

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09928

研究課題名(和文) アディポネクチン関連因子の網膜機能・形態に及ぼす影響についての検討

研究課題名(英文) A research of the effects of adiponectin-related factors on retinal function and morphology.

研究代表者

上野 真治 (Ueno, Shinji)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：80528670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アディポネクチンの受容体のAdiponectin receptor-1 (AdipoR1)、AdipoR1のリガンドであるC1q/TNF-related protein (CTRP) 9のノックアウトマウスの解析を行った。AdipoR1ノックアウトマウス視細胞由来の網膜変性を認めた。CTRP9ノックアウトマウスでは錐体数の減少により錐体機能が低下していた。この錐体機能の低下は、変性ではなく、錐体発生段階において錐体の減少と考えられた。CTRP9は網膜に発現していないことから、CTRP9は網膜以外の組織から異所性に放出され、マウスの網膜の錐体細胞数に影響を及ぼしていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アディポネクチンの受容体のAdiponectin receptor-1 (AdipoR1)のリガンドであり、アディポネクチンの類似物質であるC1q/TNF-related protein (CTRP) 9が網膜の発生において錐体数を調整していることがわかった。CTRP9は網膜に発現していないことから、CTRP9は網膜以外の組織から異所性に放出され、網膜の錐体細胞数に影響を及ぼしていると考えられた。今までに甲状腺ホルモンなどが同様に異所性に錐体の発生に影響を与えていることが報告されているが、CTRP9でも同様の働きがあると考えられ、網膜の錐体発生に関係する重要な因子が発見されたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Adiponectin receptor-1 (AdipoR1), a receptor for adiponectin, and C1q/TNF-related protein (CTRP) 9, a ligand for AdipoR1, were investigated in knockout mice. AdipoR1 knockout mice showed photoreceptor-derived retinal degeneration. CTRP9 knockout mice showed reduced cone function due to decreased cone number. The decreased cone number was thought to be due to abnormality in the cone development rather than cone degeneration. Since CTRP9 is not expressed in the retina, CTRP9 was suspected to be ectopically released from tissues other than the retina, affecting the number of cone cells in the mouse retina.

研究分野：Ophthalmology

キーワード：CTRP9 AdipoR1 Retina Cone cell

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アディポネクチンは抗炎症作用を有する肥満に伴う多くの疾患に保護的に作用する脂肪組織由来分泌因子である。アディポネクチンの受容体の Adiponectin receptor-1 (AdipoR1) のノックアウトマウスが Docosahexaenoic acid (DHA) の取り込み障害により網膜変性を起こすことが報告され、また AdipoR1 の遺伝子変異が網膜色素変性を起こすとしてアディポネクチン関連因子と網膜の関係が注目を浴びている。しかし、これらの因子と網膜の関係はまだ詳細には解明されていなかった。

2. 研究の目的

今までに網膜変性を生じると報告されている AdipoR1 のノックアウトマウスの網膜変性のメカニズムと AdipoR1 のリガンドでありアディポネクチンの類似物質である C1q/TNF-related protein (CTRP) 9、アディポネクチンのノックアウトマウスの表現型の解析をおこなうことによりアディポネクチン関連因子の網膜への影響を検討することであった。

3. 研究の方法

アディポネクチン、AdipoR1、C1q/TNF-related protein (CTRP) 9 のそれぞれのノックアウトマウスおよび野生型のマウスの網膜電図および組織を検討した。また、新規な知見が得られた Ctrp9 ノックアウト(KO)マウスについては網膜機能と形態以外に免疫組織学的検査、RNA シークエンス、定量的リアルタイム PCR にてさらに詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) アディポネクチンのノックアウトマウス

ノックアウトマウスでは、既報通り ERG と組織学的な評価で野生型と比較して異常はみられなかった。

(2) AdipoR1 ノックアウトマウス

8 週齢のマウスでは既報通り視細胞の変性がみられた(図 1)、24 週ではさらに網膜変性は進行した。ERG もノックアウトマウスで進行性に振幅が著明に減少しており既報通り進行性の網膜変性が確認された。この AdipoR1 ノックアウトマウスの網膜変性が視細胞起源か、もしくは網膜色素上皮起源か不明であったため、網膜色素上皮の由来の ERG 成分である c 波の評価をおこなった。同程度の a 波を発生するノックアウトマウスと野生型で c 波の振幅を検討したところ両者に有意差がなかった。このことは AdipoR1 ノックアウトマウスの網膜変性は、網膜色素上皮由来ではなく視細胞原性であると考えられた(図 2)。

