

## 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 6月27日現在

機関番号：82643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成22年度～平成23年度

課題番号：22791704

研究課題名（和文）HtrA1 高発現による AMD モデル動物の確立と AMD 発症機序の解析

研究課題名（英文）Establish model animal for AMD and Analysis of pathogenic mechanism of AMD

研究代表者

赤堀 正和 (AKAHORI MASAKAZU)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・分子細胞生物学研究部・流動研究員

研究者番号：30343544

研究成果の概要（和文）：

我々を含め、多くの研究グループから日本人に多い滲出型加齢性黄斑変性症と強く関連することが報告されている HtrA1 および ARMS2 遺伝子を高発現するトランスジェニックマウスの作製し、網膜に及ぼす影響を解析した。その結果、ARMS2 変異型トランスジェニックマウスで有意に血管新生が抑制された。本研究結果により、HtrA1 あるいは ARMS2 の遺伝子変化が新生血管誘導に及ぼす影響を見出すことが出来た。

研究成果の概要（英文）：

Age-related macular degeneration (AMD) is a common cause of blindness in the elderly. Genetic association in the 10q26 (ARMS2/HTRA1) region has been established in many ethnic groups for dry-type AMD, typical wet-type AMD. Here, we describe the phenotypic characteristics of transgenic mice overexpressing HtrA1 or ARMS2. As a result, a vascularization was decreased in ARMS2mut transgenic mice. We show that a gene change of HtrA1 or ARMS2 have an effect of a vascularization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：動物、細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (AMD) とは、目の内側の組織である網膜のほぼ中心に位置し視細胞が集中している部位である黄斑が、加齢に伴い

様々な異常をきたす疾患である。AMD は、欧米では高齢者の失明原因の1位となっており、我が国においても近年急増している。AMD は脈絡膜からの新生血管を伴う進行の

早い滲出型と、色素上皮細胞層とブルッフ膜の間に黄白色のドルーゼンと呼ばれる物質の沈着が起り色素上皮細胞の萎縮が起る萎縮型とに大別される。欧米では萎縮型が多く日本では滲出型が AMD 患者の大部分を占めることから、我が国においては、特に、この進行が早く失明にいたる可能性の強い滲出型 AMD の早期診断法の開発や発症機構の解明、および根本的な治療薬の開発が急務である。

AMD の危険因子として年齢・性別・喫煙歴があげられている一方、遺伝要因も AMD の発症に強く関与していることも知られており、欧米では全ゲノムを対象としてマイクロサテライトマーカーや一塩基多型(SNP)を用いた遺伝解析の研究成果が多数報告されている。しかしながら、前述したように欧米と日本を含むアジア人では AMD のタイプも異なり、遺伝解析結果も欧米人と日本人では必ずしも一致しないことが明らかとなっている(1; Okamoto et al. 2006)。

そこで、我々は日本人の滲出型 AMD 患者群 100 名と対照群 200 名を対象とした全ゲノム SNP 関連解析をおこなった。その結果、日本人滲出型 AMD のリスク変異としてセリンプロテアーゼの一つである HtrA1 のプロモーター領域に位置する SNP 変異のみが AMD と有意に関連することを見出した(2; Goto, Akahori et al. 2009)。しかしながら、この SNP は ARMS2 のアミノ酸置換を起こす SNP でもあることなどから、ARMS2 と HtrA1 のどちらが AMD のリスク因子なのか結論は未だ出ておらず、AMD 発症機構における HtrA1 あるいは ARMS2 のはたらきについて解明されることが待たれている。

そこでこれまでに、この HtrA1 と AMD 発症との関りについて検討するために、我々は HtrA1 高発現トランスジェニックマウスの作製を試み、複数の系統のトランスジェニックマウスを得ることが出来た。これらのトランスジェニックマウスについてドルーゼンや新生血管の有無など予備的な解析をおこなってきた結果、眼底撮影によりドルーゼン様の症状が観察され、HE 染色による形態観察により網膜に変性部位が認められた。

これらの研究成果から日本人に多い滲出型 AMD と強く関連する HtrA1 は、滲出型 AMD の発症に関与していることが強く考えられ、HtrA1 を高発現させたトランスジェニックマウスは滲出型 AMD の発症機構の解明に有用なモデル動物として利用できることが示唆された

