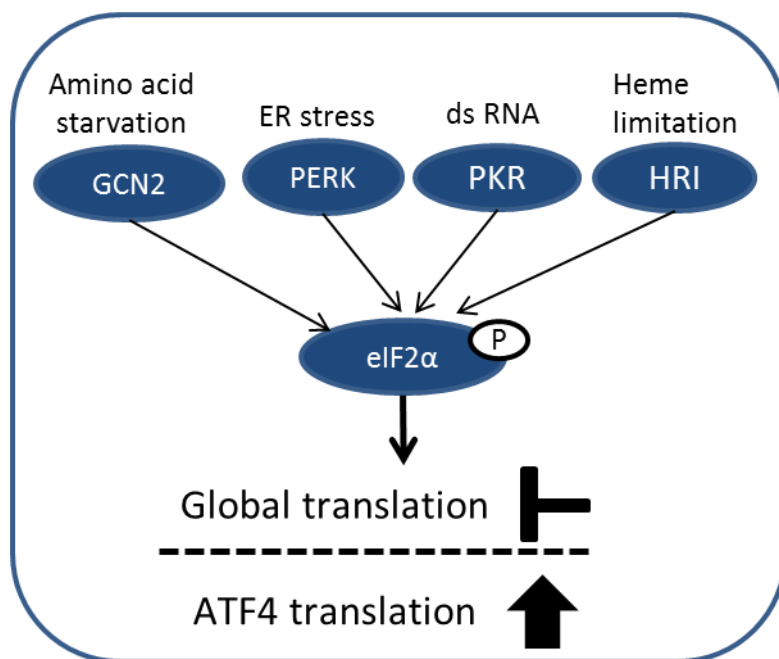


Figure 3 ATF4 のシグナル伝達経路

ATF4 翻訳活性上昇には 4 種類の誘発因子が関与する。アミノ酸飢餓によって GCN2、ER ストレスによって PERK、dsRNA によって PKR、ヘム欠乏によって HRI が活性化し、最終的に eIF2 α 経路を介して広範な翻訳活性の低下ならびに ATF4 翻訳活性上昇を引き起こす。

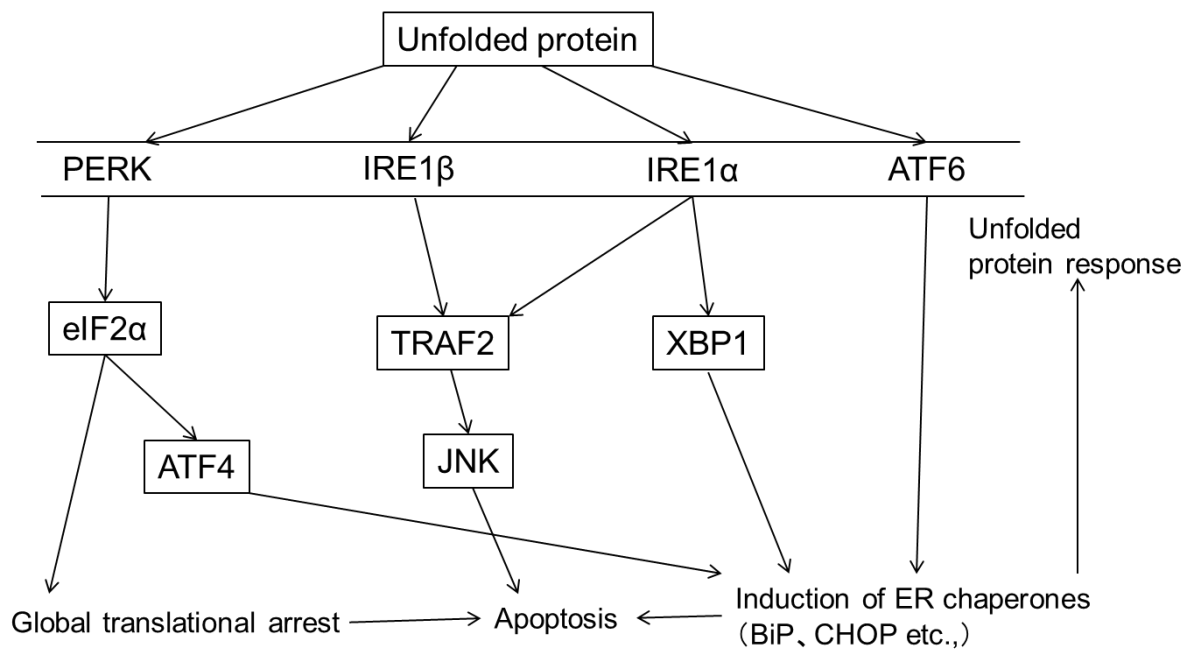


Figure 4. ER ストレスのシグナル伝達経路

虚血や酸化ストレスなど様々な要因によって生じた変性蛋白質は膜貫通型キナーゼである PERK、IRE1 β 、IRE1 α 、膜貫通型転写因子である ATF6 をそれぞれ介した応答を行う。自己リン酸化により活性化した PERK は eIF2 α をリン酸化し、その結果広範な翻訳抑制と ATF4 の翻訳活性上昇を引き起こす。ATF4 や ATF6 の標的遺伝子には BiP などの変性蛋白質に対するシャペロン遺伝子や CHOP などのアポトーシス誘導因子が含まれる。IRE1 α はストレスを感知すると自己リン酸化により転写因子 XBP1 のスプライシングを誘発し、これがシャペロン分子含む関連遺伝子群の転写を促進する。一方で IRE1 は TNF α のアダプター蛋白質として知られる TRAF2 を介して JNK 経路を活性化しアポトーシスを引き起こす。このように ER ストレス反応には生体の恒常性維持の為の様々な応答が含まれる。

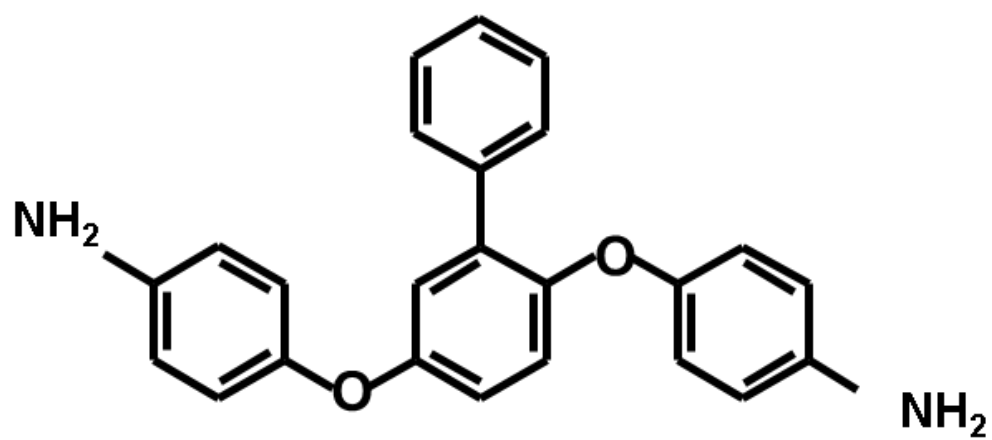


Figure 5. 2-Phenyl-APB-144 の構造式

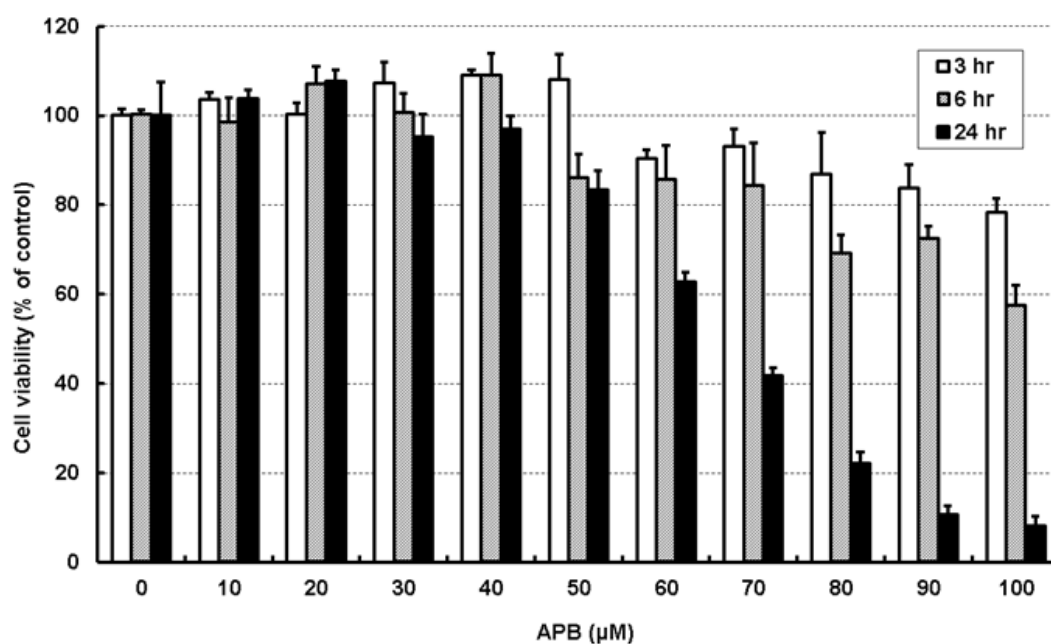


Figure 6. ARPE-19 細胞株における APB の細胞毒性（時間及び濃度依存性）

ARPE-19 細胞株を 0~100 μ M の APB に 3、6 および 24 時間処理した。各濃度、時間において APB 無処置群の生存率を 100% として WST-8 法により細胞生存率を算出した。特に 24 時間処理群において APB は 50~100 μ M の範囲で濃度依存的な細胞毒性を示した。各ポイントは 3 回の実験の平均値±標準偏差で示した。