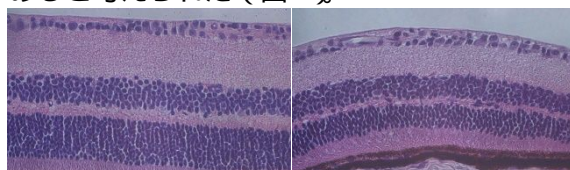


図 1 野生型

AdipoR1 KO

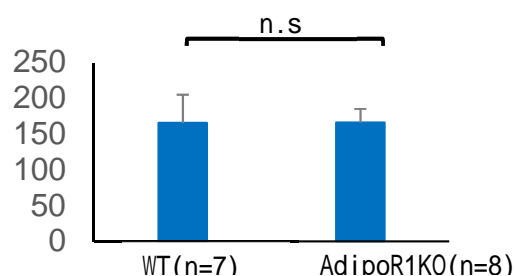


図 2 ERG の c 波の振幅

(3) C1q/TNF-related protein (CTRP) 9 ノックアウトマウス

本研究で CTRP9 ノックアウトマウスでは錐体数の減少により錐体機能が低下していることが初めて証明された。また錐体機能の低下は、進行性ではなく、週齢の早い時期から高齢になるまで変化なく、組織学的にも変性所見はないことから、錐体発生段階において錐体数が減少していると考えられた。この研究は Investigative Ophthalmology and Visual science 誌の 2022 年 5 月号に Ablation of Ctrp9, Ligand of AdipoR1, and Lower Number of Cone Photoreceptors in Mouse Retina の題名で掲載された。以下に論文の内容を抜粋して報告する。

1 ERG

CTRP9 ノックアウトマウスおよび野生型の ERG の解析では 8 週と 24 週で暗順応下の

ERG の振幅に差はなかったが、最大刺激強度による錐体 ERG の振幅は、8 週齢の KO マウスで WT マウスに比べて 40%低下していた(図 3、図 4)。しかし、この錐体 ERG は、8 週齢から 6 か月齢まで低下していなかった(図 4)。

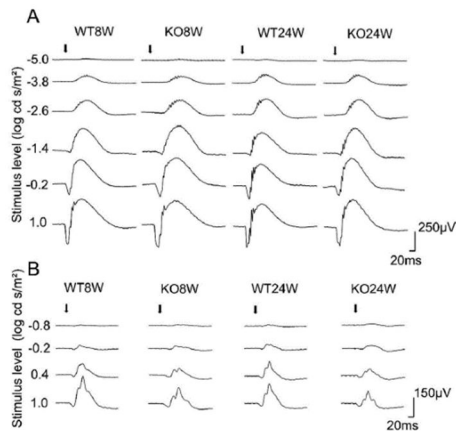


図 3 8 週齢と 24 週例の野生型 (WT) とノックアウトマウス (KO) の暗順応下 (A) 明順応下 ERG (B)

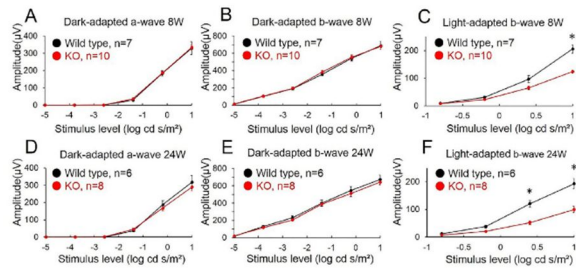


図 4 錐体 ERG において 8 週齢 (C) と 24 週齢 (F) ではノックアウトマウスで有意に振幅が減少している

2 網膜組織

網膜の組織切片では 8 週齢、24 週齢にて野生型と通常の H E 染色では両者に明らかな相違は見られず (図 5) また免疫組織学的検討でも、ノックアウトマウスで S-cone、M-cone、Cone arrestin や双極細胞のマーカである PKC がノックアウトマウスで欠損することもなく発現様式に異常はなかった (図 6)。

