

機関番号：13901

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592075

研究課題名 (和文) ロドプシントランスジェニックウサギの系統樹立と変性過程の解析

研究課題名 (英文) Establishment of rhodopsin transgenic rabbit line and analysis of retinal degeneration

研究代表者

近藤 峰生 (KONDO MINEO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80303642

研究成果の概要 (和文)：我々は bacterial artificial chromosome (BAC) 遺伝子改変技術を用いて、ウサギの網膜色素変性 (RP) モデルであるロドプシン P347L トランスジェニック (Tg) ウサギを作製した。このウサギは杆体優位の進行性網膜変性をおこし、視細胞の変性の度合いには著しい部位的な違いがあることがわかった。このウサギの網膜電図は週齢とともに全ての成分が減弱したが、b 波よりも a 波の方がより障害されており、律動様小波 (OPs) が全ての成分の中で最も保たれていた。興味深いことに、若い Tg ウサギの OPs は同じ週齢の野生型ウサギよりも有意に大きかった。薬理的な実験により、若い Tg ウサギにみられるこの大きな OPs は、網膜内層の二次的機能変化に起因していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：We have generated a rabbit model of retinitis pigmentosa (RP), the rhodopsin P347L transgenic (Tg) rabbit, by using bacterial artificial chromosome (BAC) transgenesis. These rabbits showed a rod-dominant, progressive retinal degeneration with a marked regional variations in the loss of photoreceptors. All of the electroretinogram components of the Tg rabbits decrease progressively with the a-wave more affected than the b-wave, and the oscillatory potentials (OPs) were the best preserved. Interestingly, the OP amplitudes of young Tg rabbits were significantly larger than those of wild-type rabbits. Pharmacological experiments showed that the significantly larger OPs in young Tg rabbits resulted from secondary alterations in the inner retinal function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：網膜色素変性、動物モデル、ウサギ、網膜電図、トランスジェニック

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性 (RP) は、眼科領域における難治性の網膜変性疾患であり、網膜の発生・構造・機能にかかわる遺伝子変異により進行性に網膜機能が低下し、最終的には重度の視

機能障害に至りうる病気である。RP の頻度は国際的に 3000-4000 人に 1 人といわれており、現在も中途失明の主要な原因の 1 つである。しかしながら現時点では未だに有効な治療法に乏しい。

疾患に対する新しい治療法の開発には、疾患の動物モデルは重要である。RP にもこれまで様々な動物モデルが作製されてきたが、ほとんどはマウスやラットなどの小型動物であった。小型動物モデルは扱いやすいが、眼球が小さいために細胞シートの移植や人工視覚の移植実験には使用できない。

2. 研究の目的

申請者は、前回の研究期間中において世界で初めて進行性網膜変性ウサギ（ロドプシントランスジェニックウサギ: Tg ウサギ）を作成することに成功した。今回の期間内の研究目的は、この Tg ウサギの変性の過程を詳細に研究し、網膜変性のメカニズムと機能変化を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) Tg ウサギの系統については、確実に変性が確認された3つのラインに絞って繁殖を継続した。3ラインのオスF1 個体から精子を得て、4匹のメスの卵管に移植した。出生直後に耳サンプルをDNA 検定して、Tg ウサギと判明した個体を飼育した。

(2) 生直後、生後 1M、生後 3M に網膜を摘出して mRNA を分離し、変異遺伝子の mRNA を認識するプライマーを設定して RT-PCR を行ない発現を定量して正常なロドプシンに対する%値を計算した。

(3) 光学顕微鏡切片は、生後 1M、3M、6M、12M に樹脂による標本を作成してトルイジンブルー染色で評価した。電子顕微鏡による形態観察では、まず視細胞の内節・外節付近の初期 (1-3M 付近) の形態変化を調べた。

(4) Tg ウサギの網膜機能の評価には網膜電図 (ERG) を用いた。ERG の記録のための光刺激には全視野刺激の Ganzfeld ドームを用い、最高で 200 cd-s/m² 以上の強いキセノンフラッシュを 7log 幅で変化させて ERG を記録した。

