

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：国際共同研究加速基金（帰国発展研究）

研究期間：2019～2022

課題番号：18K19961

研究課題名（和文）加齢性黄斑変性症におけるレトロトランスポゾン蓄積の影響およびメカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of retrotransposon accumulation in age-related macular degeneration

研究代表者

福田 慎一（Fukuda, Shinichi）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：80643246

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 47,400,000円

研究成果の概要（和文）：萎縮型加齢黄斑変性は、加齢とともに深刻な視力の低下を引き起こす疾患であり、黄斑部に網膜色素上皮から脈絡毛細血管板にかけて地図状萎縮病巣が形成され、現在有効な治療法はない。筑波大学内に独立した研究室・先端視覚医学講座をスタートさせ、老化と非常に似たメカニズムでAlu RNAが萎縮型加齢黄斑変性患者の網膜色素上皮内に蓄積し、逆転写され一本鎖のAlu cDNAが生成され、網膜色素上皮細胞死を誘導することを明らかにし、筆頭著者としてPNAS誌およびScience Advanced誌に報告した(Fukuda S, PNAS 2021; FukudaS Sci Adv 2021)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

萎縮型加齢黄斑変性は、加齢とともに深刻な視力の低下を引き起こす疾患であり、現在有効な治療法はない。本研究成果は、新しい遺伝情報の流れを見出し、萎縮型加齢黄斑変性のメカニズムの一端を解明、逆転写を阻害する事が萎縮型加齢黄斑変性の悪化の予防に繋がる可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：Dry type age-related macular degeneration is a disease that causes serious vision loss with age. We started an independent laboratory, the Laboratory of Advanced Vision Science, at the University of Tsukuba, and has demonstrated that Alu RNA accumulates in the retinal pigment epithelium of patients with dry type age-related macular degeneration through a mechanism very similar to aging. And Alu cDNA is generated by reverse transcription, inducing retinal pigment epithelial cell death. The results were reported in PNAS and Science Advanced as the first author (Fukuda S, PNAS 2021; FukudaS Sci Adv 2021).

研究分野：眼科学

キーワード：逆転写 Alu 加齢黄斑変性 cDNA

## 1. 研究開始当初の背景

セントラルドグマとは、DNA が mRNA に転写され、翻訳を介してタンパク質が生成されるという遺伝情報の伝達経路を示した概念である。レトロウイルスによる逆転写酵素の発見は遺伝情報が RNA から DNA へも逆方向に伝達されることを明らかにした重要なものである。近年、自ら逆転写酵素を持たない非レトロウイルスがホストの逆転写酵素を使い相補的 DNA (cDNA, complementary DNA) を作成できる事 (Zhdanov VM. Nature.256,471-3,1975; Klenerman P, et al. Nature.390,298-301,1997)、mRNA も細胞内で同様に逆転写酵素を使い cDNA を作成できること (Esnault C, et al. Nature genetics 24,363-7,2000) が報告され、逆転写された cDNA が細胞内に蓄積し何らかの病態に関わっている可能性が推測されている。細胞内に DNA が蓄積し、大脳基底核および白質の石灰化を特徴とするアイカルディ-・ゴーシェ (AGS) 症候群が有力な候補として注目されているが、蓄積している一本鎖 DNA が逆転写によるものか、何らかの DNA 障害により断片化された遺伝子なのかは未だ結論が出ていない (Stetson DB, et al. Cell.134,587-98,2008; Yang YG, et al. Cell.131,873-86,2007)。また、実際の AGS 症候群患者において逆転写酵素阻害剤 NRTIs, Nucleoside reverse transcriptase inhibitors) が治療に有効であった報告や、蓄積している DNA が逆転写されたものであるという報告も未だ無い。AGS 症候群のモデル動物であり、3' 5' DNA エキソヌクレアーゼをコードする three-prime repair exonuclease-1 (TREX1) の酵素活性が欠如し、細胞内に一本鎖 DNA の蓄積が起こっている TREX1 遺伝子欠損マウスにおいて網膜色素上皮機能の低下を示唆する網膜下液体貯留および細胞の遊走、さらに萎縮型 AMD と同様に脈絡膜が菲薄している事を光干渉断層計 (OCT, Optical Coherence Tomography) を用いて発見した。TREX1 遺伝子欠損マウスは、心臓組織に内在性のレトロエレメント LINE-1 に由来する一本鎖 DNA が多数存在し心筋炎を発症することが報告されている (Stetson DB, et al. Cell.134,587-98,2008)。しかし、これまで逆転写された一本鎖 DNA が眼症状や血管に与える影響に関する報告はない。本プロジェクトでは逆転写された一本鎖 DNA の蓄積が網膜色素上皮および脈絡膜に与える影響を検討する。