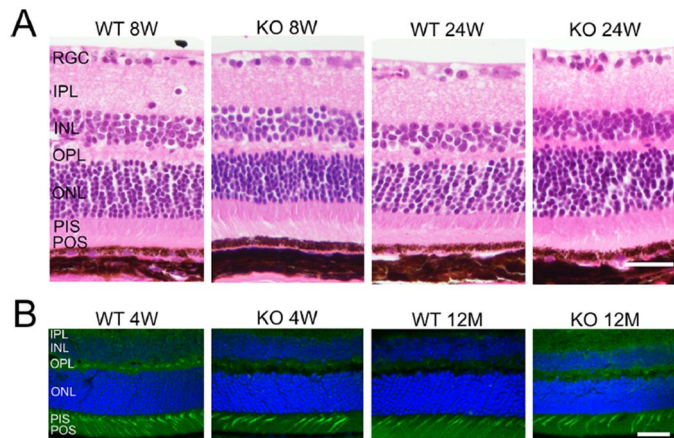


図 5 A 8 週齢、24 週齢ともノックアウトマウスと野生型で差はなかった B PNA による錐体の染色でも両者に異常はない

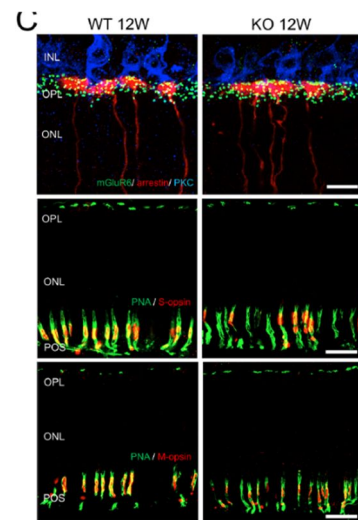


図 6 12 週における免疫組織染色 PKC、Cone arrestin (上段)、S オプシン (中段)、M オプシン (下段)

3 錐体密度

次に錐体の密度を定量するために網膜のフラットマウントを作成し、PNAで錐体を染色し、視神経乳頭から同距離の4つの部位の錐体数を計測し密度を計測した。ノックアウトマウス (n = 6) の4つの部位の平均錐体密度は、WTマウス (n=12) の約70%に低下していた。この結果はノックアウトマウスの錐体ERGの振幅の低下は錐体密度の減少から来ていることを示唆していた(図7)。

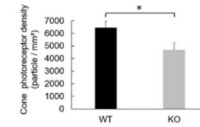
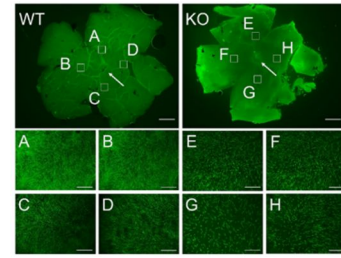


図7 網膜フラットマウントによる錐体密度の計測

4 網膜におけるRNAの定量

ノックアウトマウス、野生型マウスそれぞれ2匹4眼の網膜のRNAシーケンシングを行った。RNAシーケンシングによる網羅的な解析では、KOマウスとWTマウスの両方でCTRP9の発現がなかった。これはCTRP9が網膜では発現せず異所的に発現して網膜に影響していることを示していた。次に網膜に発現するタンパクに注目した。杆体に発現するタンパクや双極細胞に発現するタンパクでは両者に大きな差があるものはなかった。一方、錐体にRNAの発現は低下しているものが多かった(図8)。さらに視細胞錐体、杆体、杆体錐体両者に発現している統計的にRNA量を比較するために、定量的リアルタイムPCR解析を行った。錐体細胞で発現する遺伝子の転写物であるOpn1sw、Opn1mw、Gnat2、およびCnga3の転写物の発現が、KOマウスの網膜で減少していた。しかし、杆体細胞の転写物の発現は減少していなかった(図9)。

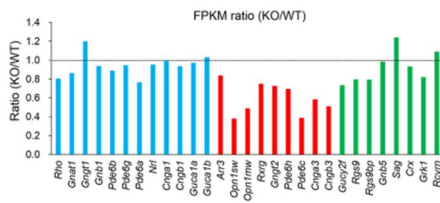


図8 RNAシーケンシングの結果

ノックアウトマウスと野生型の発現比

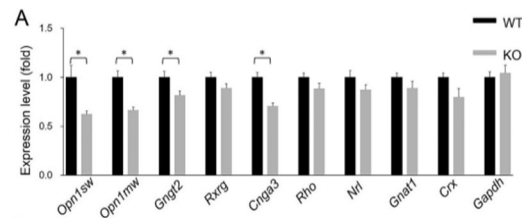


図9 定量的リアルタイムPCR解析の結果

5 まとめ

今回の我々の研究では今まで報告がなかったCTRP9の網膜へ作用を初めて報告した。CTRP9は他の組織から異所性に放出され、マウスの網膜の錐体細胞数に影響を及ぼしていることがわかった。今までに甲状腺ホルモンなどが同様に異所性に錐体の発生に影響を与えていることが報告されているが、CTRP9でも同様の働きがあると考えられた。今後は、その詳細な機序を解明していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inooka D, Omori Y, Ouchi N, Ohashi K, Kawakami Y, Koyanagi Y, Koike C, Terasaki H, Nishiguchi KM, Ueno S.	4. 巻 63
2. 論文標題 Ablation of Ctrp9, Ligand of AdipoR1, and Lower Number of Cone Photoreceptors in Mouse Retina	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology and Visual Science	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.63.5.14.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上野真治、井岡大樹、大森義裕、小池千恵子、小柳 俊人、寺崎浩子、西口康二
2. 発表標題 CTRP9の遺伝子欠損マウス網膜における錐体の減少
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------