

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592229

研究課題名（和文）視細胞死の機構の詳細な解明とその阻止

研究課題名（英文）

The identification and prevention of the mechanism of photoreceptor cell death

研究代表者

辻川 元一（TSUJIKAWA MOTOKAZU）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70419472

研究成果の概要（和文）：我々はゼブラフィッシュ視細胞変異体 ovl を用いて、この変異体における視細胞死がフォトトランスダクションと関連すること、視細胞死のシグナルはトランSDューシンの位置でアデニルシクラーゼと連結し、下流の視細胞死のシグナルに伝播されることを示した。また、ヒトロドプシン変異体モデルを作成し、この系や色素変性モデルマウスにおいても同系が視細胞死に関連していることをしめし、この系が新たな治療ターゲットになることを示した。

研究成果の概要（英文）：

We revealed that zebrafish photoreceptor cell death model ovl shows photoreceptor cell death which relates phototransduction cascade. The cell death mechanism connects at transducine with phototransduction via adenylyl cyclase. Then we established RP zebrafish model which possesses human Q344X mutated rhodopsin. The mechanism of photoreceptor cell death was observed in this model and other mammalian RP model and will be a novel target of RP therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：ゼブラフィッシュ・網膜色素変性・フォトトランスダクション・神経保護・アデニルシクラーゼ

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は罹病率約1/4000の進行性遺伝性網膜疾患群で、これはわが国における失明の原因の第4位を占め、これによる患者と家族の苦難、また、社会的な損失はきわめて

大きいものがある。患者は10代から20代に夜盲の自覚で発症することが多く、それまでは、全く普通の視機能を有するが、徐々に周辺部の視野を失い、やがて失明に至る。これらの経過は視細胞の内、まず桿体細胞が変

性し、続いて錐体細胞が変性することによる。社会的な視力を担っているのは錐体細胞であるため、発症初期の段階で網膜色素変性の進行を停める、または、大幅に遅らすことが出来るならば、患者は残りの人生をほとんど不自由なく過ごせると考えられ、患者のQOL向上に大きく貢献することが期待される。この疾患群は遺伝子座異質性が極めて高いが、病因探求と治療を目指し、原因遺伝子の検索が精力的に行なわれ、現在までに数多くの原因遺伝子が単離された。しかしながら、期待された病因の解明には至らず、網膜色素変性における視細胞死がどのように引き起こされているのかはほとんど不明のままである。したがって、網膜色素変性に関する有効な治療法は現在のところ存在しなかった。

2. 研究の目的

現在のところ視細胞においては良いVivoの実験系が存在しない。したがって従来研究はマウス、特に遺伝子改変マウスを用いて行われることが多かった。しかしながら、前述のようにRPを引き起こす遺伝子座は多く、また、特に重要視されているロドプシン等ではアレルによりその病因的効果が大きく異なるであろうことが以前から指摘されており、このように広域にわたる変異についてそれぞれの変異マウスを作製し検討するのは事実上難しい。しかし、脊椎動物以外のモデルではCilia視細胞を持たないため限界がある。そこで我々は小型魚類であるゼブラフィッシュ実験系を本教室においても立ち上げ、このモデルを中心に研究を進めている。

我々の目的はこのような背景をもったモデルとしてのゼブラフィッシュを使用し、視細胞死のメカニズムを探求することにあつた。また、上記のような順遺伝学的手法のほかに、視細胞において逆遺伝学的手法を開発、使用することも副次目的である。特に今回はフォトトランスダクションと視細胞死のシグナルがどのように分子的に決定されているのかを決定し、これが、魚だけでなく哺乳類にも存在することを示すことが目的である。

3. 研究の方法

視細胞死の原因は詳細不明であるが、視物質の細胞内局在の変化が視細胞死を少なくとも促進していると考えられている。ロドプシンを含めた視物質は通常、視細胞外節に存在しているが、網膜色素変性の患者標本やモデルマウスにおいてこの局在が崩れているというデータが複数報告されている。また、ロドプシンはその細胞内輸送にはそのアミノ末端の数アミノ酸が重要な働きを担うが、この部分に変異をきたしたロドプシンは、そ