加齢黄斑変性 (AMD) は、加齢とともに深刻な視力の低下を引き起こす疾患であり (Ambati J, et al. Surv Ophthalmol.48,257-93,2003)、滲出型と萎縮型に分けられる。滲出型は CNV を伴い、網膜色素上皮から網膜下に CNV が進展し、滲出と出血による網膜剥離・浮腫などを呈し深刻な視力低下を生じる。萎縮型は、黄斑部に網膜色素上皮から脈絡毛細血管板にかけて地図状萎縮病巣が形成され、現在有効な治療法はない。AMD は、近年の高齢者人口の増加に伴い罹患率も増加し、アメリカでは現在中途失明を来す疾患の第 1 位である。

我々は、本プロジェクト開始前にこれまで萎縮型 AMD における網膜色素上皮細胞死にはレトロトランスポゾンである Alu RNA の蓄積、Nlrp3 インフラマソームの活性化を介する事を明らかにしてきた (Kerur N, Fukuda S, et al. Nat Med.24,50-61,2018; Ambati J, et al. Nat Rev Immunol.13,438-51,2001)。さらに、蓄積された Alu RNA が逆転写され一本鎖 DNA の Alu cDNA が生成され、通常のレトロトランスポジションと異なり遺伝子内に取り込まれる事なく細胞質内に留まり、自然免疫 DNA センサーである cGAS を介して Nlrp3 インフラマソームを活性化させることを明らかにした。逆転写されたレトロトランスポゾン由来の cDNA (Alu cDNA) の AMD に対する影響およびさらに詳細なメカニズムを解明する。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、一本鎖 DNA の蓄積が網膜色素上皮に障害を引き起こすならば、TREX1 遺伝子欠損マウスにおいても何らかの眼障害が見られるのではないかと考えた。TREX1 は、AGS 症候群の原因遺伝子の一つであり、酵素活性が欠如する事により細胞内に一本鎖 DNA が蓄積する (Crow YJ, et al. Nat Genet.38,917-20,2006)。AGS 症候群は、DNA の蓄積による type I interferon (IFN) 代謝異常が引き起こされ、乳児期に発症し 40% 程度が死に至る。TREX1 遺伝子欠損マウスは、心臓組織に内在性のレトロエレメントに由来する一本鎖 DNA が多数蓄積し心筋炎を起こす (Stetson DB, et al. Cell.134,587-98,2008)。しかし、これまで眼症状に関する報告はない。TREX1 遺伝子欠損マウスの眼表現型観察する事により逆転写された一本鎖 DNA の蓄積が網膜色素上皮および脈絡膜に与える影響を検討する。

研究代表者はこれまで、非侵襲的に組織内部の高精度な 3 次元画像を取得できる 3 次元 OCT の開発やカラーゲン線維の複屈折の変化を検出する事で組織内部の癒痕化を描出できる次世代型偏光 OCT の開発に携わってきた。通常 OCT では詳細に網膜色素上皮および脈絡膜を詳細に描出する事が困難である。我々は、筑波大学医学医療系 Computational Optics Group (安野嘉晃教授) と共同してさらに新世代の JM-OCT を開発中である。JM-OCT は、偏光 OCT と血管造影 OCT の機能を持ち、偏光 OCT による網膜色素上皮と血管造影 OCT による脈絡膜の