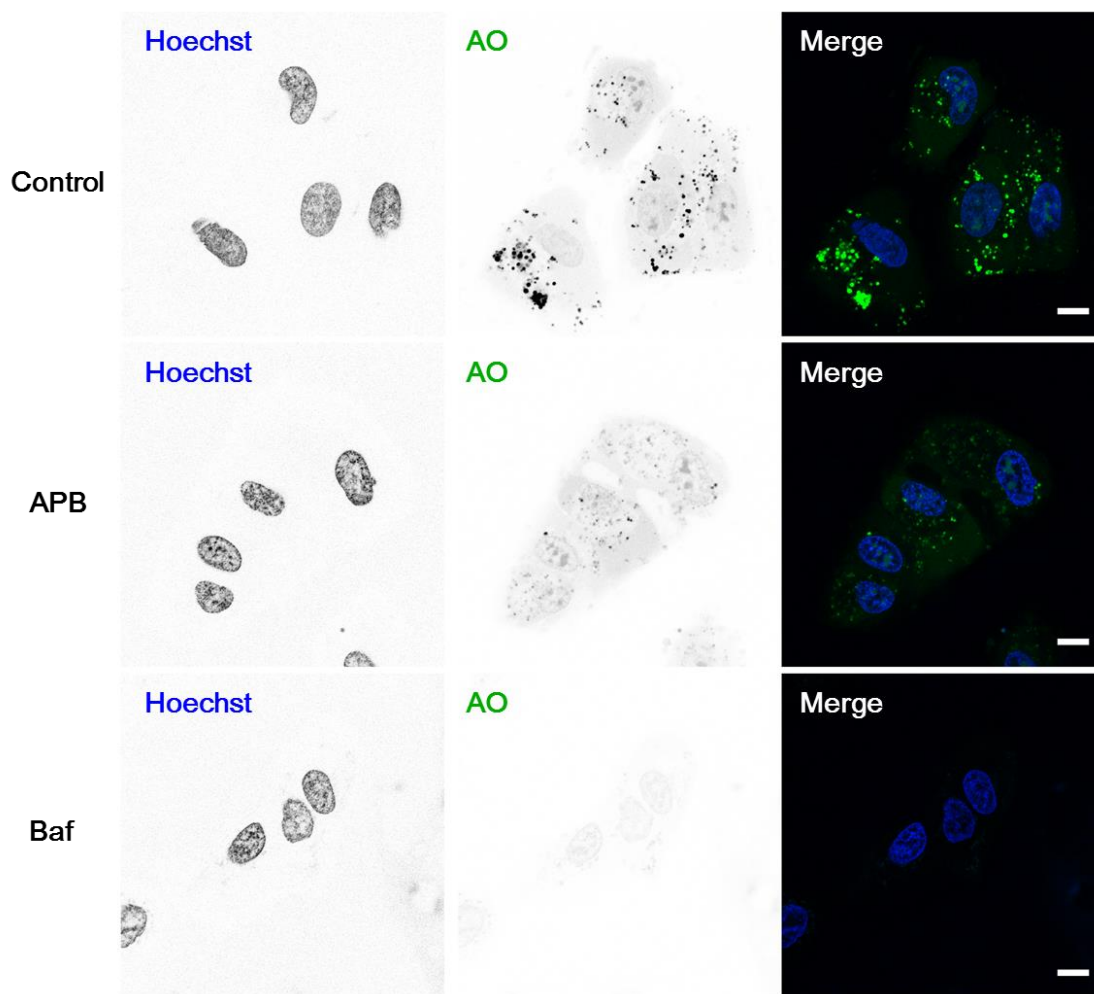


Figure 7. APB および Bafilomycin 処理 ARPE-19 細胞株におけるアクリジンオレンジ染色像

ARPE-19 細胞株を $100\ \mu\text{M}$ の APB ないしは 100 nM の Bafilomycin で 6 時間処理した後、アクリジンオレンジ (AO) にて染色し、青色光励起 (480nm) による緑色蛍光として共焦点顕微鏡下で可視化した。コントロール (無処置) 細胞において認められる緑色蛍光像が APB および Bafilomycin 処理細胞では減弱ないしは認められない (Merge)。Hoechst 33342 を核染色として用いた。Bar は $10\ \mu\text{m}$ を示す。

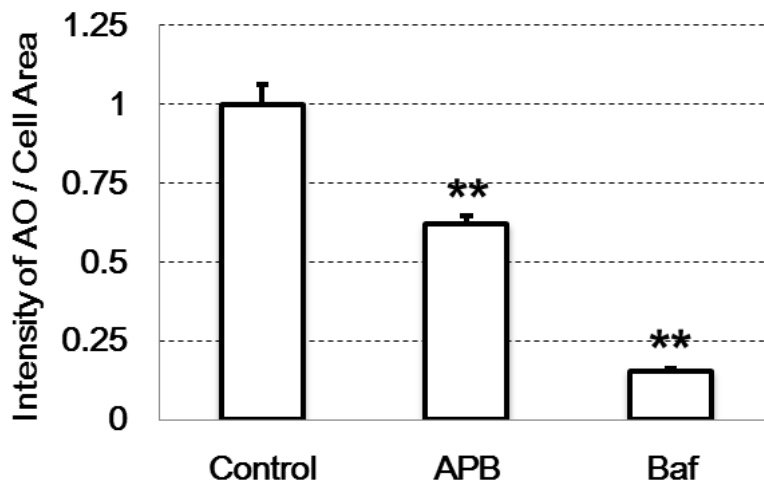


Figure 8. APB および Bafilomycin 処理 ARPE-19 細胞株におけるアクリジンオレンジ染色強度

ARPE-19 細胞株を $100\ \mu\text{M}$ の APB ないしは 100nM の Bafilomycin で 6 時間処理した後、アクリジンオレンジ (AO) にて染色し、青色光励起 (480nm) による緑色蛍光として共焦点顕微鏡下で可視化した。その後、各サンプル中 20 細胞での蛍光強度をイメージアナライザーにて測定し、細胞一つあたりの平均蛍光強度を求めた。APB および Bafilomycin 処置により、AO 染色強度は有意に低下した。** $p < 0.01$ vs. control cells (Student の t 検定)。

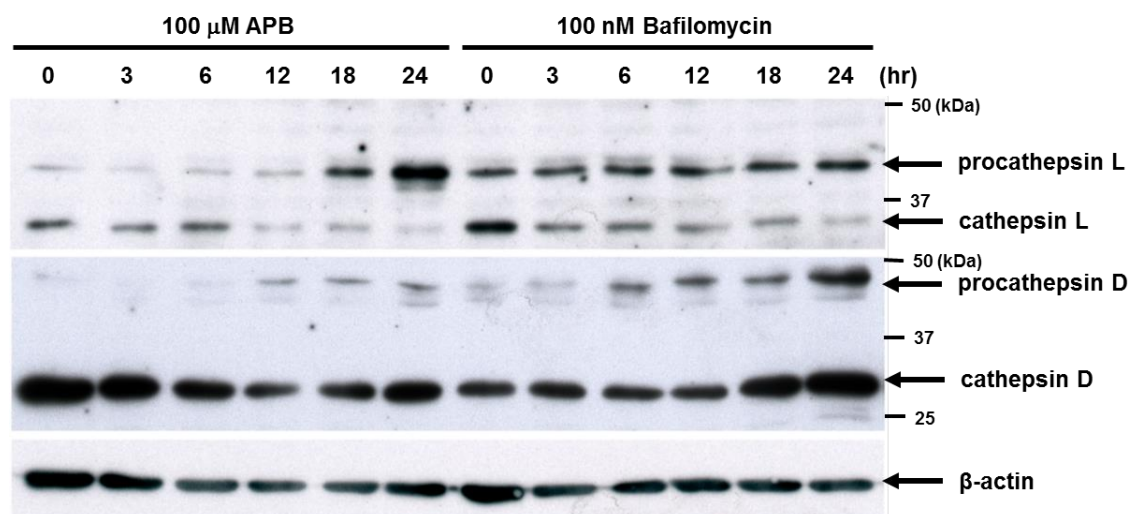


Figure 9. APB および Bafilomycin 処理 ARPE-19 細胞株におけるプロカテプシン、カテプシン D・L のウェスタンブロット解析

ARPE-19 細胞株を 100 μM の APB ないしは 100 nM の Bafilomycin で 0、3、6、12、18 および 24 時間処理した。処理した細胞より抽出した蛋白質を電気泳動により分離、PVDF 膜にブロッティングした後、抗プロカテプシン D/L ないしは抗カテプシン D/L 抗体にて検出した。プロカテプシン L は薬物処理 12 時間後より増加し始め、16、24 時間と時間依存的に増加した一方で、活性体であるカテプシン L の発現量は低下した。同様の傾向はプロカテプシン D、カテプシン D においても認められた。

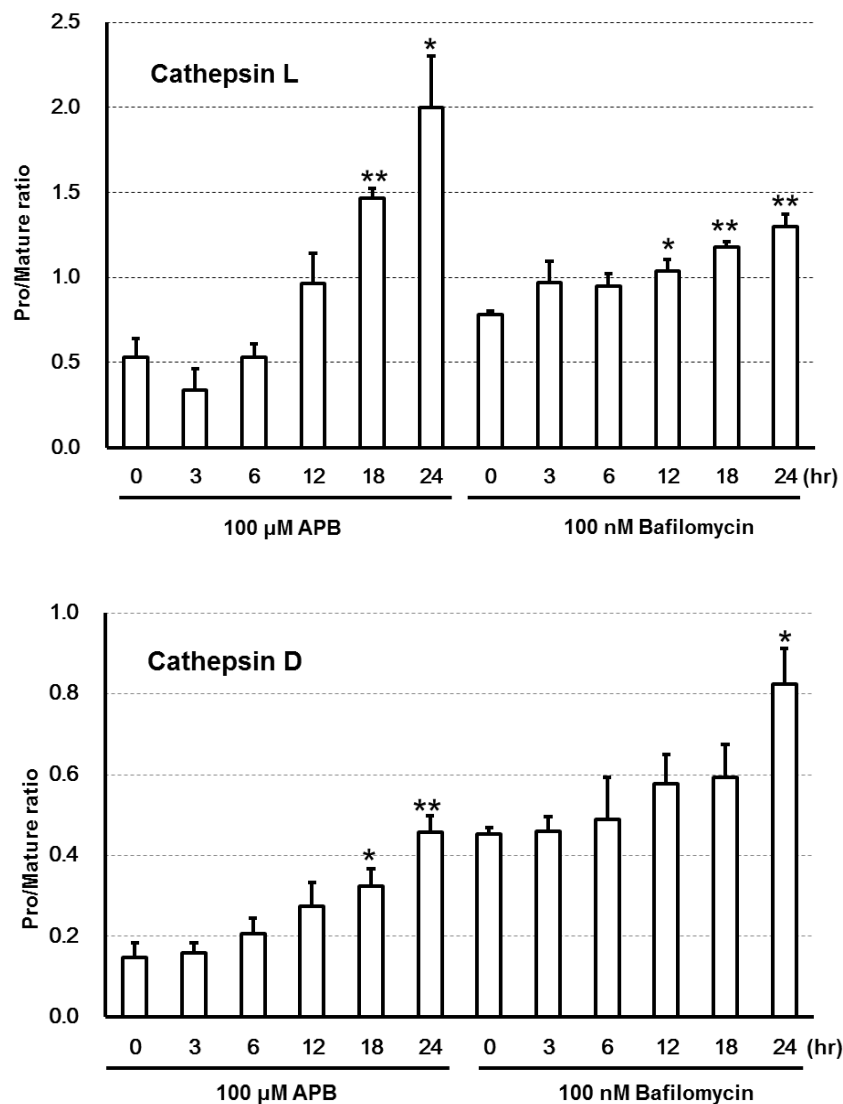


Figure 10. APB および Bafilomycin 処理 ARPE-19 細胞株におけるプロカテプシン、カテプシン D・L のウェスタンブロット定量解析