の生化学的な機能は正常であるにもかかわらず、細胞内局在の異常を来し、網膜色素変性に至る。興味深いことに、網膜剥離や加齢黄斑変性といった遺伝性網膜疾患以外の疾患でも、視細胞死に先立ってロドプシンの局在異常が観察されるという報告があり、視物質の細胞内局在の変化が視細胞死を促進するという根拠の一つになっている。

我々が解析した *ov1* 変異体は視細胞の外節が全く発生せず、これによりロドプシンは視細胞の細胞膜全体に異所性に異常蓄積する。我々はこれが視細胞死を引き起こすメカニズムの一つと考え、これを証明するために、変異体においてロドプシンの発現を抑制した。すると、ロドプシンを抑制した場合、変異体の視細胞死は明らかに抑制された。つまり、ロドプシンの細胞内局在の変化は視細胞死を促進していると考えられる。我々はこの *ov1* 変異体をモデルに、ゼブラフィッシュにおける逆遺伝学的手法を用いて異所性ロドプシンとフォトトランスダクションの関係、そして、そのシグナルが視細胞死を引き起こすに至るメカニズムを解明した。また、この系が *ov1* だけでなく、ヒト網膜色素変性でも機能していることを示すため、まず、ヒドロロドプシン変異 Q344X を持つヒドロロドプシントランスジェニック体を作成した。この系とマウス色素変性モデル *rd17* において同系が動いているかを検討した。

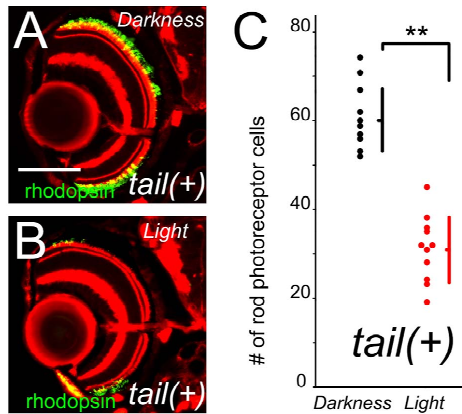
4. 研究成果

Ov1 において異所性ロドプシンをモルフォリノを用いてノックダウンした場合、視細胞死は有意に抑制された。さらに、*ov1* において、視細胞死は光感受性を示したことから、この視細胞死はフォトトランスダクション系を解することが示唆された。

次に、フォトトランスダクション系がどこまで関与するかを調べるため、次の段階であるトランデュースをノックダウンしたところ、同様に有意な視細胞死の抑制を認めた。これに対し、次の段階であるフォスフォジエステラーゼをモルフォリノにてノックダウンしても、視細胞死の抑制効果は認められなかった。このモルフォリノはフォスフォジエステラーゼの発現は効率的に抑制していた。これらの結果から、視細胞死のシグナルはトランデュースの位置でフォトトランスダクションのシグナルと連結していると考えられた。

ここでフォスフォジエステラーゼは G タンパク受容体のエフェクター分子であるため、他のエフェクター分子とのミスマッチを想定した。発現解析からこのようなエフェクターの一つアデニリルシクラーゼは外節に発現しておらず、強力な候補と考えられた。この阻害剤 SQ22536 は *ov1* における視細胞死を抑制し、逆に動作薬 Forskolin は *ov1* における

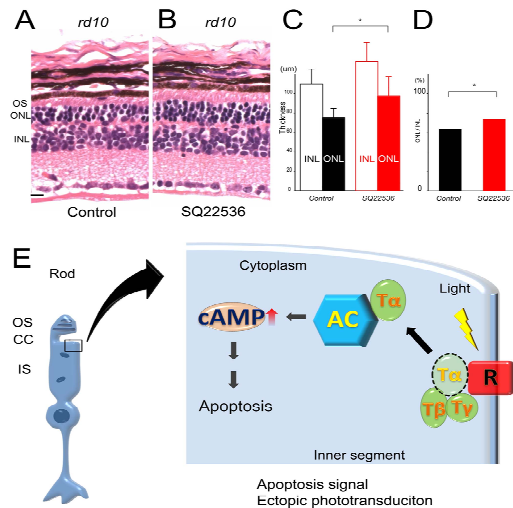
視細胞死を促進するだけでなく、野生型においても視細胞の数を減少させていた。さらにアデニルシクラーゼを外節に強制発現させるトランスジェニック体を開発すると、子のトランスジェニックにおいても視細胞死が有意におこっており、かつ、この視細胞死は光感受性であった。(図)また、正常視細胞に細胞透過性 cAMP ホモログを投与すると