## 2. 研究の目的

これまでに作製した HtrA1 トランスジェニックマウスをヒト AMD のモデル動物として

確立することを目的として、網膜および脈絡膜の形態や機能について詳細な解析をおこなう。すなわち、明視野眼底撮影、蛍光眼底造影撮影、網膜血管染色などをおこないトランスジェニックマウスの加齢に伴う網膜血管構造の変化について明らかにし、また、HtrA1 高発現により、レーザー照射により誘導される新生血管、光照射による網膜変性などについて野生型マウスとの比較検討をおこなう。これらの研究結果により、より有望なトランスジェニックマウスの系統の選別、およびヒト AMD とトランスジェニックマウスの網膜所見を比較検討をおこなうことによる新規 AMD モデル動物としての有用性の検討をおこなう。さらに、トランスジェニックマウス網膜の遺伝子発現解析をおこない HtrA1 高発現により発現が誘導されるもしくは抑制される因子を同定し、網膜変性時におけるこれらの因子の発現変動と局在変化および、HtrA1 との相互作用が新生血管誘導におよぼす影響について正常ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて *in vitro* で解析する。この新生血管誘導と関連する因子が同定されれば滲出型が多い日本人 AMD の新たな治療薬の標的として利用できると考えている。

## 3. 研究の方法

HtrA1 トランスジェニックマウスをヒト AMD のモデル動物として確立することを目的として、加齢マウスおよびレーザー照射マウス、光刺激マウスについて眼底観察、蛍光眼底造影、whole-mount 血管染色などの解析をおこない、高頻度で網膜の異常が観察されるトランスジェニックマウスの系統を選別し AMD モデル動物として確立する。また、HtrA1 高発現により誘導または抑制される因子の同定とその網膜変性時における発現および局在の変化、血管新生における作用を検討し、HtrA1 高発現による AMD 発症機序の解析をおこなう。

## 4. 研究成果

本研究では ARMS2wt、ARMS2mut トランスジェニックマウスを作製し、HtrA1 トランスジェニックマウスと比較することとした。トランスジェニックマウスについて眼底観察、網膜のパラフィン切片による形態観察、免疫染色をおこなったところ特に網膜の構造や眼底に異常は見いだせなかった。これらのことから黄斑変性の発症機構には ARMS2 の変異体より HtrA1 の発現量が影響を及ぼしていることが示唆された。

また、これまでに作成した HtrA1wt トランスジェニックマウス、ARMS2wt、ARMS2mut トランスジェニックマウスを用いてレーザー誘

導新生血管形成における HtrA1 および ARMS2 の影響について解析したところ、野生型マウスと比較し ARMS2mut トランスジェニックマウスのみが有意に新生血管が抑制されていた。さらに、眼球を摘出し、HE 染色による形態観察をおこなったところ、レーザーが照射されていない部位は顕著な変化を見いだせなかったが、ARMS2mut トランスジェニックマウスの新生血管誘導部位は他のマウスと比べると新生血管が抑制される傾向にあることが確認できた。ゲノム上の HtrA1, ARMS2 の部位が加齢性黄斑変性症の発症に強く関連することが分かっているが、未だその発症機構は明らかになっていない。今回本研究結果により、HtrA1 あるいは ARMS2 の遺伝子変化が新生血管誘導に及ぼす影響を見出すことが出来た。

#### 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 5 件)

1) Fujinami K, Akahori M, et. al. . Stargardt disease with preserved central vision: identification of a putative novel mutation in ATP-binding cassette transporter gene. *Acta Ophthalmologica*, 査読有, 2011 May;89(3):e297-8.

2) Chi ZL, Akahori M, et. al. Overexpression of optineurin E50K disrupts Rab8 interaction and leads to a progressive retinal degeneration in mice. *Human Molecular Genetics*. 査読有, 2010 Jul 1;19(13):2606-15.

3) Akahori M, Tsunoda K, et. al. Dominant mutations in RP1L1 are responsible for occult macular dystrophy. *American Journal of Human Genetics*. 査読有, 2010 Sep 10;87(3):424-9.

[学会発表] (計 4 件)

赤堀正和 その他、加齢黄斑変性医療に必要なゲノム学を理解しよう、第 65 回日本臨床眼科学会、東京、2011 年 10 月

赤堀正和 その他、オカルト黄斑ジストロフィー (Occult Macular Dystrophy) の原因遺伝子解明、第 115 回日本眼科学会総会、東京、2011 年 5 月

Akahori M et. al., Dominant Mutations In

RP1L1 Are Responsible For Occult Macular Dystrophy, 2011 Annual Meeting, Association of Research in Vision and Ophthalmology, MAY, 2011, Ft. Lauderdale, USA

赤堀正和 その他、加齢黄斑変性症およびボリーブ状脈絡膜血管症 における全ゲノム関連解析、感覚器シンポジウム、東京、2010 年 3 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
[http://www.kankakuki.go.jp/lab\\_e.html](http://www.kankakuki.go.jp/lab_e.html)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤堀 正和 (AKAHORI MASAKAZU)

独立行政法人国立病院機構 (東京医療センター臨床研究センター)・分子細胞生物学研究部・流動研究員  
研究者番号：30343544

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