Fig.9 における泳動バンドをイメージアナライザーにて定量解析した。プロカテプシン L に対するカテプシン L の比率は APB 処置 18 および 24 時間後、Bafilomycin 処置 12、18、24 時間後にそれぞれ統計学的有意に増加した。プロカテプシン D に対するカテプシン D の比率は APB 処置 18、24 時間後、Bafilomycin 処置 24 時間後にそれぞれ有意に増加した。各群 3 例の平均値 \pm 標準誤差を示した。* p <0.05、** p <0.01 vs. 0 time value (Student の t 検定)。

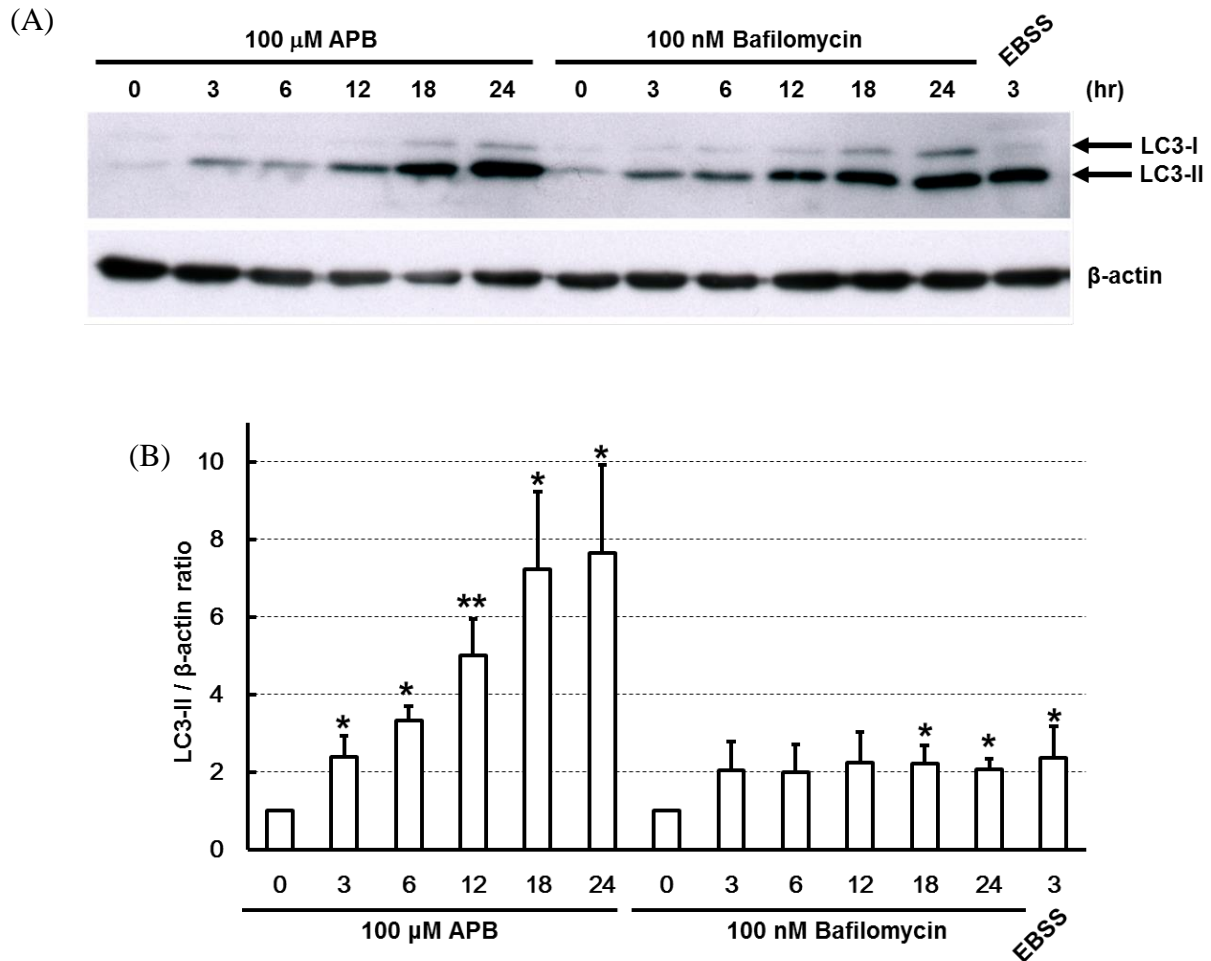


Figure 11. APB、Bafilomycin あるいは栄養飢餓処理 ARPE-19 細胞株における LC3 のウェスタンブロット解析

(A) ARPE-19 細胞株を 100 μ M の APB ないしは 100nM の Bafilomycin にて 0、3、6、12、18 および 24 時間処理した。また、栄養飢餓（EBSS 溶液）で 3 時間処理した。処理した細胞より抽出した蛋白質を電気泳動により分離、PVDF 膜にブロッティングした後、抗 LC3 抗体にて検出した。 β アクチンは陰性対照として設定した。(B) LC3-II 発現量比（ β アクチン発現量にて補正）は、APB では処置 3～24 時間後全て、Bafilomycin では処置 18、24 時間後で、それぞれ処置開始時に対して有意に増加した。EBSS 溶液処理により飢餓状態を誘発したところ、3 時間後で有意な LC3-II 発現量の増加が認められた。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ vs. 0 time value (Student の t 検定)。

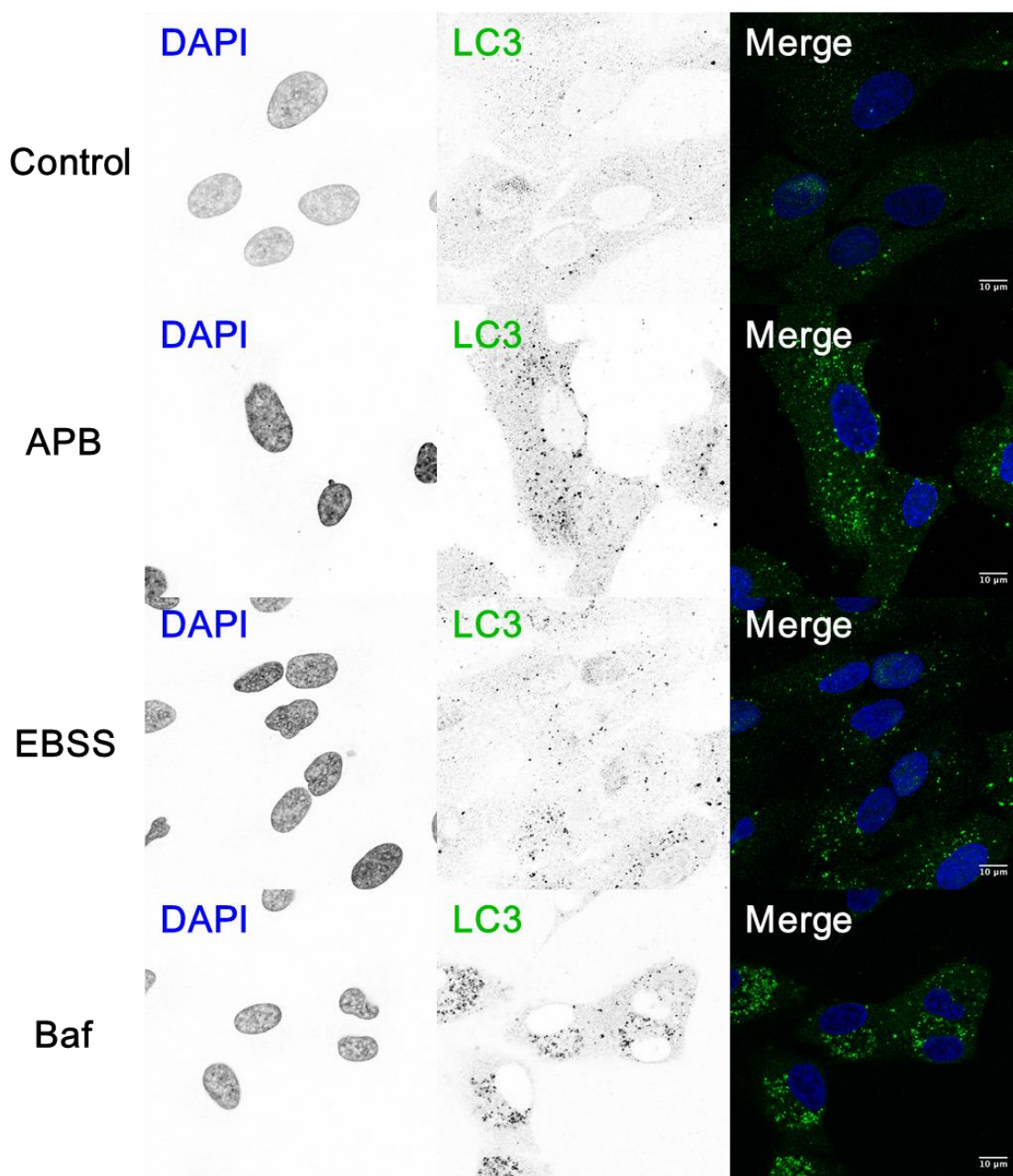


Figure 12. APB、Bafilomycin あるいは栄養飢餓（EBSS）処理 ARPE-19 細胞株における LC3 の免疫染色

ARPE-19 細胞株を $100 \mu\text{M}$ の APB、 100nM の Bafilomycin ないしは栄養飢餓状態（EBSS）にて 12 時間処理した。処理した細胞はホルマリン固定後、抗 LC3 抗体にて染色し共焦点レーザー顕微鏡下にて可視化した。抗 LC3 抗体陽性の顆粒状染色像は栄養飢餓条件および APB、Bafilomycin 処理下の細胞質において認められ、無処置細胞ではほとんど認められなかった（Merge）。DAPI を核染色として用いた。Bar は $10 \mu\text{m}$ を示す。

