

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2021～2022
課題番号：21K20982
研究課題名（和文）複数の細胞を系統追跡可能な遺伝子改変マウスを用いた重症網膜疾患の病態解明の試み

研究課題名（英文）Elucidation of pathology in severe retinal disease using dual lineage-tracing technology

研究代表者
田崎 邦治（TASAKI, Kuniharu）

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：60905983
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：Rlbp1遺伝子の下流にCreERT2システムを利用し、タモキシフェン投与によりCreの発現するマウスを作成した。このマウスをfloxマウスと交配させることで、繊維化するミュラー細胞の追跡や、任意の遺伝子の発現レベルの調節等が可能になる。また重症網膜疾患を再現する繊維化黄斑変性症モデル、重症網膜剥離モデルを作成し、さらにその作成条件の効率化に関する検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ミュラー細胞を追跡可能な新規遺伝子改変マウスを作成した。ミュラー細胞はゼブラフィッシュなどでは網膜を再生する過程でリプログラミングすると言われている細胞であり、哺乳類のミュラー細胞はなぜ同様の障害を受けると繊維化し視力を障害する方向へと機能が向かうのか、視力の回復へ向けて機能を転換させることができるのか、今後検証していく礎となることを期待している。また効率的にマウスの重症網膜疾患を再現する方法についても検討を重ねており、今後の動物実験の効率化が期待される。

研究成果の概要（英文）：Using the CreERT2 system downstream of the Rlbp1 gene, we generated Cre-expressing mice by tamoxifen administration. By mating this mouse with a flox mouse, it becomes possible to track fibrotic muller cells and regulate the expression level of any gene. In addition, we created fibrotic macular degeneration models and severe retinal detachment models that reproduce severe retinal diseases, and investigated the efficiency of their creation conditions.

研究分野：網膜疾患

キーワード：遺伝子改変マウス 重症網膜疾患 増殖硝子体網膜症 加齢黄斑変性

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症と黄斑変性症はそれぞれ日本人の失明原因の 12.8%、8.0%を占める。また網膜剥離の罹患患者数は昭和 59 年に 2,300 人であったのが平成 29 年には 6,300 人と増加しており、今後も近視人口と共に増加することが予測される。これらの疾患において視力が損なわれる大きな要因として、神経網膜の上下に増生する線維性組織が引き起こす神経障害が挙げられる。

こういった線維性組織の増生は、加齢黄斑変性症の最も有効な治療である抗 VEGF 薬や、網膜剥離の唯一の治療方法である手術の効果を減弱させ、失明に至る場合もある。手術で得られた線維性組織の解析により、網膜固有のグリア細胞であるミュラー細胞や、神経網膜を裏打ちする網膜色素上皮細胞が増殖・繊維化したものから構成されていると考えられている。しかしどのようにミュラー細胞や網膜色素上皮細胞が増殖・繊維化するのか、その過程を分子生物学的に検討した報告はない。人はミュラー細胞や網膜色素上皮細胞の増殖・繊維化が病態を悪化させる一方で、ゼブラフィッシュや一部の両生類ではこれらの細胞が視細胞へと分化し、神経再生により視力を回復させることが知られている。この違いを明らかにすることは、失明を防ぐ新たな治療戦略を開発するうえで大変有用であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は黄斑変性症や網膜剥離など、重症の網膜疾患においてミュラー細胞と網膜色素上皮細胞が増殖・繊維化する過程を検証し、制御を試みるための礎を築くことである。そこで重症網膜疾患を再現するモデルマウスの作成と、ミュラー細胞を追跡可能な遺伝子改変マウスの作成を行った。

3. 研究の方法

重症網膜疾患モデルマウスの確立

・繊維化黄斑変性症モデル

網膜へのレーザー凝固を行い、新生血管を惹起したという報告があり、同様のモデルの使用を試みる。しかし過去の報告では新生血管の増生の有無を黄斑変性症モデルとしての妥当性の根拠としており、繊維性組織の増生が効率的に起こらない可能性もある。レーザーの凝固条件などを変更し、適切なモデルの作成条件について検討する。

・重症網膜剥離モデル

手術により水晶体と硝子体を経角膜的に摘出し、網膜の一部を切除し網膜剥離を惹起すると、手術後 5 日前後で約半数のマウスに繊維性組織の増生を認めることを既に確認している。しかし網膜剥離モデルが適切に作成される可能性は現状半分以下であり、手術前に暗順応させることで網膜剥離を惹起できる可能性が高くなるか、検討を行った。