観察を非侵襲的に同時に行う事が出来る。JM-OCT の使用により眼球を摘出し組織切片を作成する事なく正確に TREX1 遺伝子欠損マウスの網膜色素上皮および脈絡膜の継時的な観察を行う。

### 3 . 研究の方法

動物：C57BL/6J を Japan SLC, Inc. より購入、Trex1 ノックアウトマウスおよび Trex1・cGAS ダブルノックアウトマウスをアメリカより輸送予定。本実験は、受け入れ先倫理委員会の承認を受け、NIH、ARVO の動物実験取り扱い倫理規約に即して進める。

レーザー CNV モデル：生後約 8 週齢の雄の C57BL/6J マウスにレーザー (OcuLight GL; IRIDEX Corp) を 180 mw、100msec、75 $\mu$ m のスポットで視神経周囲に 4 発過剰凝固し、CNV を誘導する。1 週間後眼球を摘出しフラットマウントを作成、レクチンにて染色、共焦点顕微鏡で CNV の体積を算出する。

網膜下注射：全身麻酔を施行後、市販散瞳用点眼液にて散瞳、実体顕微鏡下にて 35G マイクロシリンジ (Ito Co.) を用い網膜下注射を行う。

眼底および OCT 観察：マウスの眼底写真および OCT 撮影は Micron IV (Phoenix Research Labs) および現在開発中の JM-OCT を用いて撮影をする。

In situ hybridization：マウス眼組織および培養細胞の内因性レトロトランスポゾン由来の一本鎖 DNA のイメージングを行うため LINE-1、B1、B2 の各プローブを用いて in situ hybridization を行う。

組織形態観察および免疫染色：頸椎脱臼にて安楽死させ眼球摘出、4%PFA にて固定、OCT コンパウンドに包埋、7 $\mu$ m 厚の凍結切片を作成し HE 染色を行う。抗一本鎖 DNA 抗体 (TNT-3, Millipore) を用いて免疫染色を行う。

統計解析：Mann-Whitney U test および One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons を使用し、 $p < 0.05$  の統計結果を有意とする。統計解析には SPSS を使用する。

サンプルサイズ：マウス CNV サイズの標準偏差は  $100 \times 103 \mu\text{m}^3$  であり (Mizutani, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 56, 7122-9, 2015)、10%-15% の差の検出、エラー 5%、検出力 (1- $\beta$ ) 80% に設定したところ、16.71 から 44.59 個のレーザースポットが必要であった。1 眼あたり 4 個のレーザーを照射する為、各グループ 4~10 眼必要である。TREX1 遺伝子欠損マウス、約 50 匹を毎月 Micron IV、JM-OCT を用いて眼底計測する。

### 4 . 研究成果

萎縮型 AMD は、加齢とともに深刻な視力の低下を引き起こす疾患であり、黄斑部に網膜色素上皮から脈絡毛細血管板にかけて地図状萎縮病巣が形成され、現在有効な治療法はない。近年萎縮型加齢黄斑変性症において miRNA を処理する酵素である DICER1 が減少していると、網膜色素上皮細胞においてレトロトランスポゾン的一种である Alu の蓄積を誘導し、網膜色素上皮細胞の変性を引き起こすことが報告された。我々は、筑波大学内に独立した研究室・先端視覚医学講座をスタートさせ、レトロトランスポゾン蓄積の原因である DICER1 に着目し、3 種類の独立した DICER1 が減少しているマウスモデルを用いて、網膜色素上皮細胞が変性する事、脈絡膜血管新生を誘導する事を明らかにし PNAS 誌に共著として報告した (Wright CB, et al. PNAS 2020)。さらに、DICER1 の減少および Alu RNA の蓄積が眼の疾患だけでなく糖尿病でも起き、逆転写酵素阻害薬 NRTI が抗炎症作用を持ち、糖尿病の治療に有用な可能性がある事を明らかにし、Nature Communications 誌に共著として報告した (Ambati J, et al. PNAS 2020)。老化と非常に似たメカニズムで Alu RNA が萎縮型加齢黄斑変性症患者の網膜色素上皮内に蓄積し、逆転写され一本鎖の Alu cDNA が生成され、網膜色素上皮細胞死を誘導することを明らかにし、さらに当初の目的である逆転写されたレトロトランスポゾン由来の cDNA (Alu cDNA) の網膜色素上皮細胞に対するより詳細なメカニズムを解明し、筆頭著者として PNAS 誌および Science Advanced 誌に報告した (Fukuda S, PNAS 2021; Fukuda S Sci Adv 2021)。逆転写酵素阻害剤である NRTI の抗炎症作用がアミロイド による網膜色素上皮細胞死にも有用であることを共著者として Signal Transduct Target Ther 誌に報告した (Narendran S, et al. Signal Transduct Target Ther 2021)。さらに、これまでの実験で使用した萎縮型加齢黄斑変性モデルマウスの作成法手技である網膜下注射について共著者として Nature Protocol 誌に報告した (Huang P, et al. Nat Protoc 2022)。

新世代 Jones Matrix OCT (JM-OCT) は、この 3 年間の間にさらに進化させ、細胞機能を評価出来る次世代型ダイナミクス OCT として発展させ、様々なマウスモデルにおいて観察を行い報告してきた (Mukherjee P et al. Biomed Opt Express 2022; Mukherjee P, et al. Sci Rep 2021)。OCT により CNV と網膜色素上皮の同時観察が可能である事を確認した。TREX1 遺伝子欠損マウスの眼を高性能眼底カメラおよび OCT を用いて詳細に観察したところ、ヒトの中心性漿液性脈絡網膜症と類似する網膜下の液体貯留および多数の細胞の遊走を認めた。中心性漿液性脈絡網膜症は、網膜色素上皮のバリア機能が低下する事により脈絡膜から網膜下に液成分が漏れ出してしまう疾患であり、中心性漿液性脈絡網膜症の病歴がある患者は、AMD を発病しやすい傾向がある。

さらに網膜周辺部では部分的に脈絡膜の菲薄化を認めた。萎縮型 AMD では脈絡膜の菲薄化が起こる事が多数報告されている (Lee JY, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci.54,7812-8,2013)。さらに、滲出型 AMD のモデル動物であるマウスレーザーCNV モデルにレーザー照射すると同時に Alu cDNA を網膜下に注入し網膜色素上皮にトランスフェクションしたところ、高濃度の Alu cDNA 注入では網膜色素上皮の萎縮が見られ、CNV のサイズは変化しなかったが、低濃度では CNV のサイズが増大した。細胞内に蓄積した cDNA が血管萎縮・血管新生の両方に関与している可能性が示唆された。現在、TREX1 関連の成果をまとめて論文投稿準備を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Mukherjee P, Miyazawa A, Fukuda S, Yamashita T, Lukmanto D, Okada K, El-Sadek IA, Zhu L, Makita S, Oshika T, Yasuno Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Label-free functional and structural imaging of liver microvascular complex in mice by Jones matrix optical coherence tomography.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 20054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98909-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda S, Narendran S, Varshney A, et al.	4. 巻 7
2. 論文標題 Alu complementary DNA is enriched in atrophic macular degeneration and triggers retinal pigmented epithelium toxicity via cytosolic innate immunity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabj3658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abj3658	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Huang P, Narendran S, Pereira F, Fukuda S, Nagasaka Y, Apicella I, Yerramothu P, Marion K, Cai X, Satta S, Gelfand B, Ambati J.	4. 巻 11
2. 論文標題 The Learning Curve of Murine Subretinal Injection Among Clinically Trained Ophthalmic Surgeons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transl Vis Sci Technol .	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.11.3.13.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Huang P, Narendran S, Pereira F, Fukuda S, Nagasaka Y, Apicella I, Yerramothu P, Marion K, Cai X, Satta S, Gelfand B, Ambati J.	4. 巻 17
2. 論文標題 Subretinal injection in mice to study retinal physiology and disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 1468-1485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41596-022-00689-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukuda S, Ueno Y, Fujita A, Mori H, Tasaki K, Murakami T, Beheregaray S, Oshika T.	4. 巻 258
2. 論文標題 Comparison of anterior segment and lens biometric measurements in patients with cataract.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 137-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-019-04482-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Charles B. Wright, Hironori Uehara, Younghee Kim, Tetsuhiro Yasuma, Reo Yasuma, Shuichiro Hirahara, Ryan D. Makin, Ivana Apicella, Felipe Pereira, Yosuke Nagasaka, Siddharth Narendran, Shinichi Fukuda, et al.	4. 巻 117
2. 論文標題 Chronic Dicer1 deficiency promotes atrophic and neovascular outer retinal pathologies in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 2579-2587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1909761117.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ambati J, Magagnoli J, Leung H, Wang S, Andrews C, Fu D, Pandey A, Sahu S, Narendran S, Hirahara S, Fukuda S, Sun J, Pandya L, Ambati M, Pereira F, Varshney A, Cumimngs T, Hardin J, Edun B, Bennett C, Ambati K, Fowler B, Kerur N, Rover C, Leitinger N, Werner B, Sutton S, Gelfand B.	4. 巻 11