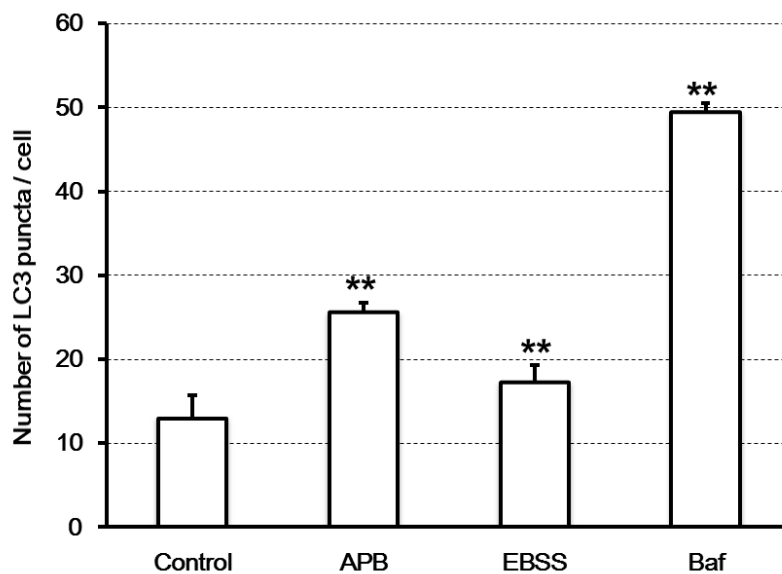


Figure 13. APB、Bafilomycin あるいは栄養飢餓 (EBSS) 処理 ARPE-19 細胞株における LC3 陽性ドット反応定量解析

Fig.12 における各サンプルよりそれぞれ細胞 50 個を無作為に選抜し、直径 $0.2\mu\text{m}$ 以上の顆粒状 LC3 陽性反応数を計測し、細胞一つあたりの平均値±標準誤差を求めた。無処置群に対して、APB、Bafilomycin あるいは EBSS 処置群では有意に多い顆粒状 LC3 陽性反応数が認められた。** $p<0.01$ vs. control (Student の t 検定)。

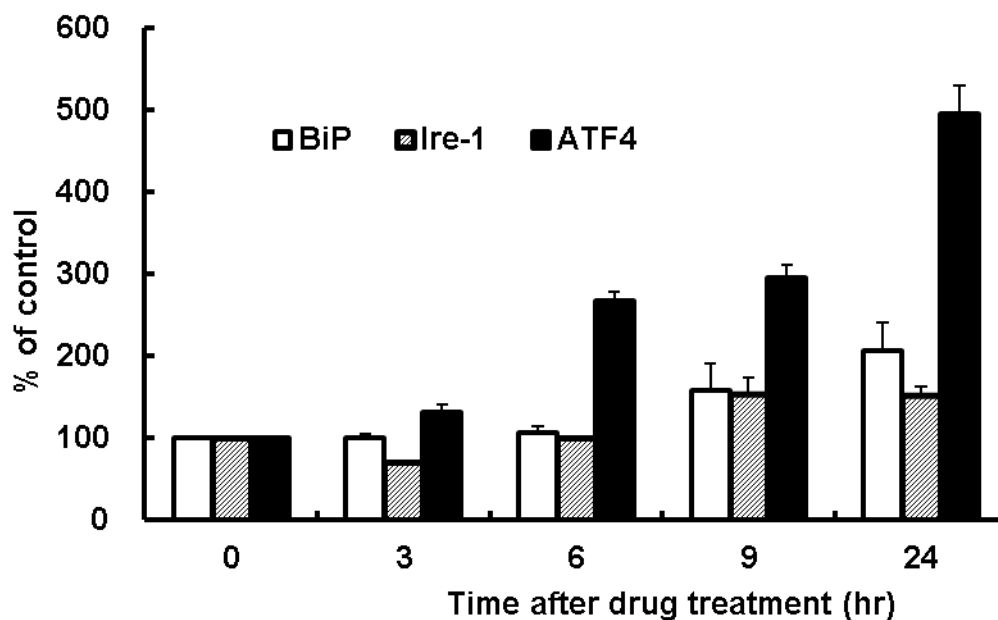


Figure 14. APB 処理 ARPE-19 細胞株におけるヒト BiP、IreI α および ATF4 のレポーターアッセイ

ARPE-19 細胞株を 100 μ M の APB にて処理し、ルシフェラーゼアッセイにて BiP、IRE1 α 、ATF4 のレポーターアッセイを行った。ATF4 の翻訳活性は時間依存的に増加した。ARPE-19 細胞株は pGL3-hBiP pro.-132 (BiP)、pTKX-ERAI-Luc (Ire1)、pCAX-hATF4(1-285)-hRL-HA (ATF4) および pRL-SV40 にてトランスフェクションさせた。トランスフェクション後、100 μ M の APB にて 0、3、6、9 および 24 処理した。データは 3 回の実験の平均値 \pm 標準偏差とし、無処置細胞の値に対する百分率変化で示した。

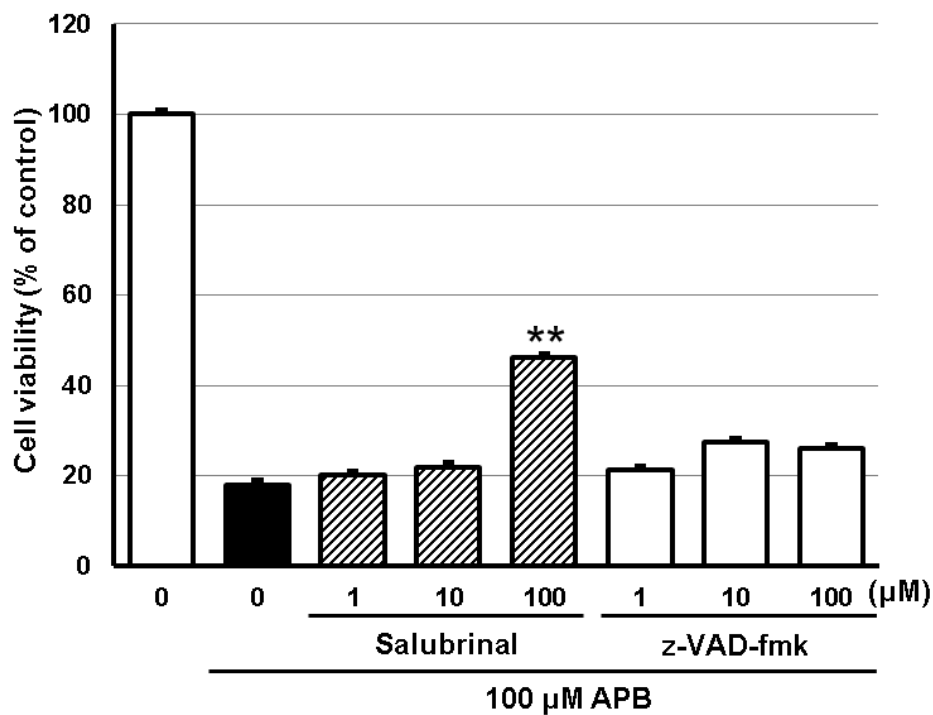


Figure 15. APB 誘発 ARPE-19 細胞死に対する Salubrinal および z-VAD-fmk の効果
 ARPE-19 細胞株を 100 μ M の APB 単独あるいは 1~100 μ M の Salubrinal、z-VAD-fmk 共存下で 24 時間処理した。APB 無処置群の生存率を 100%として WST-8 法により細胞生存率を算出した。特に 100 μ M の Salubrinal 処置群において 100 μ M APB 単独処置群と比較して有意に高い生細胞率が認められた。各ポイントは 4 回の実験の平均値 \pm 標準偏差で示した。** p <0.01 vs. vehicle (Dunnett の多重比較検定)。

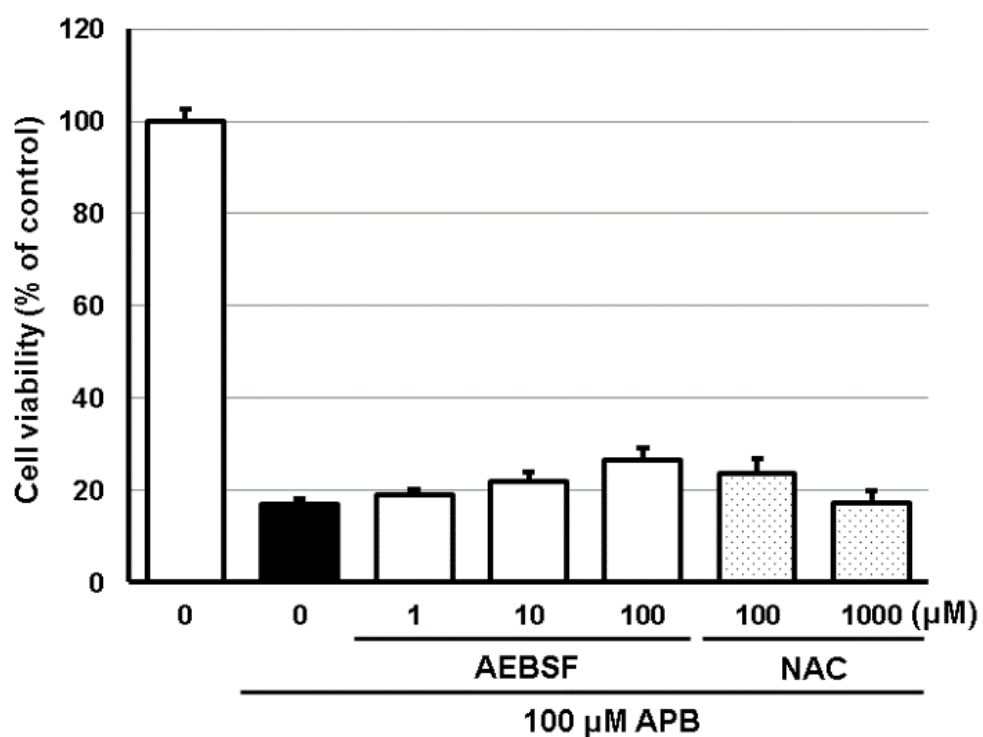


Figure 16. APB 誘発 ARPE-19 細胞死に対する AEBSF (セリンプロテアーゼ阻害剤) および NAC (抗酸化剤) の効果

ARPE-19 細胞株を 100 μ M の APB 単独あるいは 1~100 μ M の AEBSF、100 及び 1000 μ M NAC 共存下で 24 時間処理した。APB 無処置群の生存率を 100% として WST-8 法により細胞生存率を算出した。何れの薬剤処置群においても 100 μ M APB 単独処置群と比較して統計学的に有意な生細胞率の差異は認められなかった。各ポイントは 4 回の実験の平均値 \pm 標準偏差で示した。

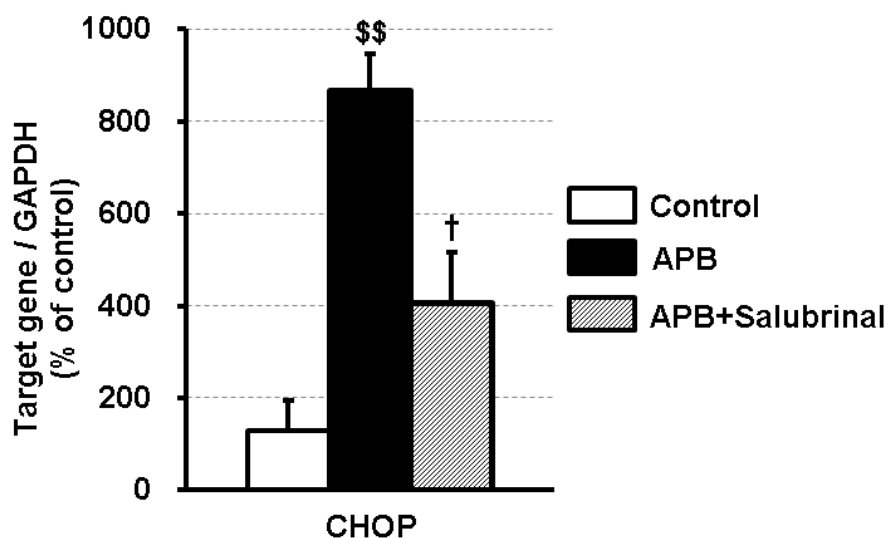


Figure 17. APB 処理 ARPE-19 細胞における CHOP mRNA 発現に対する Salubrinol の効果

ARPE-19 細胞株を無処置、100 μ M の APB 単独あるいは 100 μ M の Salubrinol 共存下で 24 時間処理した。Salubrinol 処理により APB 単独処置と比較して有意な CHOP mRNA 発現量の低下が認められた。細胞は各処理終了後、トータル RNA を抽出しヒト CHOP 配列に対応するプライマーを用いて PCR を実施し、 $\Delta\Delta$ CT 法を用いて定量化した。各値は GAPDH 発現量にて補正した。各ポイントは 3 ないしは 4 回の実験の平均値 \pm 標準偏差で示した。\$\$ p <0.01 vs. control cells、† p <0.05 vs. vehicle (APB 処理のみ) (Student の t 検定)。

Test Article	Normal	Vehicle	APB		
Dose (mg/kg)	-	0	20	40	80
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	7.22 \pm 0.13	7.10 \pm 0.28	7.02 \pm 0.28	7.14 \pm 0.38	7.36 \pm 0.21
Hgb (g/dL)	13.5 \pm 0.3	13.7 \pm 0.8	13.2 \pm 0.5	13.6 \pm 0.7	13.6 \pm 0.7
Hct (%)	39.5 \pm 1.0	39.4 \pm 2.5	39.0 \pm 1.8	39.4 \pm 1.8	40.6 \pm 1.1
MCV (fL)	54.7 \pm 0.3	55.6 \pm 1.4	55.6 \pm 0.5	55.2 \pm 0.5	55.2 \pm 0.9
MCH (pg)	18.7 \pm 0.2	19.2 \pm 0.4	18.8 \pm 0.1	19.0 \pm 0.1	18.5 \pm 0.4
MCHC (g/dL)	34.2 \pm 0.3	34.6 \pm 0.3	33.9 \pm 0.5	34.4 \pm 0.3	33.5 \pm 1.3
Retic (%)	4.2 \pm 0.6	4.8 \pm 0.5	4.9 \pm 0.3	4.5 \pm 0.7	2.7 \pm 0.4
Retic ($10^3/\text{mm}^3$)	304.6 \pm 36.1	340.7 \pm 35.4	345.5 \pm 18.5	317.6 \pm 43.4	197.4 \pm 30.5 ^{##}
PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	992 \pm 77	968 \pm 72	961 \pm 49	958 \pm 37	828 \pm 122
PT (sec.)	10.1 \pm 0.2	9.9 \pm 0.3	9.9 \pm 0.4	10.0 \pm 0.2	9.7 \pm 0.1
APTT (sec.)	16.4 \pm 0.7	16.9 \pm 1.0	17.7 \pm 1.0	17.9 \pm 0.2	18.1 \pm 0.5
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	14.09 \pm 1.86	13.54 \pm 2.00	12.73 \pm 2.03	13.01 \pm 1.67	13.81 \pm 3.16
Neut (%)	6.5 \pm 1.7	6.2 \pm 2.5	8.8 \pm 4.1	7.6 \pm 1.0	13.8 \pm 2.2
Lymp (%)	91.5 \pm 2.0	91.6 \pm 3.2	88.6 \pm 4.6	89.1 \pm 1.5	80.2 \pm 3.6
Mono (%)	1.2 \pm 0.4	1.5 \pm 0.8	1.9 \pm 0.4	2.3 \pm 0.3	4.6 \pm 1.1
Eos (%)	0.4 \pm 0.3	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	0.6 \pm 0.3
Baso (%)	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
LUC (%)	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.2	0.7 \pm 0.3
Neut ($10^3/\text{mm}^3$)	0.94 \pm 0.35	0.88 \pm 0.50	1.08 \pm 0.39	0.99 \pm 0.19	1.90 \pm 0.51 [#]
Lymp ($10^3/\text{mm}^3$)	12.86 \pm 1.59	12.36 \pm 1.36	11.32 \pm 2.16	11.58 \pm 1.41	11.04 \pm 2.47
Mono ($10^3/\text{mm}^3$)	0.16 \pm 0.06	0.21 \pm 0.14	0.24 \pm 0.06	0.30 \pm 0.06	0.64 \pm 0.25 ^{##}
Eos ($10^3/\text{mm}^3$)	0.06 \pm 0.04	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.07 \pm 0.03	0.09 \pm 0.06
Baso ($10^3/\text{mm}^3$)	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.02
LUC ($10^3/\text{mm}^3$)	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.03	0.10 \pm 0.05

Table 1. APB 経口投与時のラット血液学的検査結果

0、20、40、80 mg/kg の APB を BN ラット に経口投与し、4 日後に血液採取し血液学的検査パラメータを測定した。40 mg/kg 以下の用量において、APB は血液学的パラメータに統計学的有意な影響を与えなかった。実験はラット 4 例における平均値 \pm 標準誤差で示した。# $p<0.05$, ## $p<0.01$ vs. vehicle (Dunnett の多重比較検定)。各検査パラメータの略称並びに検査法は Table 2 に示した。

Parameter	Unit	Method
Red blood cell count (RBC)	$10^6/\text{mm}^3$	Dual angle laser flow-cytometric measurement
Hemoglobin concentration	g/dL	Modified cyanmethemoglobin method
Hematocrit value	%	Calculation: $(\text{MCV} \times \text{RBC count}) / 10$
Mean Corpuscular Volume (MCV)	fL	Dual angle laser flow-cytometric measurement
Mean corpuscular hemoglobin (MCH)	pg	Calculation: $(\text{hemoglobin concentration} / \text{RBC count}) \times 10$
Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)	g/dL	Calculation: $[\text{hemoglobin concentration} / (\text{RBC count} \times \text{MCV})] \times 1000$
Reticulocyte (Retic)	$10^3/\text{mm}^3$	Calculation: $[\text{RBC count} \times (\text{Retic} / 100) \times 1000]$
Reticulocyte ratio (Retic)	%	Laser flow-cytometric measurement with RNA stain
Platelet count (PLT)	$10^3/\text{mm}^3$	Dual angle laser flow-cytometric measurement
White blood cell (WBC)	$10^3/\text{mm}^3$	Dual angle laser flow-cytometric measurement
Differential leukocytes (Neut, Lymph, Mono, Eos, Baso, LUC)*	$10^3/\text{mm}^3$ %	Flow-cytometric measurement with peroxidase stain and dual angle laser flow-cytometric measurement
Prothrombin time (PT)	Sec.	Prothrombin time 1 stage test
Activated partial thromboplastin time (APTT)	Sec.	Elaidic acid test

*Neut: neutrophils, Lymph: lymphocytes, Mono: monocytes, Eos: eosinophils, Baso: basophils, LUC: large unstained cells

Table 2. 血液学的検査パラメータおよび方法

Test Article	Normal	Vehicle	APB		
Dose (mg/kg)	-	0	20	40	80
AST (U/L)	152.2±19.5	115.0±8.3*	127.7±28.4	116.4±1.3	155.3±29.5
ALT (U/L)	39.1±8.1	35.4±8.8	39.7±15.4	33.9±2.8	51.6±19.8
γ -GTP (U/L)	5.78±0.64	4.88±1.31	5.90±0.95	5.64±0.89	6.37±1.61
ALP (U/L)	803±95	871±61	842±116	901±55	849±205
ChE (U/L)	49.5±3.7	52.6±2.9	49.8±4.5	53.1±2.7	46.6±7.5
T-BIL (mg/dL)	0.07±0.02	0.07±0.01	0.07±0.01	0.06±0.01	0.07±0.02
T-CHO (mg/dL)	70.6±1.1	65.3±1.5**	67.2±3.2	62.4±3.7	66.8±2.2
TRIG (mg/dL)	60.9±10.1	54.7±20.3	58.4±12.8	35.6±6.4	45.1±9.7
PL (mg/dL)	117.4±4.6	111.4±5.7	111.8±3.2	101.5±3.7	105.0±7.3
TP (g/dL)	4.99±0.35	5.08±0.11	5.02±0.17	5.22±0.12	4.92±0.45
ALB (g/dL)	2.49±0.15	2.54±0.08	2.48±0.18	2.56±0.03	2.23±0.21
A/G	1.00±0.02	1.00±0.03	0.98±0.08	0.96±0.02	0.83±0.03 ^{##}
GLU (mg/dL)	223.6±23.8	212.3±18.3	202.0±35.5	225.3±32.2	214.7±36.4
BUN (mg/dL)	21.4±0.8	20.8±1.6	20.4±1.9	19.8±0.6	18.5±1.1
CREAT (mg/dL)	0.28±0.01	0.28±0.02	0.28±0.01	0.28±0.02	0.31±0.02
UA (mg/dL)	0.97±0.08	1.26±0.78	0.95±0.18	0.94±0.09	0.94±0.10
INORG.P (mg/dL)	7.65±0.44	7.52±0.54	7.58±0.13	8.65±0.71	7.85±0.89
Ca (mg/dL)	9.09±0.13	9.40±0.34	9.28±0.29	9.31±0.13	9.13±0.44
Na (mEq/L)	138.8±0.2	140.6±0.7**	140.0±0.5	139.9±0.3	139.9±0.5
K (mEq/L)	4.65±0.07	4.22±0.32	4.68±0.54	4.19±0.15	4.37±0.31
Cl (mEq/L)	102.5±0.7	103.7±0.8	104.7±1.2	103.4±0.5	105.0±1.5

Table 3. APB 経口投与時のラット血液生化学検査結果

0、20、40、80 mg/kg の APB を BN ラット に経口投与し、4 日後に血液採取し血液生化学検査パラメータを測定した。40 mg/kg 以下の用量において、APB は非投与群と比較してパラメータに統計学的有意な影響を与えなかった。実験はラット 4 例における平均値±標準誤差で示した。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs normal (Student の t 検定)。## $p<0.01$ vs. vehicle (Dunnett の多重比較検定)。

Parameter	Unit	Method
Aspartate aminotransferase (AST)	U/L	JSCC ^{a)} transferable method
Alanine aminotransferase (ALT)	U/L	JSCC transferable method
γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP)	U/L	JSCC transferable method
Alkaline phosphatase (ALP)	U/L	JSCC transferable method
Cholinesterase (ChE)	U/L	Butyrylthiocholine iodide method
Total bilirubin (T-BIL)	mg/dL	Diazo method
Total cholesterol (T-CHO)	mg/dL	COD ^{b)} · HMMPS ^{c)} method
Triglycerides (TRIG)	mg/dL	GPO ^{d)} · HMMPS method, glycerol blanking method
Phospholipids (PL)	mg/dL	Choline oxidase · DAOS ^{e)} method
Total protein (TP)	g/dL	Biuret method
Albumin (ALB)	g/dL	BCG ^{f)} method
Albumin/Globulin ratio (A/G)	n/a	Calculation: [albumin/ (Total protein - albumin) × 100]
Glucose (GLU)	mg/dL	Hexokinase · G-6-PDH method
Blood urea nitrogen (BUN)	mg/dL	Urease · GIDH ^{g)} method
Creatinine (CREAT)	mg/dL	Creatininase · HMMPS method
Urea (UA)	mg/dL	Uricase · POD ^{h)} method
Inorganic phosphorus (INORG.P)	mg/dL	PNP ⁱ⁾ · XDH ^{j)} method
Calcium (Ca)	mg/dL	MXB ^{k)} method
Sodium (Na)	mEq/L	Electrode method
Potassium (K)	mEq/L	Electrode method
Chloride (Cl)	mEq/L	Electrode method

- a) Japan Society of Clinical Chemistry
- b) Cholesterol oxidase
- c) N-(3-Sulfopropyl)-3-methoxy-5-methylaniline
- d) Glycerol-3-phosphate oxidase
- e) N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5,-dimethoxyaniline
- f) Bromocresol green
- g) Glutamate dehydrogenase
- h) Peroxidase
- i) Purine Nucleoside Phosphorylase
- j) Xanthine dehydrogenase
- k) Methylxyleneol Blue

Table 4. 血液生化学検査パラメータおよび方法

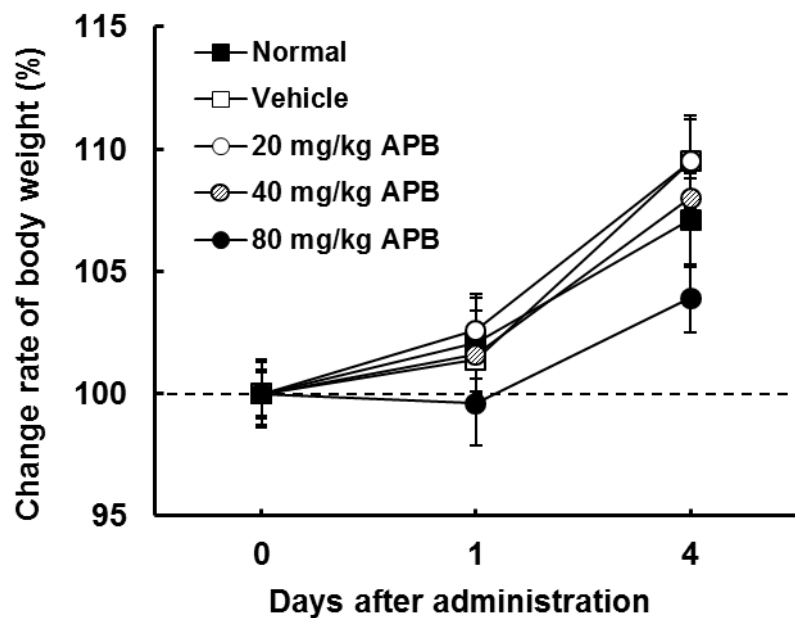


Figure 18. APB 経口投与によるラットの体重変化

0、20、40、80 mg/kg の APB を BN ラット に経口投与して 0、1、4 日後に其々体重を測定した。無処置群も同様に測定を行った。投与時 (0) の体重を 100% として、各群 4 例のラットにおける百分率変化で示した。何れの測定ポイントにおいても全群間で統計学的に有意な変化は認められなかった。

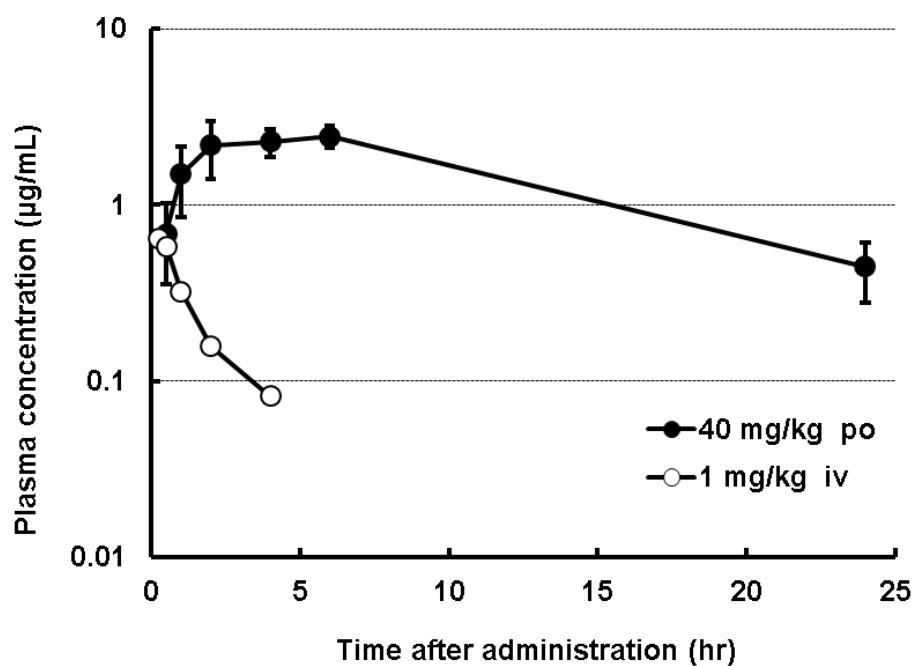


Figure 19. APB 経口投与後のラット血漿中 APB 濃度の推移

40 mg/kg の APB を BN ラット に単回経口投与 (po)、あるいは 1 mg/kg を単回静脈内投与 (iv) して各測定ポイントにおいて採血を行い血漿中 APB 濃度を測定した。経口投与群はラット 4 例における平均値±標準誤差、静脈内投与群は 2 例の平均値で示した。

Dose	Cmax ($\mu\text{g/mL}$)	Tmax (hr)	T1/2 (hr)	AUClast ($\text{hr}\cdot\mu\text{g/mL}$)	AUCinf ($\text{hr}\cdot\mu\text{g/mL}$)	F (%)
40 mg/kg (p.o.)	2.68 ± 0.08	4.00 ± 2.3	7.70 ± 2.2	37.87 ± 3.00	43.19 ± 4.43	88.3 ± 9.0
1 mg/kg (i.v.)	-	-	1.6	1.036	1.223	-

Table 5. APB 経口投与時のラット薬物動態学的パラメータ

40 mg/kg の APB 経口投与群はラット 4 例における平均値 \pm 標準誤差、1 mg/kg の APB 静脈内投与群は 2 例の平均値で示した。

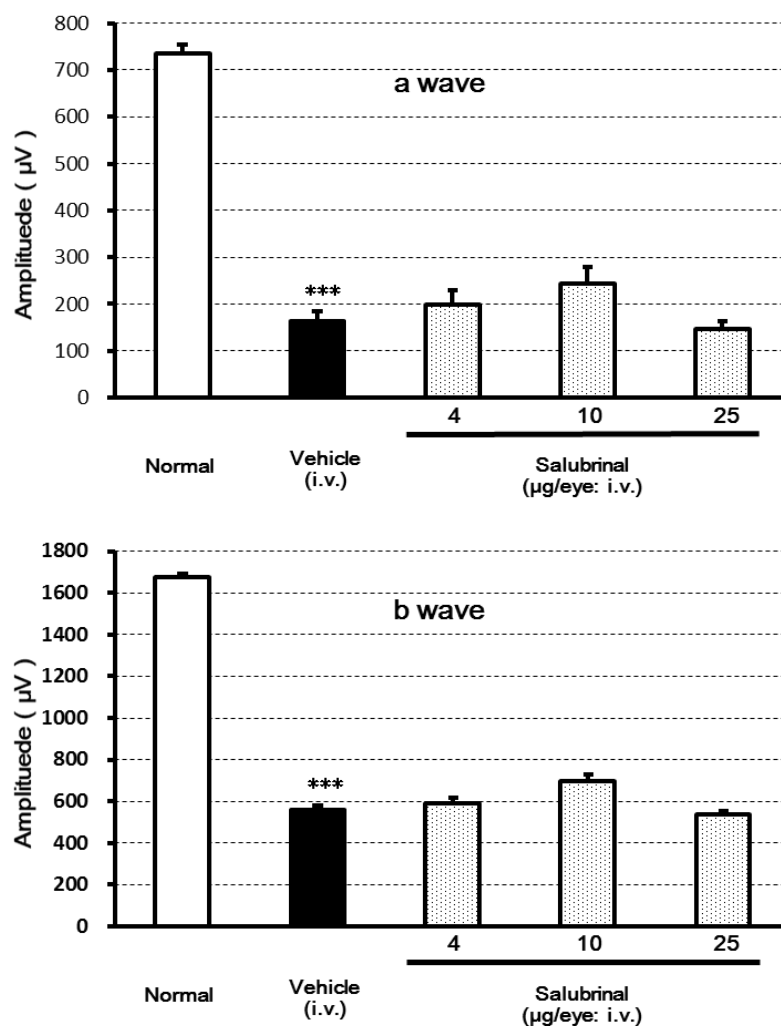


Figure 20. APB 誘発ラット網膜症における網膜電位図振幅値に対する Salubrinal 硝子体内投与の効果

40 mg/kg の APB を BN ラット に単回経口投与後、4、10、25 μ g/eye の Salubrinal ないしは基剤を単回硝子体内投与した。投与 7 日後に網膜電位図を測定し、a 波および b 波振幅値を得た。Salubrinal は基剤に比して統計学的に有意に a 波および b 波振幅値の減弱を抑制しなかった。

