

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23791977

研究課題名（和文） 腫瘍関連網膜症の新たな診断法の確立と病態の解明

研究課題名（英文） Developing a method for diagnosis of cancer associated retinopathy and investigation of its pathology

研究代表者

上野 真治 (UENO SHINJI)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80528670

研究成果の概要（和文）：今回の研究では、私は腫瘍関連網膜症の中で双極細胞の機能不全を生じる患者の血清中の自己抗体及びその作用につき検討した。私は9人中2人の患者に TRPM1 と呼ばれる ON 型双極細胞のイオンチャンネルに対する自己抗体を検出した。そのうちの一人の血清をマウス硝子体内に投与したところ、血清投与後 5 時間で双極細胞の変性を生じることを発見した。このことより患者は、血清中の抗 TRPM1 抗体を介して、ON 型双極細胞の変性を生じ機能不全を生じていることが推測された。私が行った患者血清のマウス硝子体内に投与後、網膜電図と組織切片の検討という方法が一部の腫瘍関連網膜症の診断に有用であることが分かった。ON 型双極細胞の特異的な変性は今まで報告がなく、新しい発見である。

研究成果の概要（英文）：In this study I evaluated serum of the paraneoplastic retinopathy patients who had retinal ON bipolar dysfunction. I found two patients who had anti-TRPM1 antibodies. I injected sera from one of the patients to mice intravitreally. I discovered the sera caused acute retinal ON bipolar cell death. From our results we suggested retinal dysfunction of the patients were caused by retinal ON bipolar degeneration. We also found intravitreal injection of the serum of paraneoplastic retinopathy patients to mouse eye had a potential to elucidate the mechanisms the diseases. This ON bipolar specific degeneration is a novel finding.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：腫瘍関連網膜症、網膜電図、細胞死、自己抗体、双極細胞

1. 研究開始当初の背景

腫瘍関連網膜症は、網膜の視細胞や双極細胞に対する自己抗体により、比較的急な網膜機能障害を生じる疾患である。原因は悪性腫瘍に伴う自己抗体の発現であるが、眼所見が初発のこともあり早期の診断が重要である。発症機序に関しては、視細胞に対する自己抗体が生じた場合には視細胞の細胞死を生じることが分かっているが、双極細胞に対する自己抗体が生じた場合、細胞死が起きるのかそれとも中和抗体により機能が障害されているのか不明であった。

2. 研究の目的

目的は腫瘍関連網膜症と考えられる患者で視細胞または双極細胞の機能不全が生じている患者の血清を用いて、血清中の自己抗体の確認法とその血清の作用機序の開発することであった。患者血清をマウスの硝子体内に投与して、その機能の変化もしくは組織学的変化を検討し、血清の作用を *in vivo* で確認することである。またこの方法がどのくらいの患者の病態解明を可能にするか検討することであった。

3. 研究の方法

名古屋大学もしくは全国の大学病院を受診した腫瘍関連網膜症患者の血清 13 検体を検討した。視細胞の機能不全の 4 検体と ON 型双極細胞の機能不全の患者 9 人の血清を対象とした。それぞれの患者の血清を野生型マウス硝子体内に 1 マイクロリットル投与し、その後網膜電図を記録した。マウスは 1 血清あたり約 10 匹に投与した。血清投与後網膜電図の変化のないものは 1 カ月まで経過を観察したのち、組織学的検討を行った。

網膜電図の変化を示した血清に関してはさらなる詳細な検討のためにマウス約 100 匹を

用い検討した。血清投与後ごく早期である 3 時間後から 3 日後 1 週間後 3 か月、6 か月後まで ERG の推移を確認した。ERG に変化のあった血清は、組織学的検討も 5 時間、1 日、3 日、7 日、3 か月までの組織を評価した。組織は通常の光学顕微鏡での HE 染色による観察の他、免疫組織染色や電子顕微鏡を用いて組織の変化を確認した。免疫組織染色は、抗ヒト IgG 抗体、双極細胞のマーカーである抗 PKC α 抗体、水平細胞のマーカーである抗カルビンデイン抗体を用いた。

血清中の抗 TRPM1 抗体、抗 mGluR6 抗体の検出はベクターにプラスミドをいれ培養したのち、TRPM1、mGluR6 タンパクを抽出し血清を用いたウエスタンブロットにて確認した。抗 TRPM1 抗体を含んだ血清は野生型のマウスと TRPM1 ノックアウトマウスを用いて、血清投与後の組織変化も検討した。

4. 研究成果

本研究では、視細胞、双極細胞に対する自己抗体をもつと考えられる患者の両者の血清をマウスに投与したが、視細胞に対する自己抗体を持つ患者の血清は、網膜電図や組織に変化を起こさなかったため、研究は双極細胞に対する自己抗体を持つ患者の血清を中心に行った。

腫瘍随伴網膜症に伴う双極細胞の機能不全を生じたと考えられる患者 9 人の血清でまず、双極細胞特異的に発現している mGluR6、TRPM1 に対する自己抗体をウエスタンブロット法を行った。9 名中 2 名に抗 TRPM1 抗体に対する自己抗体を持っていることが分かった。

(図 1 patient 1, 2)

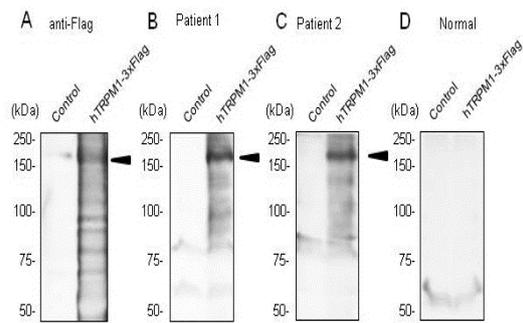


図1. 患者血清中の抗 TRPM1 抗体を検出
2 検体に抗 TRPM1 抗体を検出した

9 人の患者血清をマウス硝子体内に投与したところ、TRPM1 に対する抗体を持つ血清を投与すると網膜電図が患者と同様に陰性型を示しマウスにも双極細胞の機能不全を生じることが分かった。