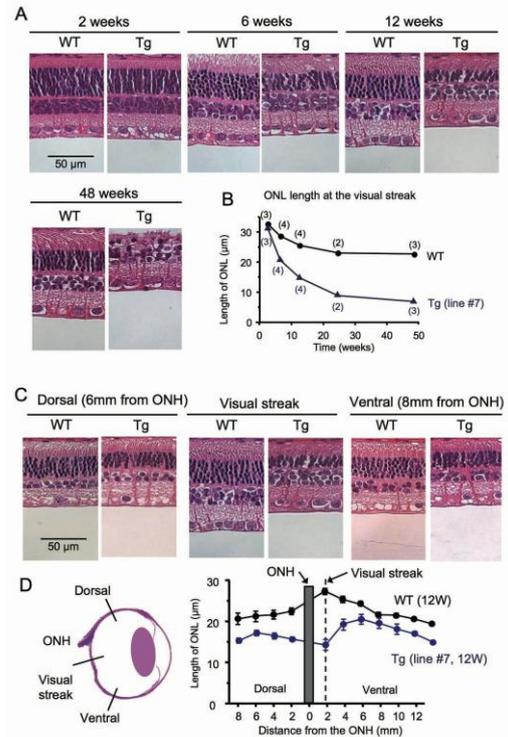
4. 研究成果

(1) 前期間に行った研究により、合計 12羽が変異遺伝子陽性であることがわかった。この 12羽のうち 10羽が生存し、さらにこの 10羽のうち 6羽が次世代 (F1) にも P347L 変異を引き継いだ。この 6つの Tg ラインの間で変異遺伝子の発現量は異なっており、最も発現量が高かったのはライン 7 の Tg ウサギであった。このライン 7 の Tg ウサギの網膜変性が最も重度であり、変性の速度も速かった。そこで、以後の研究は主にこのライン 7 の Tg ウサギを用いて行った。

(2) 生後 2 週の時点では、Tg ウサギの網膜の外顆粒層には 8-9 層の核が存在しており、野生型ウサギの網膜とほとんど区別できな

かった。しかし、6 週以降では Tg ウサギの外顆粒層の核数は徐々に減少し、生後 48 週ではわずかに 1 層の外顆粒層が残るのみであった。また、Tg ウサギの視細胞変性は中心の visual streak で最も強く、網膜周辺部では変性が比較的軽いことがわかった。

図 1: Tg ウサギの網膜組織



また、Tg ウサギの視細胞を電子顕微鏡で観察した結果、Tg ウサギの網膜では視細胞間が多量の沈着物で占められていることがわかった。さらに拡大率を上げて観察すると、Tg ウサギでは視細胞の内節から直径 50-300 nm の小胞 (vesicle) がちぎれるように多量に発生しており、これが視細胞間を満たして沈着物を形成していることがわかった。

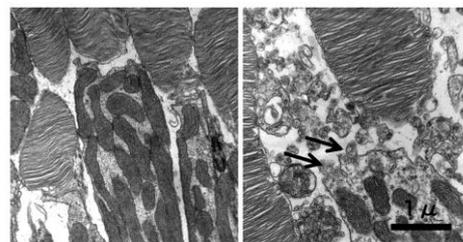


図 2: Tg ウサギの網膜の電子顕微鏡所見

(3) Tg ウサギの ERG は、生後 12 週の段階で

既に scotopic ERG は明らかに野生型ウサギのそれよりも小さく、週齢が進むにつれて ERG の振幅はさらに低下していた。Tg ウサギの ERG の異常は scotopic ERG でより明らかであり、photopic ERG の振幅は 48 週の時点でも比較的保たれていた。また、錐体成分よりも杆体成分の方が低下が強く、また a 波、b 波、OPs の順に障害が大きいことがわかった。

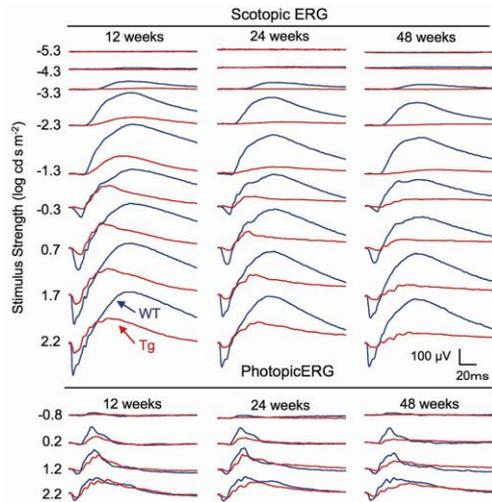


図 3: Tg ウサギの網膜電図 (ERG) 所見

さらに、Tg ウサギの変性早期では OPs が正常よりも増大しており、薬理的な実験により、その機序としてテロドトキシンに感受性のあるスパイク性ニューロンの活動増大が関与していることがわかった。

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 12 件) 全て査読有り

- (1) Nishida K, Kamei M, Kondo M, Sakaguchi H, Suzuki M, Fujikado T, Tano Y. Efficacy of suprachoroidal-transretinal stimulation in a rabbit model of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:2263-2268.
- (2) Koike C, Obara T, Uriu Y, Numata T, Sanuki R, Miyata K, Koyasu T, Ueno S, Funabiki K, Tani A, Ueda H, Kondo M, Mori Y, Tachibana M, Furukawa T. TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:332-337.
- (3) 近藤峰生. 網膜・視神経疾患動物モデルの網膜電図解析. *日眼会誌.* 2010;114:248-278.

