

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591936

研究課題名（和文） 網膜におけるメラトニンの神経発生制御とその分子機構の解明

研究課題名（英文） Regulation of retinal development by melatonin

研究代表者

藤枝 弘樹（FUJIEDA HIROKI）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：70280972

研究成果の概要：夜間に分泌されるホルモンであるメラトニンが網膜の発生に果たす役割を検討するために、メラトニンの作用を伝達する受容体として知られる ROR の機能を解析し、また照明環境が網膜発生へ及ぼす影響も検討した。その結果、色覚に関連する3つの遺伝子（S-opsin、M-opsin、Cone arrestin）が ROR による制御を受け、またメラトニン分泌を抑制する照明条件により神経分化に関わる脳由来神経栄養因子（BDNF）の発現が増加することが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	540,000	3,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：網膜、発生、メラトニン、ROR、転写因子、BDNF、光

1. 研究開始当初の背景

松果体ホルモンであるメラトニンは主に夜間に分泌され、光により分泌が抑制される。したがってメラトニンは外界の光情報を体内の器官に伝達することにより、生体のサーカディアンリズムや季節性繁殖リズムの制御に関わるとされている。メラトニンは松果体以外に網膜でも産生され、ドーパミンと拮抗して網膜の光感受性の日内リズムを制御すると考えられている。メラトニンはMT1とMT2の2種類のGタンパク質共役性膜受容体

を介して作用するが、近年のわれわれの研究により哺乳類網膜におけるMT1受容体の細胞局在が明らかにされ、メラトニンが網膜内で多様な神経細胞の機能を制御している可能性が示された。さらにわれわれはMT1、MT2が胎生期網膜に高い発現を示し生後は減少することを報告し、光環境がメラトニンを介して網膜発生に影響を及ぼす可能性を示した。

またレチノイン酸受容体に関連する核内オーファン受容体として発見されたRORは近年メラトニンの核内受容体として注目さ

れており、メラトニンが ROR を介して免疫能や腫瘍増殖を制御するという報告は数多い。ROR 遺伝子の自然突然変異による *Staggerer* マウスでは小脳、骨、免疫系などに発達異常を認め、ROR が中枢神経系を含む種々の組織の正常発生に不可欠な転写制御因子であることを示唆している。さらに ROR は視交叉上核において時計遺伝子 *Bmal1* の転写調節にも関わっており、概日リズム制御における重要な役割を示唆している。網膜でもその発現が報告されており、ROR が網膜の細胞分化や概日リズム制御に関与している可能性があるが、その細胞局在や機能は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究は 1) メラトニンはその核受容体 ROR を解して網膜の細胞分化および概日リズムを制御する、2) 光環境がメラトニンを介して網膜発生を制御する、という 2 つの仮説を実証し、網膜の発生および機能が光環境により制御される可能性を示すとともに、その制御機構を明らかにすることを目的とする。今回は網膜における ROR の局在と機能の解析を中心におこない、さらに光環境(連続照明刺激)が網膜の細胞分化および脳由来神経栄養因子(BDNF)発現におよぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) ROR の細胞局在を明らかにするために、発生期および成熟マウス網膜において抗 ROR 抗体と各種細胞マーカーを用いた二重蛍光免疫染色をおこない、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(2) 網膜における ROR の機能を解析するために、ROR 欠損マウス (*Staggerer*) 網膜を用いた解析をおこなった。特に錐体細胞が特異的に発現する遺伝子群の発現を免疫組織化学および Real-time PCR により検討した。

(3) ROR により S-opsin 発現が制御される機構を明らかにするため、S-opsin プロモーターにルシフェラーゼレポーターを結合したコンストラクトを HEK 細胞に導入し、プロモーターアッセイをおこなった。

(4) ROR の *in vivo* における標的遺伝子を同定するために、クロマチン免疫沈降法をおこなった。

(5) ROR の標的遺伝子を網羅的に探索するため、*Staggerer* マウス網膜の遺伝子発現をマイクロアレイ(Affymetrix 社 Gene Chip)により解析した。

(6) 光環境が網膜の神経発生に与える影響を調べるために、新生仔ラットを 3 週間連続照明下で飼育し、網膜における BDNF の発現

を免疫組織化学的に解析した。

4. 研究成果

(1) ROR の細胞局在: ROR の免疫反応は視神経細胞層、内顆粒層、外顆粒層の各層に認められ、網膜のほとんどの細胞が陽性であった。ただし外顆粒層では杆体細胞の反応は微弱であり、錐体細胞により強い反応が認められた。発生期では胎生 17 日に初めて視神経細胞に、生後 3 日には初めてアムクリン細胞と錐体細胞に反応が認められ、さらに生後 9 日には双極細胞にも反応が認められた。