視細胞死が起きたが、同様の cGMP ホモログではそのようなことは認められなかった。また、アデニルシクラーゼの主な下流の一つ PKA を阻害すると視細胞死は抑制された。したがって、ov1 においては異所性視物質の蓄積がアデニルシクラーゼの活性化を引き起こし、これが視細胞死を促進していることが示された。

これがシリア変異モデルである ov1 だけの減少でないことを示すためにまず、ヒト変異ロドプシン Q344X を導入したトランスジェニック体をを作成した。この魚は受精後 5 日目より視細胞死の減少をしめし、これはアポトーシスの更新によることがしめされた。よって、この魚はヒト網膜色素変性の病態をよく模倣していた。この魚においても視細胞死は光感受性を示し、トランスジェニックのノックダウンは視細胞死を抑制したが、フォスホジエステラーゼのノックダウンは視細胞死に影響しなかった。また、SQ22586 は視細胞死を抑制した。また、哺乳類網膜色素変性モデル rd10 マウスにおいても SQ22586 は視細胞死抑制を示した。(図)

このことより、視物質の局在異常からアデニルシクラーゼの異所性活性は色素変性における視細胞死のシグナルの一部を構成し、あらたな治療ターゲットとして重要であると考えられた。



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 19 件)

1. Nakao T, Tsujikawa M, Notomi S, Ikeda Y, Nishida K. The role of mislocalized phototransduction in photoreceptor cell death of retinitis pigmentosa. PLoS One. 2012;7:e32472. 査読有
2. Sasamoto Y, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Nishida K. Effect of 1-year lutein supplementation on macular pigment optical density and visual function. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2011 249:1847-54 査読有
3. Wakabayashi T, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Nishida K. Intravitreal bevacizumab for exudative branching vascular networks in polypoidal choroidal vasculopathy. Br J Ophthalmol. 2011 in press 査読有
4. Yamamoto T, Kamei M, Sayanagi K, Matsumura N, Nishida K, Sakaguchi H, Tsujikawa M, Tano Y. Simultaneous intravitreal injection of triamcinolone acetonide and tissue plasminogen activator for central retinal vein occlusion: a pilot study. Br J Ophthalmol. 2011 95:69-73 査読有
5. Sasamoto Y, Gomi F, Sawa M, Sakaguchi H, Tsujikawa M, Nishida K. Effect of Cataract in Evaluation of Macular Pigment Optical Density Using Autofluorescence Spectrometry. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52:927-32 査読有
6. Tsujikawa M, Maeda N, Tsujikawa K, Hori H, Inoue T, Nishida K. Chromosomal sharing in atypical cases of gelatinous drop-like corneal dystrophy. Jpn J Ophthalmol. 2010

