

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791286
 研究課題名 (和文) 網膜色素変性症の動物モデルにおける網膜各層の機能解析
 研究課題名 (英文) Functional analysis of outer, middle and inner retinal layers in animal models with photoreceptor degeneration.
 研究代表者
 大高 幸二 (OTAKA KOJI)
 岩手医科大学・医学部・研究員
 研究者番号：70438498

研究成果の概要：視細胞の変性に伴って網膜中層ならびに内層へのシグナルが低下し、視細胞応答の低下に平行して網膜各層の応答が低下すると考えられてきた。今回の研究で対象とした Royal College Surgeons (RCS) ラットはヒトの網膜色素変性症と同じ遺伝子異常で発症する遺伝性の視細胞変性モデルである。このモデルでは視細胞の変性にもかかわらず網膜内層の応答が保たれていることが明らかとなった。また、ラットのみならずウサギの遺伝精子細胞変性モデルでも網膜内層の機能変化が生じている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	210,000	3,210,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：視細胞変性、網膜色素変性、網膜電図、網膜機能

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症は、視細胞あるいは網膜色素上皮に発現するタンパク質をコードしている遺伝子の変異によって発症し、進行性の視細胞の消失をきたす疾患群である。全世界で150万人が罹患し中途失明の原因となっているが、本症に対する治療法は未だに確立されていない。新しい治療の開発のためには、疾患モデル動物を用いた基礎的な研究が必須である。

Royal College of Surgeons (RCS) ラットは、tyrosine receptor kinase (*Mertk*) の遺伝子異常で発症する網膜色素変性症の動物モデルである。網膜色素上皮細胞の視細胞外節の貧食機能低下が病態の中心にある。この動物モデルは以下の点で優れている。

- (1) 常染色体劣性遺伝性の網膜色素変性症でも *Mertk* の遺伝子の異常が見つかっている。従って、*Mertk* の変異はヒトとラットの

遺伝性視細胞変性に共通したものである。

- (2) 視細胞変性の速度は比較的早く、治療の効果を比較的短い期間で判断できる。
- (3) ラットの眼はマウスに比較すると大きく、様々な治療を施すのに扱いやすい。

以上の利点があるため、RCS ラットのモデル動物としての重要性は高まってきている。動物モデルに治療を行なった場合に、その効果を評価する方法の一つが網膜電図 (ERG) である。RCS ラットでは視細胞変性の進行に伴って、a および b 波の振幅が低下する。12 週齢以上になると、特徴的な陰性型の波形を呈する

2. 研究の目的

視細胞の変性に伴って網膜中層ならびに内層へのシグナルが低下し、視細胞応答の低下に平行して網膜各層の応答が低下すると考えられてきた。しかし、変性の進行したRCSラットでみられるこの陰性波は網膜内層に由来することが、我々のpreliminary data で判明している。つまり、視細胞の変性にもかかわらず、網膜内層の応答は残存しているのである。そこで今回の研究では、変性に伴って網膜各層の応答がどのように変化し、ERGを形成するかを検討する。

更に、最近開発されたロドプシントランスジェニックウサギ (P347L) で多局所ERGを記録して、網膜中層および内層の機能変化を検討した。

3. 研究の方法

(1) 暗順応および明順応ERGの記録

4, 6, 8, 10, 12および14週齢のRCSラットからGantzfeld domeを用いてERGを記録する。12 時間の暗順応後、 $-6.88 \sim 0.84 \log \text{ cd-s/m}^2$ の刺激強度で、暗順応ERGを記録し、杆体機能を検討する。続いて、 34 cd/m^2 の白色光での明順応下で明順応ERG を記録し、錐体機能を検討した。

(2) 網膜各層からの応答の分離

N-methyl-DL-aspartic acid (NMDA) は双極細胞からアマクリンあるいは網膜神経節細胞 (3次ニューロン) への伝

達をブロックする。NMDAを硝子体内に投与し網膜内層をブロックした。投与前から投与後の波形をdigital subtractionして、網膜内層からの応答を分離記録した。