遺伝子改変マウスの作成

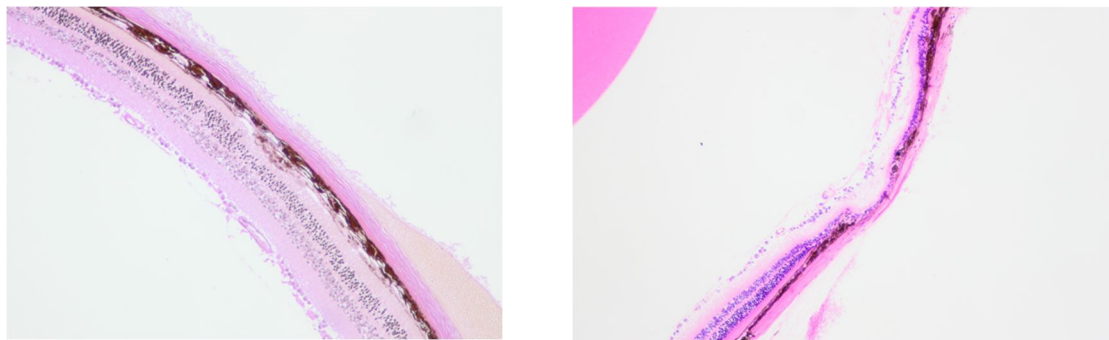
ミュラー細胞の組織特異的プロモーターである *R1bp1* 遺伝子の下流に CreERT2 システムを利用して、タモキシフェン投与により Cre の発現するマウスを作成することとした。

4. 研究成果

重症網膜疾患モデルマウスの確立

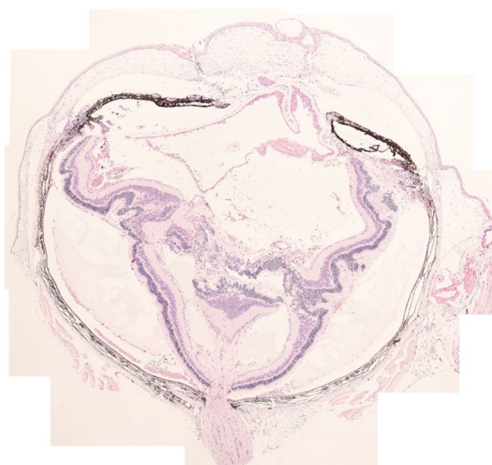
・ 繊維化黄斑変性症モデル

レーザーの power を 150mW (Green) spot size を 50 μ m、凝固時間を 0.3msec に設定した網膜へのレーザー凝固を行い、新生血管を惹起したものでは、レーザー後 1 ヶ月で下図(左)のように網膜色素上皮細胞が重層化し増殖している様子が確認された。しかしレーザーの power を 300mW 以上に設定すると下図(右)のように網膜、網膜色素上皮が萎縮してしまうため、繊維性増殖を再現することは難しいと考えられた。



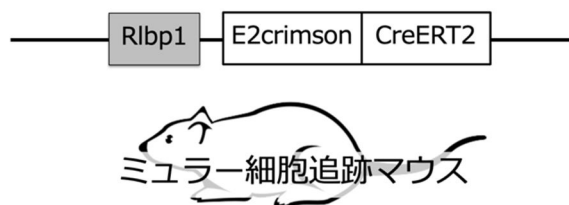
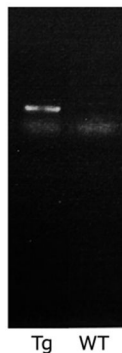
・ 重症網膜剥離モデル

ケタミンとキシラジンの2種混合麻酔を施したマウスの角膜を 2/3 程度切開し、眼球を圧迫し水晶体を圧出した。そのまま網膜剥離を発症する個体は、浮遊した網膜を部分切開、網膜剥離を発症しない個体は硝子体を吸引し網膜剥離を惹起して網膜を部分切開し、角膜を縫合し閉創した。手術前に 2 時間暗順応したものでは目的としたモデルを得られる確率は 67%、暗順応しなかったものでは 38%であった。



遺伝子改変マウスの作成

右図のように、*Rlbp1* 遺伝子の下流に CreERT2 システムを利用してし、タモキシフェン投与により Cre の発現するマウスを作成した。Flox マウスと交配させることで、繊維化するミュラー細胞の追跡や、任意の遺伝子の発現レベルの調節等が可能になる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tasaki Kuniharu, Nishimura Tomohisa, Hida Taro, Maruo Kazushi, Oshika Tetsuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Effects of Image Processing Using Honeycomb-Removal and Image-Sharpning Algorithms on Visibility of 27-Gauge Endoscopic Vitrectomy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 5666 ~ 5666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11195666	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 該当する

1. 著者名 Hoshi Sujin, Tasaki Kuniharu, Maruo Kazushi, Ueno Yuta, Mori Haruhiro, Morikawa Shohei, Moriya Yuki, Takahashi Shoko, Hiraoka Takahiro, Oshika Tetsuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Improvement in Dacryoendoscopic Visibility after Image Processing Using Comb-Removal and Image-Sharpning Algorithms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 2073 ~ 2073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11082073	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 該当する

〔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 田崎 邦治, 村上 智哉, 星 崇仁, 大鹿 哲郎
2. 発表標題 家兔外傷性視神経症モデルにおける対光反射計測値の経時変化
3. 学会等名 第76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
---------	---------