- 54:494-8 査読有
7. Nakatsukasa M, Kawasaki S, Yamasaki K, Fukuoka H, Matsuda A, Tsujikawa M, Tanioka H, Nagata-Takaoka M, Hamuro J, Kinoshita S. Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 2 Is Required for the Proper Subcellular Localization of Claudin 1 and 7. Implications in the Pathogenesis of Gelatinous Drop-Like Corneal Dystrophy. *Am J Pathol.* 2010 177:1344-55. 査読有
 8. Gomi F, Sawa M, Wakabayashi T, Sasamoto Y, Suzuki M, Tsujikawa M. Efficacy of intravitreal bevacizumab combined with photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy. *Am J Ophthalmol.* 2010 150:48-54. 査読有
 9. Wakabayashi T, Sawa M, Gomi F, Tsujikawa M. Correlation of fundus autofluorescence with photoreceptor morphology and functional changes in eyes with retinitis pigmentosa. *Acta Ophthalmol.* 2010;88:177-83 査読有
 10. Sasamoto Y, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Hamasaki T. Macular Pigment Optical Density in Central Serous Chorioretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51:2519-25 査読有
 11. Suzuki M, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Sakaguchi H. Bevacizumab treatment for choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration in Japanese patients. *Jpn J Ophthalmol.* 2010 ;54:124-8 査読有
 12. Inoue R, Sawa M, Tsujikawa M, Gomi F. Association between the efficacy of photodynamic therapy and indocyanine green angiography findings for central serous chorioretinopathy. *Am J Ophthalmol.* 2010;149:441-6. 査読有
 13. Sayanagi K, Ikuno Y, Soga K, Wakabayashi T, Tsujikawa M, Tano Y. Choroidal vascular hypofluorescence in indocyanine green angiography of high myopia. *Br J Ophthalmol.* 2009 93:1687-90 査読有
 14. Sawa M, Gomi F, Tsujikawa M, Sakaguchi H, Tano Y. Long-term results of intravitreal bevacizumab injection for choroidal neovascularization secondary to angioid streaks. *Am J Ophthalmol.* 2009 148:584-590 査読有
 15. Shima C, Gomi F, Sawa M, Sakaguchi H, Tsujikawa M, Tano Y. One-year results of combined photodynamic therapy and intravitreal bevacizumab injection for retinal pigment epithelial detachment secondary to age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009 247:899-906 査読有
 16. Bessho K, Gomi F, Harino S, Sawa M, Sayanagi K, Tsujikawa M, Tano Y. Macular autofluorescence in eyes with cystoid macula edema, detected with 488 nm-excitation but not with 580 nm-excitation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009 247:729-34 査読有
 17. Ikuno S, Sayanagi K, Soga K, Sawa M, Tsujikawa M, Gomi F, Tano Y. Intravitreal Bevacizumab for Choroidal Neovascularization Attributable to Pathological Myopia: One-Year Results. *Am J Ophthalmol.* 2009;147:94-100 査読有
- [学会発表] (計 38 件)
1. Tsujikawa M. Light dependent photoreceptor cell death in retinitis pigmentosa model fish APAO Sydney オーストラリア 2011/3/22
 2. 後藤聡、相馬剛至、辻川元一、松下賢治、三木篤也、高静花、前田直之、西田幸二 落屑症候群における角膜内皮細胞数の変化 第 35 回日本角膜学会 2011 年 2 月 17 日 東京
 3. 高静花、相馬剛至、渡辺仁、堀裕一、辻川元一、前田直之、西田幸二 ドライアイに対する涙点プラグの長期的効果 第 35 回日本角膜学会 2011 年 2 月 17 日 東京
 4. 辻川元一、西田幸二 TACSTD2 遺伝子の系統発生学上の特徴 第 35 回日本角膜学会 2011 年 2 月 17 日 東京
 5. 上野千佳子、五味文、沢美喜、辻川元一、西田幸二 ベバシズマブからラビニズマブへ治療移行した加齢黄斑変性奨励の網膜厚測定 第 49 回日本網膜硝子体学会総会 2010 年 11 月 26 日 大阪
 6. 湊端睦、高静花、東浦律子、戸田良太郎、相馬剛至、辻川元一、前田直之、不二門尚、西田幸二 短焦点高速型波面センサーを用いた点眼後眼球高次収差の測定 第 64 回日本臨床眼科学会総会 2010 年 11 月 13 日 神戸
 7. 黒田聡、五味文、沢美喜、辻川元一、西田幸二 フィブリン滲出を伴う中心性漿液性脈絡網膜症に対する光線力学的療法 第 64 回日本臨床眼科学会総会 2010 年 11 月 11 日 神戸
 8. 五味文、沢美喜、辻川元一、西田幸二 ルテイン内服による正常眼の視機能への効果 第 64 回日本臨床眼科学会総会 2010 年 11 月 11 日 神戸
 9. 高静花、湊端睦、東浦律子、相馬剛至、戸