(2) ROR 欠損による異常: *Staggerer* 網膜では、錐体細胞が発現する S-opsin、M-opsin、Cone arrestin の免疫反応に低下がみられたが、錐体細胞の密度には変化はみられなかった。錐体細胞に特異的に発現する遺伝子および錐体細胞の分化に関わる転写因子の発現量を Real-time PCR により定量したところ、生後 21 日の成熟網膜において *Opn1sw* (S-opsin)、*Opn1mw*(M-opsin)、*Arr3* (Cone arrestin) の 3 遺伝子に有意な低下がみられ、*Thrb2* (甲状腺ホルモン受容体 TR 2) はわずかに上昇がみられた(図 1)。また減弱した変異 *Rora* (ROR) の発現も認められた。

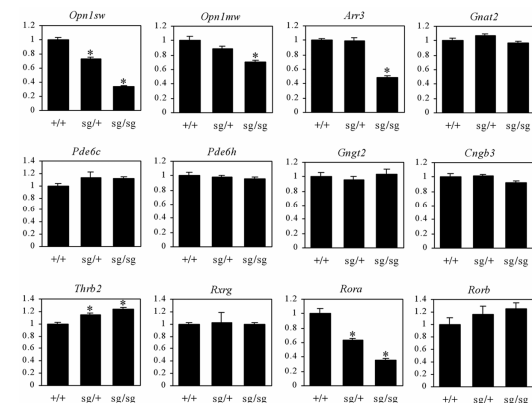


図 1

さらに *Opn1sw*、*Opn1mw*、*Arr3*、*Thrb2* の 4 遺

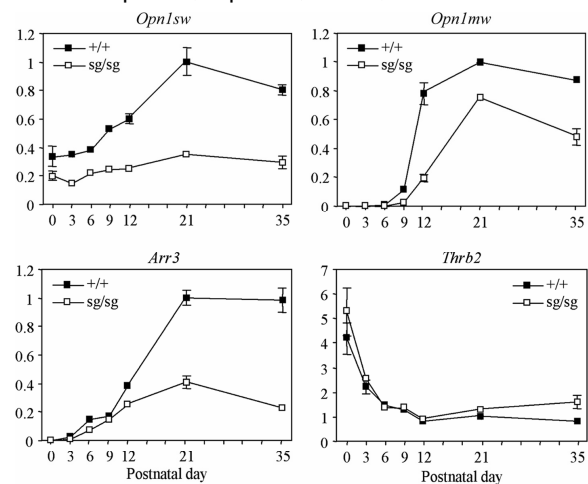


図 2

伝子について発生期における発現をみると、Opn1sw、Opn1mw、Arr3はいずれも生後3日以降に有意な低下がみられ、錐体細胞がRORを発現する時期に一致することがわかった(図2)。一方Thrb2は生後21日以降のみ増加がみられ、なんらかのフィードバックによる間接的効果であると考えられた。

(3)プロモーターアッセイ(図3):S-opsinプロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイをおこなった結果、ROR発現量に依存的にレポーターの活性化が認められた(約2~3倍)。さらに視細胞の分化に必須な転写因子であるCrxも同時に導入すると、相乗的な活性化作用がみられた(約40倍)。S-opsinプロモーターには3箇所のROR結合モチーフが存在するが、そのうち2箇所に変異を加えた結果(RE1,2-mut)RORとCrxによる活性化が顕著に減少し、またすべてのROR結合モチーフを取り除きCrx結合部位のみを残したプロモーター(-200)では活性化

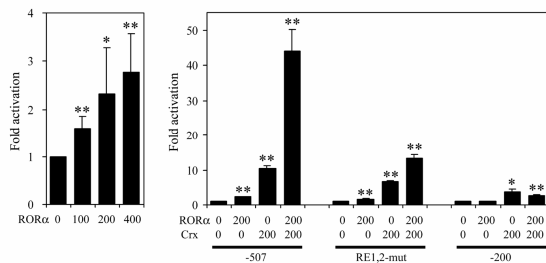


図3

はさらに減弱した。

(4)クロマチン免疫沈降法(図4):RORがS-opsin、M-opsin、Cone arrestinの制御領域に直接結合しているかどうかを検討した。野生型マウス網膜ではシグナルを検出することができなかったが、サンプル中の錐体細胞の割合を増やすためにNrlノックアウト