値はラット 4 例 8 眼における平均値±標準誤差で示した。

*** $p < 0.01$ vs. normal rats (Student の t 検定)。

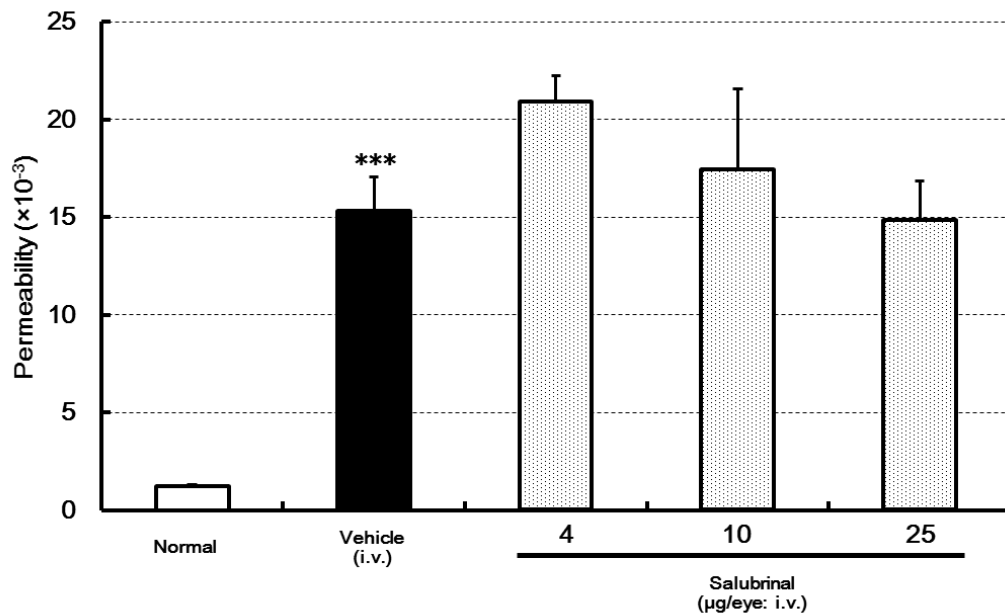


Figure 21. APB 誘発ラット網膜症における網膜透過性に対する Salubrinal 硝子体内投与の効果

40 mg/kg の APB を BN ラット に単回経口投与後、4、10、25 μ g/eye の Salubrinal ないしは基剤を単回硝子体内投与した。投与 8 日後にフルオレセインナトリウム溶液を静脈内投与し、硝子体フルオロフォトメトリー法を用いて硝子体内フルオレセイン漏出量を測定した。Salubrinal は基剤に比して統計学的に有意に硝子体内フルオレセイン漏出を抑制しなかった。

値はラット 4 例 8 眼における平均値 \pm 標準誤差で示した。

*** $p < 0.01$ vs. normal rats (Student の t 検定)。

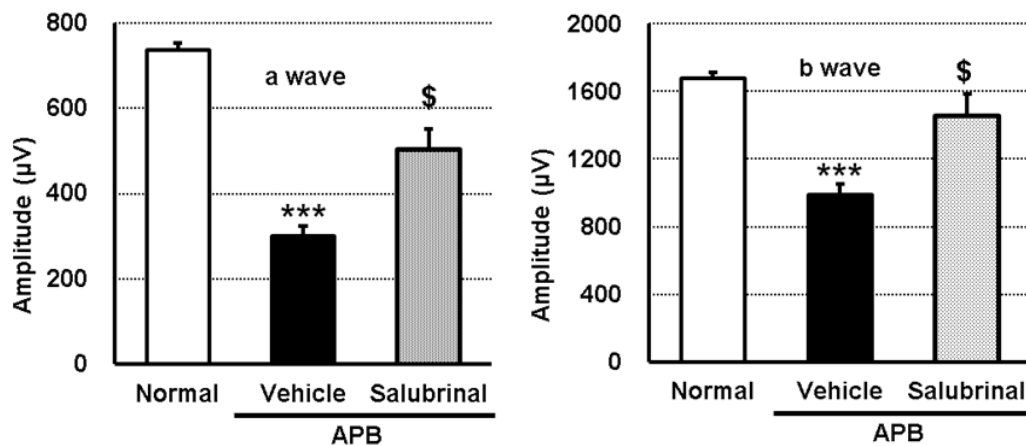


Figure 22. APB 誘発ラット網膜症における網膜電位図振幅値対する Salubrinal の効果

40 mg/kg の APB を BN ラット に単回経口投与後、2 mg/kg の Salubrinal ないしは基剤を 1 日 1 回 8 日間反復腹腔内投与した。投与 7 日後に網膜電位図を測定し、a 波および b 波振幅値を得た。Salubrinal は基剤に比して統計学的に有意に a 波および b 波振幅値の減弱を抑制した。

値はラット 4 例 8 眼における平均値±標準誤差で示した。

\$ $p < 0.05$ vs. vehicle-treated rats、*** $p < 0.01$ vs. normal rats (Student の t 検定)。

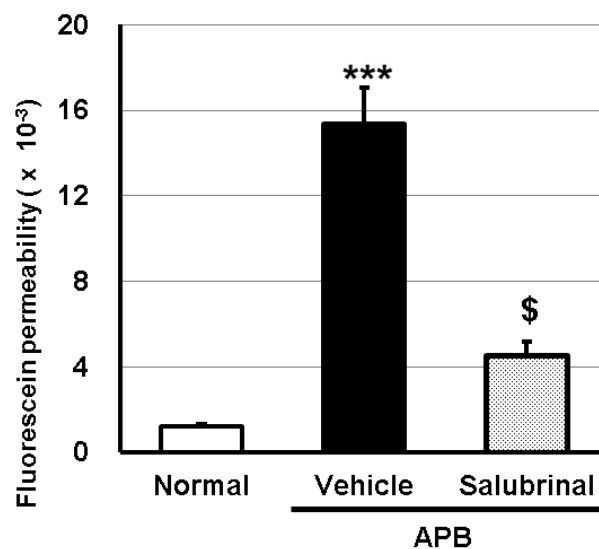


Figure 23. APB 誘発ラット網膜症における網膜透過性に対する Salubrinal の効果

40 mg/kg の APB をラット に単回経口投与後、2 mg/kg の Salubrinal ないしは基剤を 1 日 1 回 8 日間反復腹腔内投与した。投与 8 日後にフルオレセインナトリウム溶液を静脈内投与し、硝子体フルオロフォトメトリー法を用いて硝子体内フルオレセイン漏出量を測定した。Salubrinal は基剤に比して統計学的に有意に硝子体内フルオレセイン漏出を抑制した。

値はラット 4 例 8 眼における平均値±標準誤差で示した。

\$ $p < 0.05$ vs. vehicle-treated rats、*** $p < 0.01$ vs. normal rats (Student の t 検定)。

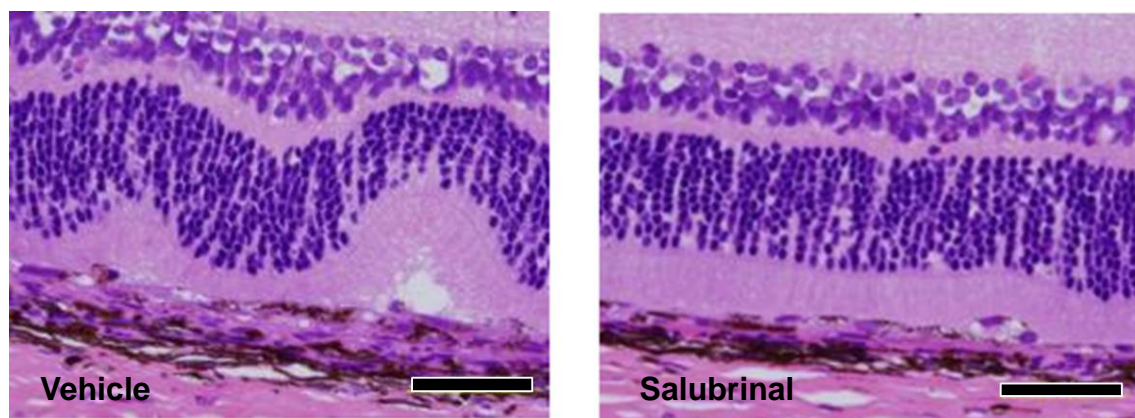


Figure 24. APB 誘発ラット網膜症における網膜病理変化に対する Salubrinal の効果
 40 mg/kg の APB をラット に単回経口投与後、2 mg/kg の Salubrinal ないしは基剤を 1 日 1 回 8 日間反復腹腔内投与した。投与 7 日後に眼球を採取し、定法に従い顕微鏡標本を作製し、HE 染色を施し光学顕微鏡下で可視化した。Salubrinal は基剤に比して RPE の変性および視細胞外節の異常を抑制している。Bar は 50 μ m を示す。