- 田良太郎、辻川元一、前田直之、西田幸二
ドライアイにおける、前眼部 OCT による涙
液メニスカスの観察 第 64 回日本臨床眼
科学会総会 2010 年 11 月 11 日 神戸
10. 沢美喜、岩田英嗣、石川浩平、辻川元一、
五味文、寺崎浩子、西田幸二、濱崎俊光
異なる治療間隔で施行したベバシズマブ
併用光線力学療法と比較検討 第 64 回日
本臨床眼科学会総会 2010 年 11 月 11 日
神戸
 11. 鈴木三保子、五味文、沢美喜、辻川元一、
西田幸二 滲出型加齢黄斑変性に対する
ベバシズマブ投与の 2 年経過 第 64 回日
本臨床眼科学会総会 2010 年 11 月 11 日
神戸
 12. 辻川元一、沢美喜、五味文、白神史雄、
高橋寛二、大路正人、西田幸二 加齢黄斑
変性に対する HLA*A 拘束性抗 VEGFR ワクチ
ン治療の第 I 相臨床試験 第 64 回日本臨
床眼科学会総会 2010 年 11 月 11 日 神戸
 13. 辻川元一、沢美喜、五味文、白神史雄、
高橋寛二、大路正人、西田幸二 加齢黄斑
変性に対する HLA*A 拘束性抗 VEGFR ワクチ
ン療法の第 I 相試験 第 64 回日本臨床眼
科学会 2010 年 11 月 11 日 神戸
 14. Kuroda S, Ikuno Y, Yasuno Y, Sawa M,
Tsujikawa M, Nishida K Choroidal
Findings of Central Serous
Chorioretinopathy Using
High-penetration OCT with a 1- Micron
Band 2010 American Academy of
Ophthalmology 2010/10/16 Chicago アメリカ
 15. Ikuno Y, Sawa M, Tsujikawa M, Gomi F,
Maeda N Effect of 1.25% Povidone-Iodine
Combined with Topical Levofloxacin on
Conjunctival Flora in Patients
Undergoing Intravitreal Injection. 2010
American Academy of Ophthalmology
2010/10/16 Chicago アメリカ
 16. Tsujikawa M Experimental Models of
Retinitis Pigmentosa in Zebrafish
Symposium Advances in the molecular
biology of macular diseases. APAO 2010
Beijing 中国 2010/9/18
 17. Sawa M, Sasamoto Y, Tsujikawa M, Gomi
F Correlation of macular pigment
distribution in type 2 idiopathic
macular telangiectasia and morphologic
abnormalities detected by
spectral-domain OCT 2010 年 6 月 7 日 WOC
Berlin ドイツ
 18. Nakao T, Tsujikawa M Photoreceptor
Cell Death in a Zebrafish Model of
Autosomal Dominant Retinitis
Pigmentosa 2010 年 6 月 7 日 WOC
Berlin ドイツ
 19. Tsujikawa M, Sasamoto Y, Matsumura B,
Nakao T Generation of transgenic
zebrafish lines with human rhodopsin
mutations (Best Poster Award) 2010 年
6 月 7 日 WOC Berlin ドイツ
 20. Suzuki M, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M.
Comparison of intravitreal
bevacizumab alone versus combined with
photodynamic therapy for small CNV
lesions of age-related macular
degeneration 2010 年 6 月 7 日 WOC
Berlin ドイツ
 21. Ikuno Y, Yasuno Y, Sawa M, Tsujikawa M,
Gomi F High-speed, high-penetration,
swept-source optical coherence
tomography at 1 micrometer wavelength
band for posterior eye diseases. 2010
年 6 月 7 日 WOC Berlin ドイツ
 22. Sasamoto Y, Nakao T, Matsumura N,
Tsujikawa M. Generation of Transgenic
Zebrafish Lines With Human Rhodopsin
Mutations ARVO 2010 年 5 月 3 日 アメリカ
 23. Kuroda S, Ikuno Y, Sawa M, Tsujikawa M,
Gomi F, Yasuno Y. Choroidal Thickness
Measurement in Central Serous
Chorioretinopathy Using
High-Penetration Optical Coherence
Tomography ARVO 2010 年 5 月 3 日 アメリカ
 24. Kawasaki S, Nakatsukasa M, Yamasaki K,
Tsujikawa M et al. Tacstd2 Protein
Directly Binds to Claudin Proteins and
is Required for the Proper Subcellular
Localization of Tight Junction-Related
Proteins; Roles of Tacstd2 Protein in
the Pathogenesis of Gelatinous
Drop-Like Dystrophy ARVO 2010 年 5 月 3
日 アメリカ
 25. Suzuki M, Tsujikawa M, Itabe H, Sonoda
K-H, Egashira K, Kamei M. The
Involvement of Oxidized Phospholipids
in Choroidal Neovascularization ARVO
2010 年 5 月 3 日 アメリカ
 26. Matsumura N, Tsujikawa M, Xie P, et al.
Lipopolysaccharide Pretreatment
Suppresses Choroidal
Neovascularization ARVO 2010 年 5 月 3 日
アメリカ
 27. Nakao T, Tsujikawa M.
Phototransduction and Photoreceptor
Cell Death Are Closely Related in a
Zebrafish Model of Autosomal Dominant
Retinitis Pigmentosa ARVO 2010 年 5 月
3 日 アメリカ
 28. 佐々本弦、五味文、坂口裕和、松下賢治、
橋田徳康、辻川元一 眼底自発蛍光を応用
した黄斑色素測定における白内障の影響
第 114 回日本眼科学会総会 2010 年 4 月
17 日 東京