(3) 網膜光障害の作成

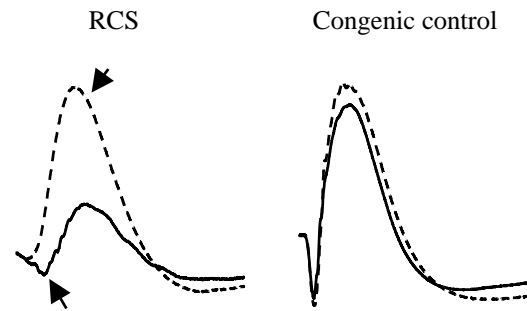
SDラットの網膜に1,000-2,000 luxのフルオレセインライトを24-48時間照射して網膜光障害を作成した。NMDAに対するERGの変化をRCSと網膜光障害で比較する。

(4) P347L Tgウサギの多局所ERG

6か月齢にTgとWTを対象として多局所ERGを記録し、波形を比較した。

4. 研究成果

(1) NMDA 硝子体内注入による波形変化



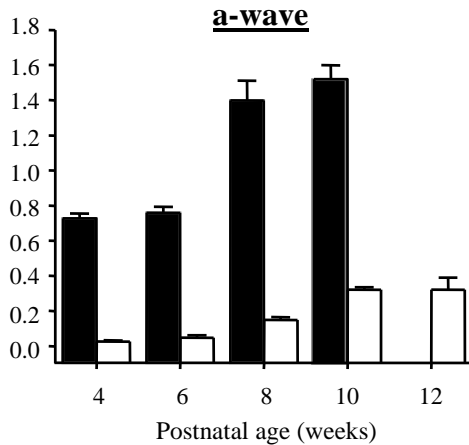
control では、NMDA 注入前 (実線) と注入後 (破線) でほとんど波形変化はみられなかった。ところが、10 週の RCS ラットでは、a 波の振幅が低下するとともにその頂点潜時が短縮した (矢印)。また、b 波の振幅が約 2 倍に増大した (矢印)。これらの変化は統計学的に有意な変化であった。

(2) RCS ラットの 3 次ニューロン応答の残存

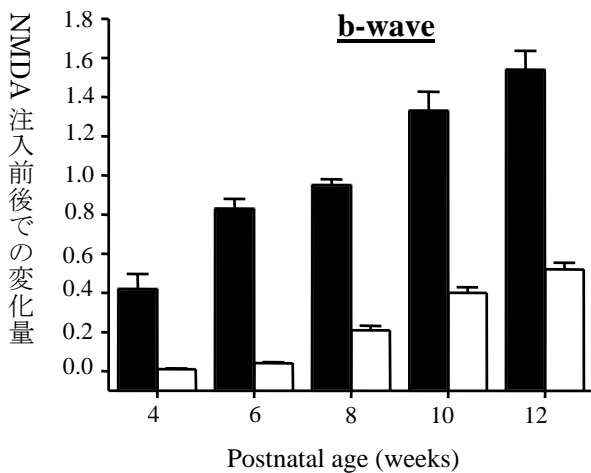
Digital subtraction で得られた 3 次ニューロン応答の振幅は、視細胞の変性に伴って低下するが、b 波振幅よりも有意に保たれていた。従って、RCS ラットでは網膜内層の応答が中層の応答よりも保たれることが明らかとなった。

(3) RCS ラットの週齢に伴った 3 次ニューロン応答の ERG への関与

NMDA の硝子体内注入後、a ならびに b 波の振幅および閾値がどのように変化するかを週齢ごとに検討した。



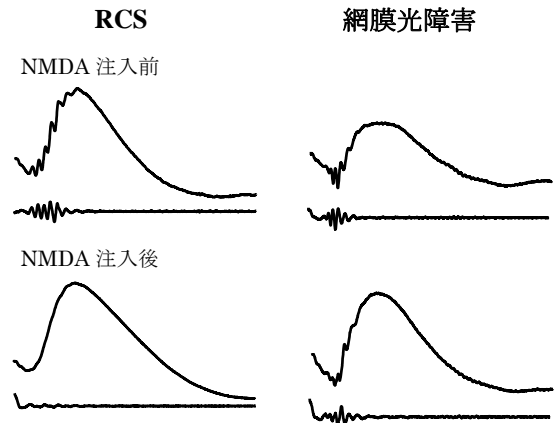
Black bar は NMDA による a 波振幅の変化量、White bar は a 波閾値の変化量を表している。週齢が進むに従って振幅および閾値の変化量が大きくなった。つまり、週齢が進むと 3 次ニューロン応答が a 波の形成に大きく関与する