(4) Yokoyama D, Machida S, Kondo M, Terasaki H, Nishimura T, Kurosaka D. Pharmacological dissection of multifocal electroretinograms of rabbits with Pro347Leu rhodopsin mutation. *Jpn J Ophthalmol.* 2010;54:458-466.

(5) Katoh K, Omori Y, Onishi A, Sato S, Kondo M, Furukawa T. Blimp1 suppresses Chx10 expression in differentiating retinal photoreceptor precursors to ensure proper photoreceptor development. *J Neurosci.* 2010;30:6515-6526.

(6) Omori Y, Chaya T, Katoh K, Kajimura N, Sato S, Muraoka K, Ueno S, Koyasu T, Kondo M, Furukawa T. Negative regulation of ciliary length by ciliary male germ cell-associated kinase (Mak) is required for retinal photoreceptor survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:22671-22676.

(7) Kurimoto Y, Kondo M, Ueno S, Sakai T, Machida S, Terasaki H. Asymmetry of focal macular photopic negative responses (PhNRs) in monkeys. *Exp Eye Res.* 2009;88:92-98.

(8) Kondo M, Sakai T, Komeima K, Kurimoto Y, Ueno S, Nishizawa Y, Usukura J, Fujikado T, Tano Y, Terasaki H. Generation of a transgenic rabbit model of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:1371-1377.

(9) Sakai T, Kondo M, Ueno S, Koyasu T, Komeima K, Terasaki H. Supernormal ERG oscillatory potentials in transgenic rabbit with rhodopsin P347L mutation and retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:4402-4409.

(10) Kondo M, Kurimoto Y, Sakai T, Koyasu T, Miyata K, Ueno S, Terasaki H. Recording focal macular photopic negative response (PhNR) from monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:3544-3550.

(11) Sugita T, Kondo M, Piao CH, Ito Y, Terasaki H. Correlation between macular volume and focal macular electroretinogram in patients with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:3551-3558.

(12) Sato S, Omori Y, Katoh K, Kondo M, Kanagawa M, Miyata K, Funabiki K, Koyasu T, Kajimura N, Miyoshi T, Sawai H, Kobayashi K, Tani A, Toda T, Usukura J, Tano Y, Fujikado T, Furukawa T. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat Neurosci.* 2008;11:923-931.

〔学会発表〕(計 10 件)

- (1) Kondo M. How to use electrophysiology and imaging for diagnosis of retinal diseases? (Symposium) 42th Congress of Asia-Pacific Academy of Ophthalmology. Beijing, China, Sep 20, 2010
- (2) Kondo M., Sugita T, Ito Y., Terasaki H. Assessment of macular function of retinitis pigmentosa using focal macular ERG. (Symposium) The 24th Congress of the Asia-Pacific Academy of Ophthalmology, 2009 May 18, Bali, Indonesia.
- (3) Kondo M., Sakai T, Komeima K., Ueno S, Terasaki H. Assessment of retinal function in genetically-engineered animal model of retinal degeneration. Korea-Japan Joint Symposium of Clinical electro-physiology of Vision. Urayasu, Japan, Oct 31, 2009.
- (4) Kondo M., Kurimoto Y, Terasaki H. Recording focal macular PhNR from monkeys. (Symposium) 18th International Congress for Eye Research. Beijing, China, September 28, 2008.
- (5) Kondo M., Ikenoya K, Terasaki H. Preservation of macular oscillatory potentials in eyes with retinitis pigmentosa with normal visual acuity. (Symposium) 18th International Congress for Eye Research. Beijing, China, September 28, 2008.

〔図書〕(計 4 件)

- (1) 近藤峰生：なぜ中心窩は凹んでいるのか？ 根木昭編。眼のサイエンス-視覚の不思議。140-141。文光堂、東京、2010。
- (2) 近藤峰生：杆体は暗所で錐体を抑制しているのか？ 根木昭編。眼のサイエンス-視覚の不思議。235。文光堂、東京、2010。
- (3) 近藤峰生：正常眼底にみえても視力が低下することがある。眼科検査のグノーティセアウトン。シナジー社、東京、217-223、2010。
- (4) 近藤峰生 電気生理学的検査。小児眼科診療 眼科プラクティス 20。樋田哲夫編、68-71, 2008。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 峰生 (KONDO MINEO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80303642

(2) 研究分担者

寺崎 浩子 (TERASAKI HIROKO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40207478

伊藤 逸毅 (ITO YASUKI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任准教

授

研究者番号：10313991

加地 秀 (KACHI SHU)

名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30345904

米今 敬一 (KOMEIMA KEIICHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40362256

(3) 連携研究者

なし