29. 沢美喜、佐々本弦、辻川元一、五味文
Heterochromatic Flicker Photometry 法による黄斑色素測定 第114回日本眼科学会総会 2010年4月17日 東京
30. 中司美奈、川崎諭、山崎健太、福岡秀記、松田彰、辻川元一、谷岡秀敏、永田真帆、羽室淳爾、木下茂 TACSTD2 の対とジャンクションにおける機能的意義 第114回日本眼科学会総会 2010年4月16日 東京
31. 上田朋子、五味文、鈴木三保子、沢美喜、坂口裕和、大島祐輔、生野恭司、辻川元一、瓶井資弘、日下俊次 黄斑浮腫を伴う網膜静脈分子閉塞賞の浮腫形態別の予後 第114回日本眼科学会総会 2010年4月15日 東京
32. 佐柳香織、五味文、沢美喜、坂口裕和、辻川元一 抗 VEGF 両方の1年間の試行回数に影響を与える spectral-domain OCT 所見 第114回日本眼科学会総会 2010年4月15日 東京
33. 黒田聡、生野恭司、沢美喜、辻川元一、五味文、安野嘉晃 高侵達光干涉断層計を用いた中心性漿液性網脈絡膜症の脈絡膜厚計測 第114回日本眼科学会総会 2010年4月15日 東京
34. 中尾武史、辻川元一、松村永和、佐々本弦 ゼブラフィッシュ変異体 ov1 における視細胞死を引き起こすメカニズム 第114回日本眼科学会総会 2010年4月15日 東京
35. 辻川元一、中尾武史、松村永和、佐々本弦、田野保雄 ヒトロドプシン変異を導入したトランスジェニック魚の作出 第114回日本眼科学会総会 2010年4月15日 東京
36. 辻川元一 ちゃんとできる DNA クローニング シンポジウム、第114回日本眼科学会総会 2010年4月15日 東京
〔図書〕(計1件)
1. 大路正人、五味文、辻川元一 他. 医薬ジャーナル社. 加齢黄斑変性 (2009). 79.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻川元一 (TSUJIKAWA MOTOKAZU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70419472

(2) 研究分担者

中尾 武史 (NAKAO TAKESHI)
大阪大学・医学部附属病院・医員
(H23 から研究分担者として参画)
研究者番号：00611170

(3) 連携研究者

なし ()