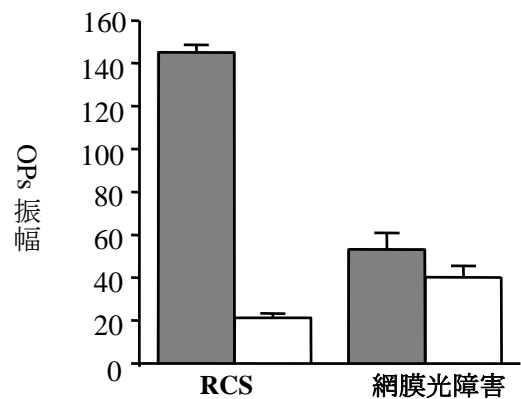
週齢が進むに従って b 波振幅および閾値の変化量が大きくなった。以上の結果から、週齢が進むに従って 3 次ニューロン応答の ERG への関与が大きくなり、a および b 波の重要な構成成分となっていることが明らかとなった。

(4) 網膜光障害との比較

6 週齢 RCS ラットと網膜光障害ラットの NMDA 硝子体内注入による波形変化を比較した。異なった種類の視細胞変性モデルであるが、b 波振幅に有意差なく視細胞変性の程度がほぼ同等と考えられる個体を選択した。

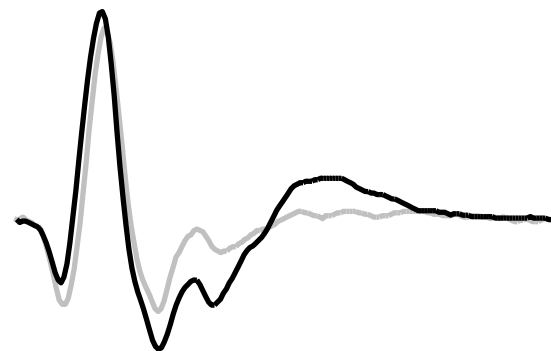


RCS ラットでは、NMDA の硝子体内投与で OPs が完全に消失したが、網膜光障害では残存していた。



Gray および white bar は、それぞれ NMDA 注入前と後の OPs 振幅を表している。視細胞の変性が同程度あっても網膜内層の薬剤に対する反応が異なる可能性が示唆された。RCS ラットでは網膜内層の NMDA レセプターに変化が生じている可能性が示唆された。

(5) Tg と WT ウサギの多局所 ERG 波形の違い
6 ヶ月齢の Tg と WT ウサギの多局所 ERG の all trace 波形を比較してみた。



Black および gray line は、それぞれ WT と Tg の波形である。波形の前半成分はほとんど重なり合っているが、後半成分が重なり合わない。後半成分には網膜内層の応答が含まれていると考えられ、Tg では網膜内層機能に変化が生じていることが示唆される。

このことから、視細胞変性に伴った網膜内層機能変化はラットに特有のものではなくウサギでも生じている可能性がある。

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1件)

1. Ohzeki T, Machida S, Takahashi T, Ohtaka K, Kurosaka D. The effect of intravitreal *N*-methyl aspartic acid on the electroretinogram in Royal College of Surgeons rats. Jpn J Ophthalmol. 2007; 51: 165-174. (査読あり)

[学会発表] (計1件)

1. Ohzeki T, Machida S, Takahashi T, Ohtaka K, Kurosaka D. Contribution of the third-order neuronal response to shaping the a- and b-waves of the electroretinogram in Royal College of Surgeons rats. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2007. Fort Lauderdale.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大高 幸二 (OTAKA KOJI)

岩手医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 70438498

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者