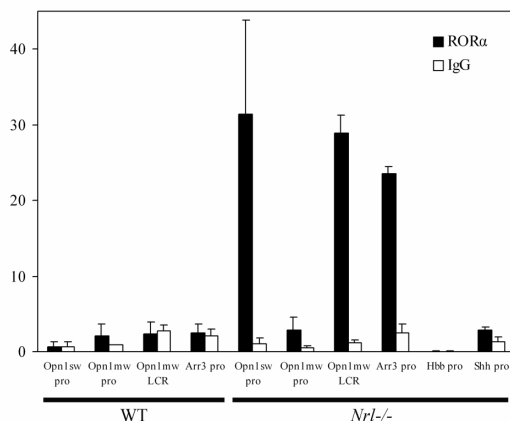


図4

トマウス(すべての杆体細胞が錐体細胞に変化する)の網膜を用いて再検討した結果、RORがS-opsin、Cone arrestinのプロモータ

(Opn1sw pro、Arr3 pro) M-opsinのLocus control region(Opn1mw LCR)に結合していることが証明された。一方M-opsinプロモーター(Opn1mw pro)には結合が認められなかった。ネガティブコントロールとしておこなったIgGを用いたサンプルおよびglobinプロモーター(Hbb pro)Sonic Hedgehogプロモーター(Shh pro)はシグナルが認められなかった。

(5)マイクロアレイ:Staggerer網膜の遺伝子発現を検索した結果、野生型の1/2以下に減少していた遺伝子が417、逆に2倍以上に増加していた遺伝子が329見つかった。そのうち興味深いものとして脊髄小脳変性症の原因遺伝子FGF14、時計遺伝子Timeless、Ca結合タンパクParvalbumin、軸索伸張などの神経分化に関わるEphA4などがあり、網膜におけるこれらの遺伝子の機能およびRORとの関連については今後の検討課題である。

(6)連続照明の影響:ラット網膜では主に視神経細胞とアマクリン細胞がBDNFを発現しており、連続照明によりBDNFの発現が顕著に増加した。BDNF陽性アマクリン細胞のサブタイプを検討した結果、約75%がコリン作動性であり、ドーパミン作動性アマクリン細胞の約半数もBDNFを発現した。カルシウム結合タンパクParvalbuminを発現するAllアマクリン細胞はBDNF陰性であった。また連続照明によりドーパミン作動性アマクリン細胞の密度が有意に増加した。

以上の結果よりRORが錐体細胞の機能に不可欠な3遺伝子S-opsin、M-opsin、Cone arrestinの制御領域に直接結合し、その発現を制御していることが示され、網膜の細胞分化を制御する全く新しい転写因子を発見したことになる。RORはメラトニンの核受容体として作用する可能性があり、これらROR

の標的遺伝子がメラトニンの制御を受けるかどうかは今後の検討課題である。この成果は2009年3月に岡山大学で開催された日本解剖学会総会のシンポジウム「網膜を材料にした多角的アプローチにより組織細胞の姿を知る」において発表し、高い評価を得た。さらにオリジナル論文としてJ. Neurochem(2009)に発表した。RORの標的遺伝子の網羅的解析については現在Real-time PCRによるValidationをおこなっており、今後継続して解析をおこなっていく予定である。また発生期網膜において光が視神経細胞やアマクリン細胞のBDNF発現を制御することにより、網膜の細胞分化に影響を与える可能性を示し、この成果はオリジナル論文としてExp Eye Res(2008)に発表した。網膜のBDNF発現にコリン作動性アマクリン細胞やドーパミン作動性アマクリン細胞が関与することを示した報告はこれまでなく、今回が初めてである。BDNFは網膜を含めた中枢神経系の

分化に極めて重要な働きをしているが、今回のデータは BDNF が光環境を網膜に伝えるメディエーターとして作用している可能性を示している。光が直接 BDNF 発現を制御しているのか、それともメラトニン分泌の抑制を介して間接的に作用しているのかは興味深い問題であり今後検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Fujieda H, Bremner R, Mears AJ, Sasaki H. Retinoic acid receptor-related orphan receptor regulates a subset of cone genes during mouse retinal development. J. Neurochem. 108:91-101, 2009. 査読有

Fujieda H, Sasaki H. Expression of brain-derived neurotrophic factor in cholinergic and dopaminergic amacrine cells in the rat retina and the effects of constant light rearing. Exp. Eye Res. 86:335-343, 2008. 査読有

[学会発表](計 2 件)

藤枝弘樹, 網膜錐体細胞の分化と核受容体, 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会, シンポジウム「網膜を材料にした多角的アプローチにより組織細胞の姿を知る」, 2009.3.29, 岡山

藤枝弘樹, 佐々木宏, ROR が網膜錐体細胞の分化に果たす役割, 第 112 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2007.3.29, 大阪

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤枝 弘樹 (FUJIEDA HIROKI)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 70280972

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし