

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09710

研究課題名(和文)分泌されたEYSが網膜色素上皮細胞の貪食能にあたる影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effect of secreted EYS on the phagocytosis of retinal pigment epithelial cells.

研究代表者

梶田 敬介 (KAJITA, Keisuke)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：10896765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性(RP)は網膜視細胞が進行性に傷害される難治性疾患であり、その治療開発が待望されている。EYS(eyes shut homolog)は日本人におけるRPの約3割を占める重要な原因遺伝子だが、その機能に関する研究は驚くほど少なくRP病態におけるEYSの役割は明らかではない。これまでの研究からEYSは視細胞外節に局在し、外節構造の維持に関与すると考えられていた。しかし本研究では、「EYSは視細胞外に分泌されRPEの貪食能を制御している」という新しい機能の可能性を示唆している。EYSを異所的に発現させる補充療法など、EYS関連RPの新しい有効な治療方の開発へ繋がる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RP患者におけるEYS遺伝子の変異は数多くの論文で示されているが、EYSの機能解析については技術的な観点から困難とされてきた。そのため過去の研究は、EYSノックダウンによる網膜形態の変化や結合タンパク質から機能を推察している。本研究は我々の予備実験の結果導きだされた独自の仮説に基づく新しいアプローチである。本研究により、EYSは細胞外分泌タンパクとしてRPEの貪食能を制御する可能性が示唆された。これまで、EYS関連RPの治療には遺伝子治療が効果的であると考えられてきた。本研究により、EYS関連RPの病態解明がすすみ、EYSを異所的に発現させる補充療法など新しい治療を提供できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Retinitis pigmentosa (RP) presents a significant challenge due to its relentless progression, causing degeneration of retinal photoreceptor cells, while effective therapeutic interventions remain elusive. The precise role of EYS in RP pathology has been a subject of uncertainty. Prior research indicates EYS's localization within the outer segment of photoreceptors and its involvement in maintaining structural integrity. However, our current investigation unveils a potential novel function for EYS. Our findings suggest its extracellular secretion and role in modulating retinal pigment epithelium (RPE) phagocytosis. This revelation holds promise for pioneering new therapeutic avenues targeting EYS-related RP. Strategies like ectopic expression of EYS for replacement therapy emerge as plausible interventions to explore further.

研究分野：眼科

キーワード：網膜色素変性 EYS 網膜色素上皮

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性 (RP; retinitis pigmentosa) は網膜視細胞が進行性に傷害される難治性遺伝性神経変性疾患であり、その治療開発が待望されている。EYS (eyes shut homolog) は日本人におけるRPの約3割を占める重要な原因遺伝子だが、その機能に関する研究は驚くほど少なくRP病態におけるEYSの役割は明らかではない。EYS遺伝子は6q12染色体上の200万塩基という長大な領域を占めており、3165アミノ酸残基からなる巨大タンパク質をコードしている。RPの原因となる変異部位は遺伝子全体に渡っており重要ドメインの予測が困難なこと、生体機能の解析に汎用されるげっ歯類にはEYSが存在しないことなどからEYSの機能に関する研究は少ない。

正常ゼブラフィッシュでは、Eys タンパク質が視細胞の connecting cilium/transition zone (CC/TZ)や視細胞外節への局在が認められたが、その局在は一定ではなかった。近年の報告では、*ey*s 遺伝子をノックアウトしたゼブラフィッシュは視細胞外節と内節間の ciliary pocket 構造が認められず、RP 様の網膜変性を示した (Muriel M et al. PLoS One, 2018)。EYS は ciliary pocket の構造維持に重要な役割を持つことが示唆されるものの、EYS 関連 RP 患者由来 iPS 細胞から作成した網膜オルガノイドでは、視細胞変性が確認できなかった。ハエの *ey*s/spam は視細胞外に存在する分泌タンパク質として報告されていること (Simpla M et al. Developmental Biology, 2018) を鑑みると、RP 病態における EYS の視細胞外での役割が強く示唆された。これらの事実から、EYS は視細胞外に分泌されており、光環境に応じて局在がダイナミックに変化することにより視細胞維持に関与することが考えられる。

本研究における研究課題の核心をなす学術的問いは、「細胞外分泌タンパク」である EYS にどのような役割があるのか、である。

2. 研究の目的

Prominin-1 (PROM1) は視細胞外節の円盤膜に局在し、外節構造を維持している。*Prom1* ノックアウトマウスでは網膜変性が惹起され、ヒトでも *PROM1* 遺伝子変異は RP や Stargardt 様網膜変性の原因となることが知られている。PROM1 は RPE にも発現しており、mTOR シグナルを介して RPE のオートファジーや貪食能を制御することが示唆されている。さらにハエでは *ey*s が *prom1* と結合し複眼構造の維持に関与することが知られており、近年ヒトでも EYS と PROM1 の相互作用が示唆された (Jing N et al. Developmental Biology, 2012)。

これらの事実から、「光刺激により分泌された EYS は RPE に発現する PROM1 と相互作用することで、RPE の

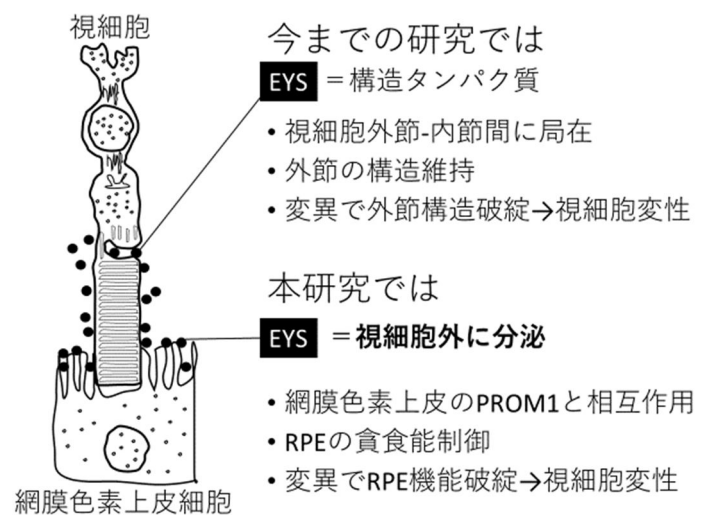


図1 本研究での仮説

EYS は視細胞外節や外節-内節間に局在し、外節構造を維持すると考えられている。本研究では、EYS は細胞外に分泌され RPE 貪食能を制御すると仮説を立て、EYS の RPE に対する役割を検討する。

貪食能を制御しているのではないか」という仮説を立てた。本研究の目的は、EYS の RPE に対する役割を検討することである（図 1）。

3．研究の方法

課題 1．光刺激時における EYS と PROM1 の局在解析

明順応・暗順応させたゼブラフィッシュの眼組織およびブタ網膜組織の切片を作成し、抗 EYS 抗体と抗 PROM1 抗体を用いて免疫組織染色を行う。これにより EYS の局在が明順応・暗順応で変化していること、RPE 周辺での PROM1 と共局在していることを明らかにする。免疫染色には市販されている抗 EYS 抗体と、科学研究費助成事業研究活動スタート支援 16H07505 で作成した抗 EYS 抗体を用いる。両抗体ともウエスタンブロットと免疫染色でシグナルを確認している。

課題 2．EYS 存在下での RPE 貪食能変化の検討

下記の手順で RPE 細胞を分泌 EYS と共培養し、貪食能を評価する。これにより、培養液中に分泌された EYS が RPE の貪食能に与える影響を明らかにする。

- (1) FLAG ペプチドが融合した EYS を発現するプラスミドを作成する。
- (2) プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、抗 FLAG 抗体を用いてウエスタンブロットまたはドットブロットを行い、細胞内および培養液中の EYS 発現を確認する。
- (3) EYS が分泌された培養液を添加し、RPE 細胞の貪食能変化を評価する。

実験には Lonza 社 human RPE 細胞と、iPS 細胞（253G1）から分化させた RPE 細胞を用いる。貪食能の評価については、蛍光ラベルしたブタ網膜外節を RPE に貪食させた後にフローサイトメトリーで分別することで、RPE の貪食能を評価する。

4．研究成果

課題 1 については、明順応させたゼブラフィッシュの眼組織およびブタ網膜組織の切片を作成し、抗 EYS 抗体と抗 PROM1 抗体を用いて免疫組織染色を行った。ゼブラフィッシュでは抗 EYS 抗体、抗 PROM1 抗体がワークしなかった。ブタ網膜では蛍光を確認でき、EYS が視細胞外に分泌されていることが確認できた。抗 PROM1 抗体はゼブラフィッシュと同様にワークせず、PROM1 と EYS の共局在は解析できなかった。作成した抗 EYS 抗体が他種でもワークすることを確認できたため、現在は新たなモデル動物の検索を行っている。引き続き、新たなモデル動物でも EYS と PROM1 の局在解析を行う予定である。

課題 2 については、iPS-RPE 細胞を分泌 EYS と共培養し、貪食能を評価した。これにより、培養液中に分泌された EYS が RPE の貪食能に与える影響を明らかにしたいと考えた。まず、FLAG ペプチドが融合した EYS を発現するプラスミドを作成した。HEK293T 細胞にトランスフェクションし、ウエスタンブロットを行い抗 FLAG 抗体と抗 EYS 抗体の両方で過剰発現できていることを確認した。また同時に培養液を回収し、培養液中にも FLAG ペプチドが融合した EYS が発現していることが確認できた。

このことから、培養細胞において EYS は細胞外に分泌されている可能性が示唆された。抗 FLAG 抗体ビーズを用いて、培養液中の FLAG ペプチドが融合した EYS を回収し濃縮することに成功した。貪食能の評価については、蛍光ラベルしたブタ網膜外節 (POS) を独自に作成した。上記で作成した FLAG-EYS の存在下で POS を RPE に貪食させ、RPE の貪食能をフローサイトメトリーを用いて評価した (図 2)。その結果、培養液中に EYS が存在した場合、RPE の貪食能が低下することがわかった。このことから、細胞外に分泌された EYS は RPE の貪食能を制御している可能性が示唆された。

RP 患者における EYS 遺伝子の変異は数多くの論文で示されているが、EYS の機能解析については技術的な観点から困難とされてきた。本研究により EYS の機能解明と遺伝子変異による病態解明がすすみ、新しい治療標的を提供できる可能性がある。これまで、EYS 関連 RP の治療には遺伝子治療が効果的であると考えられてきた。しかし、EYS が分泌タンパク質であるならば、EYS を異所的に発現させるなど補充療法が有効と考えられる。本研究は EYS 関連 RP の新しい治療へ繋がる可能性がある。



図 2 RPE 貪食能の解析

蛍光ラベルしたブタ網膜外節を取り込んだ RPE 細胞にシグナルが確認できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	大西 暁士 (ONISHI Akishi) (70569102)	立命館大学・総合科学技術研究機構・教授 (34315)	
研究分担者	前田 亜希子 (MAEDA Akiko) (40776423)	立命館大学・総合科学技術研究機構・教授 (34315)	

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