2. 論文標題 Repurposing anti-inflammasome NRTIs for improving insulin sensitivity and reducing type 2 diabetes development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 4737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18528-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 El-Sadek I, Miyazawa A, Tzu-Wei Shen L, Makita S, Fukuda S, Yamashita T, Oka Y, Mukherjee P, Matsusaka A, Oshika T, Kano H, Yoshiaki Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Optical coherence tomography-based tissue dynamics imaging for longitudinal and drug response evaluation of tumor spheroids.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical optics	6. 最初と最後の頁 6231-6248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.404336.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda S, Varshney A, Fowler B, et al.	4. 巻 118
2. 論文標題 Cytoplasmic synthesis of endogenous Alu complementary DNA via reverse transcription and implications in age-related macular degeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 e2022751118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2022751118.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Narendran S, Pereira F, Yerramothu P, Apicella I, Wang S, Ambati K, Hirahara S, Kim Y, Ambati M, Ambati V, Huang P, Varshney A, Nagasaka Y, Fukuda S, Baker K, Marion K, Deussing J, Sadda S, Gelfand B, and Ambati J	4. 巻 6
2. 論文標題 Nucleoside reverse transcriptase inhibitors and Kamuvudines inhibit amyloid- induced retinal pigmented epithelium degeneration.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Signal Transduct Target Ther	6. 最初と最後の頁 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41392-021-00537-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mori H, Ueno Y, Fukuda S, Oshika T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Detection of Anterior Hyaloid Membrane Detachment Using Deep-Range Anterior Segment Optical Coherence Tomography.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Med	6. 最初と最後の頁 3057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11113057.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukushige M, Ngo NH, Lukmanto D, Fukuda S, Ohneda O.	4. 巻 110
2. 論文標題 Effect of the COVID-19 pandemic on antibiotic consumption: A systematic review comparing 2019 and 2020 data.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Public Health.	6. 最初と最後の頁 946077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpubh.2022.946077.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mukherjee P, Fukuda S, Lukumanto D, Yamashita T, Okada K, Makita S, Abd El-Sadek I, Miyazawa A, Zhu L, Morishita R, Lichtenegger A, Oshika T, Yasuno Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Label-free metabolic imaging of non-alcoholic-fatty-liver-disease (NAFLD) liver by volumetric dynamic optical coherence tomography.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomed Opt Express.	6. 最初と最後の頁 4071-4086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.461433.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Alio JL, Alio del Barrio JL, Shinichi Fukuda, Yoshiaki Yasuno, Tetsuro Oshika, Gabriele Vestri, Claudio Macaluso, Francesco Versaci, Miguel J. Maldonado, Melissa G. Paragua Macuri, Alfredo Holgueras, et al.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 272
3. 書名 Atlas of Anterior Segment Optical Coherence Tomography	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------