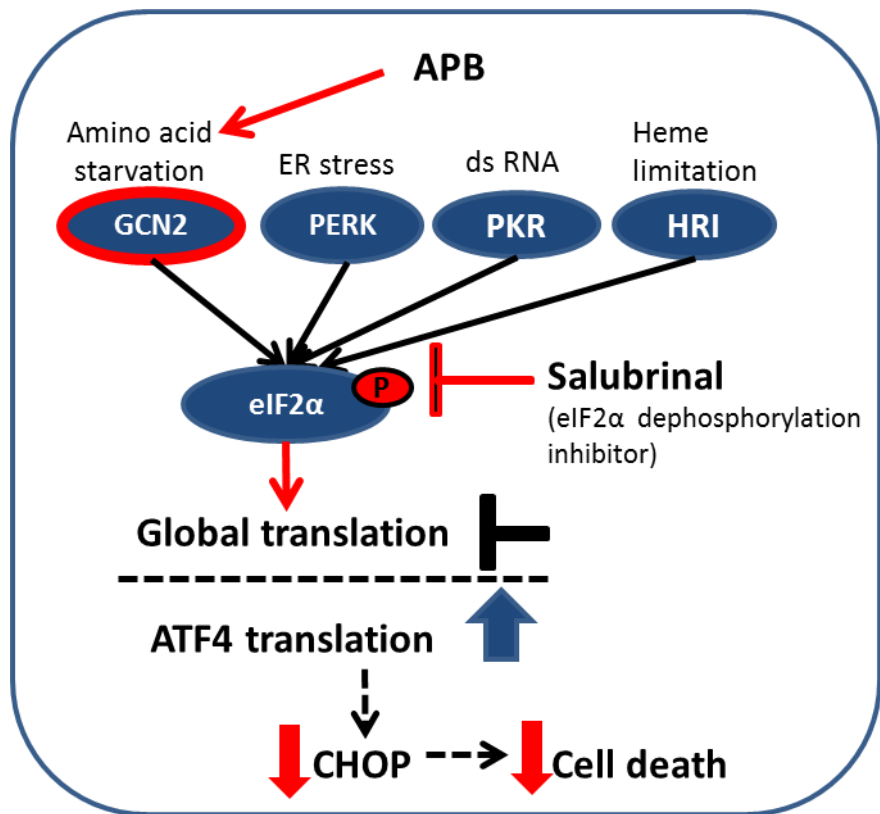


Figure 25. APB 処理 による ARPE-19 細胞死のシグナル伝達経路とそれに対する Salubrinal の効果

APB 処理によりアミノ酸飢餓が誘発され、GCN2 および eIF2 α 経路が活性化し、ATF4 の翻訳活性、CHOP の誘導により細胞死が引き起こされることが考えられる。一方で、同経路を eIF2 α 脱リン酸化阻害により活性化させる Salubrinal は細胞死を抑制する。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご親切なご指導、ご鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学の河野憲二教授並びに動物細胞工学研究室の皆様、動物遺伝子機能学研究室の川市正史教授、分子情報薬理学研究室の伊東広教授に謹んで感謝いたします。

本研究に携わる機会を与えてくださいました参天製薬株式会社、黒川明社長、西畑利明特別顧問、笹野稔リウマチ研究開発センター長（現あゆみ製薬株式会社）、中村雅胤グローバル疾患領域戦略統括部長、西岡和幸欧州研究開発代表、宮脇宣明バイオメトリックス室長に心より感謝いたします。また、本研究の遂行に格別のご支援、ご協力を賜りました、京都大学大学院理学研究科・森和俊教授、群馬大学先端科学研究指導者育成ユニット・岩脇隆夫博士、群馬大学生体調節研究所・及川大輔博士、奈良先端科学技術大学院大学・動物細胞工学研究室の中村大祐博士（現ニプロ株式会社）、小松朋子博士、保田裕貴氏、参天製薬株式会社・倉島宏明博士、勝田修博士、榎本浩志博士、細井一弘氏、巾下（小幡）紗代氏、市川沙奈英氏に厚く御礼申し上げます（以下、各実験に対するご支援を記します）。

- APB 合成：榎本浩志博士
- ARPE-19 細胞死アッセイ、APB 誘発細胞死に対する各種薬剤の効果、APB 薬物動態：巾下（小幡）紗代氏
- ARPE-19 細胞内小器官 pH 測定、カテプシン及び LC3 ウェスタンブロッティング、LC3 免疫染色：倉島宏明博士、中村大祐博士、小松朋子博士、保田裕貴氏
- レポータージーンアッセイ：森和俊教授（pGL3-hBiP pro.-132 プラスミドご提供）、岩脇隆夫博士（pTKX-ERAI-Luc プラスミドご提供）、及川大輔博士（pCAX-hATF4(1-285)-hRL-HA プラスミドご提供）、倉島宏明博士（アッセイ）
- APB 血液学・血液生化学検査：細井一弘氏
- APB 誘発ラット網膜症モデルを用いた実験：巾下（小幡）紗代氏、市川沙奈英氏、勝田修博士

参考文献

- Algvere PV, Seregard S. 2002. Age-related maculopathy: pathogenetic features and new treatment modalities. *Acta Ophthalmol Scand.* 80:136–143.
- Bergmann M, Schütt F, Holtz F.G., Kopitz J. 2004. Inhibition of ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB J.* 18:562-564.
- Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J. 2005. A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science.* 307:935–939.
- Deguchi J, Yamamoto A, Yoshimori T, Sugasawa K, Moriyama Y, Futai M, Suzuki T, Kato K, Uyama M, Tashiro Y. 1994. Acidification of phagosomes and degradation of rod outer segments in rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35:568–579.
- Furuchi T, Akikawa K, Arai H, Inoue K. 1993. Bafilomycin A₁, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase, blocks lysosomal cholesterol trafficking in macrophages. *J Biol Chem.* 36:27345–27348.
- Goodwin LG, Richards WH, Udall V. 1957. The toxicity of diaminodiphenoxyalkanes. *Brit J Pharmacol Chemother.* 12:468–474.
- Hashizume, K, Hirasawa, M, Imamura, Y, Noda S, Shimizu T, Shinoda K, Kurihara T, Noda K, Ozawa Y, Ishida S, Miyake Y, Shirasawa T, Tsubota K. 2008. Retinal dysfunction and progressive retinal cell death in SOD1-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 172:1325–1331.
- Hetz C. 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:89–102.
- Ishiko S, Yoshida A, Kitaya N, Abiko T, Mori F, Kado M, Takahashi M, Saito K. 1996. Fluorophotometry with a small animal adapter. *Jpn J Ophthalmol.* 40:310–316.
- Iwawaki T, Akai R, Yamanaka S, Kohno K. 2009. Function of IRE1 α in the placenta is essential

for placental development and embryonic viability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:16657–16662.

Kaarniranta K. 2010. Autophagy – hot topic in AMD. *Acta Ophthalmol*. 88:387–388.

Kaarniranta K, Sinha D, Blasiak J, Kauppinen A, Veréb Z, Salminen A, Boulton ME, Petrovski G. 2013. Autophagy and heterophagy dysregulation leads to retinal pigment epithelium dysfunction and development of age-related macular degeneration. *Autophagy*. 9:973-984.

Kilberg MS, Shan J, Su N. 2009. ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol Metab*. 20:436–443.

Krohne TU, Stratmann NK, Kopitz J, Holz FG. 2010. Effects of lipid peroxidation products on lipofuscinogenesis and autophagy in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*. 90:465–471.

Lee KP, Valentine R. 1990. Retinotoxicity of 1,4-bis (4-aminophenoxy)-2-phenylbenzene (2-phenyl-APB-144) in albino and pigmented rats. *Arch Toxicol*. 64:135–142.

Lee KP, Valentine R. 1991. Pathogenesis and reversibility of retinopathy induced by 1,4-bis (4-aminophenoxy)-2-phenylbenzene (2-phenyl-APB-144) in pigmented rats. *Arch Toxicol*. 65:292–303.

Mitter SK, Rao HV, Qi X, Cai J, Sugrue A, Dunn WA Jr, Grant MB, Boulton ME. 2012. Autophagy in the retina: a potential role in age-related macular degeneration. *Adv.Exp.Med.Biol*. 723:83-90.

Miyamoto N, Izumi H, Miyamoto R, Bin H, Kondo H, Tawara A, Sasaguri Y, Kohno K. 2011. Transcriptional regulation of activating transcription factor 4 under oxidative stress in retinal pigment epithelial ARPE-19/HPV-16 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 52:1226–1234.

Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 140:313–326.

Oikawa D, Kitamura A, Kinjo M, Iwawaki T. 2012. Direct association of unfolded proteins with mammalian ER stress sensor, IRE1 β . *PLoS One*. 7:e51290.

Peters S, Reinthal E, Blitgen-Heinecke P, Bartz-Schmidt KU, Schraermeyer U. 2006. Inhibition of

lysosomal degradation in retinal pigment epithelium cells induces exocytosis of phagocytic residual material at the basolateral plasma membrane. *Ophthalmic Res.* 38:83–88.

Poole B, Ohkuma S. 1981. Effect of weak base on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. *J Cell Biol.* 90:665–669.

Rakoczy PE, Zhang D, Robertson T, Barnett NL, Papadimitriou J, Constable IJ, Lai CM. 2002. Progressive age-related changes similar to age-related macular degeneration in a transgenic mouse model. *Am J Pathol.* 161:1515–1524.

Rosenthal AR, Kolb H, Bergsma D, Huxsoll D, Hopkins JL. 1978. Chloroquine retinopathy in the rhesus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 17:1158–1175.

Sorsby A, Nakajima A. 1958. Experimental degeneration of the retina. IV. Diaminodiphenoxyalkanes as inducing agents. *Brit J Ophthalmol.* 42:563–571.

Strauss O. 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 85:845–881.

Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P. 2000. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature.* 406:902–906.

Toimera T, Tahti H, Salminen L. 1995. Retinal pigment epithelium cell culture as a model for evaluation of the toxicity of tamoxifen and chloroquine. *Ophthalmic Res.* 27 Suppl 1:150–153.

Uchiyama Y, Shibata M, Koike M, Yoshimura K, Sasaki M. 2008. Autophagy-physiology and pathophysiology. *Histochem Cell Biol.* 129:407–420.

Wang AL, Lukas TJ, Yuan M, Du N, Tso MO, Neufeld AH. 2009. Autophagy, exosomes and drusen formation in age-related macular degeneration. *Autophagy.* 5:5313–564.

Wennan JL, Lu W, Reigada D, Nguyen J, Laties AM, Mitchell CH. 2008. Restoration of lysosomal pH in RPE cells from cultured human and ABCA4^{-/-} mice: pharmacologic approaches and functional recovery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49:772–780.

Yoon YH, Cho KS, Hwang JJ, Lee SJ, Choi JA, Koh JY. 2010. Induction of lysosomal dilation,

arrested autophagy, and cell death by chloroquine in cultured ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:6030–6037.

Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. 1998. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem.* 273:33741–33749.

Zhao, Z, Chen, Y, Wang, J, Sternberg P, Freeman ML, Grossniklaus HE, Cai J. 2011. Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice. *PLoS One.* 6:e19456.

論文目録

所 属 (主指導教員)	動物細胞工学講座 (河野憲二)		
氏 名	平井慎一郎	提 出	平成 27 年 8 月 9 日
学位論文の主たる部分を公表した論文 (題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)			
<ul style="list-style-type: none"> 題名 2-Phenyl-APB-144-Induced Retinal Pigment Epithelium Degeneration and its Underlying Mechanisms 全著者名 Shin-ichiro Hirai, Hiroaki Kurashima, Daisuke Nakamura, Tomoko Komatsu, Yuki Yasuda, Sayo Habashita-Obata, Sanae Ichikawa, Osamu Katsuta, Takao Iwawaki, and Kenji Kohno 公表時期 未定 (2015/7/14 付にて論文受理済) 雑誌名 Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics 巻、ページ (TBD) 			
参考論文 (題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)			