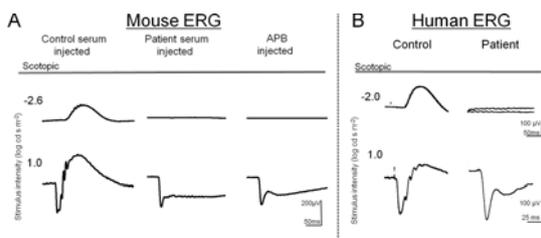


図2. patient1 の血清投与後の網膜電図の波形の変化 (A)。右に正常者と患者の網膜電図を示す

図2はマウスの硝子体内に抗 TRPM1 抗体を持つ血清投与すると 3 時間後にはマウスの網膜電図が右の患者と同様の波形になっていることを示している。我々はマウスに血清投与後、波形の推移を投与後 6 カ月まで検討したが、6 カ月まで網膜電図は陰性型のままであった。このことは、患者血清はごく早期に、網膜の双極細胞の機能不全を起こし、その変化が永続することを示唆していた。次に組織の変化を検討した。

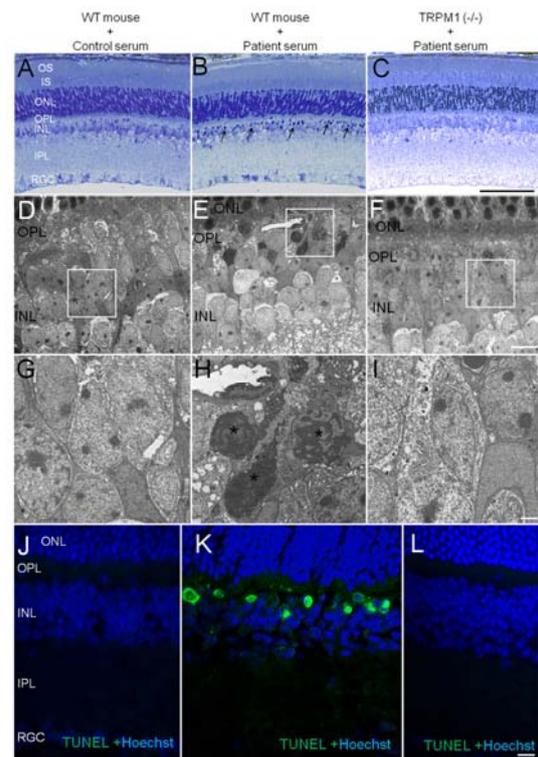


図3. 正常コントロール及び患者血清をマウス硝子体内に投与後 5 時間での組織変化。患者血清を投与する内顆粒層に核の濃染を認め電子顕微鏡でアポトーシスを生じていることが分かる。TRPM1 ノックアウトマウスに患者血清を投与したものや野生型のマウスに正常者の血清を投与したものでは細胞死は見られない

図3は血清投与後早期の組織図である。B、E、H、Kが、患者血清投与後である。光学顕微鏡、電子顕微鏡、TUNEL 染色に ON 型双極細胞が存在する内顆粒層に核の濃染を多数認めた。電顕レベルでは核の濃染はアポトーシスによるものであった。部位として ON 型双極細胞が存在する内顆粒層の外層であった。この組織像と網膜電図所見から、双極細胞の細胞死が強く疑われた。次に ON 型双極細胞の存在を確認するために ON 型双極細胞のマーカーである PKC α に対する抗体を用いて ON 型双極細胞の存在を確認した。一方、TRPM1 ノックアウトマウスに患者血清を投与したもの (C, F, I, L) や野生型のマウスに正常者の血清を投与したもの (A, D, G, J) では細胞死は見られない。

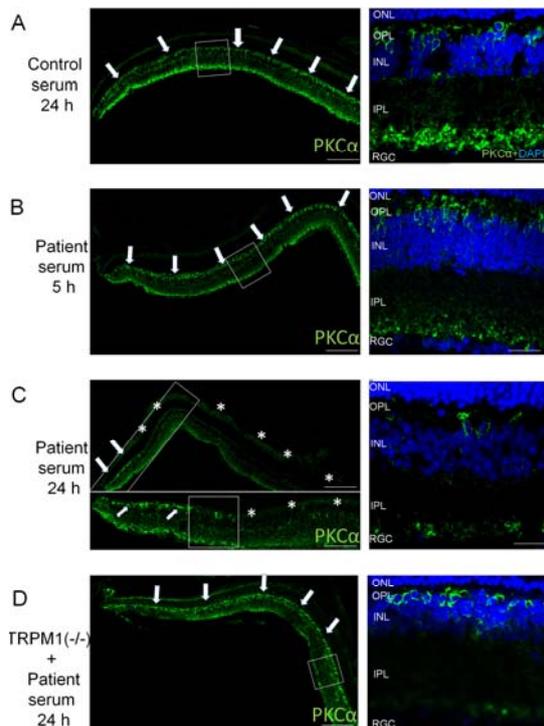


図4. 患者血清投与をしたマウス網膜の PKC α の発現。患者血清を投与したものでは投与後 24 時間で PKC α の発現が消失する

図4は PKC α の免疫組織染色であるが、患者血清投与が5時間では染色が確認できるが(B)、24 時間後では染色が消失し ON 型双極細胞が消失していることが推測された (C)。また TRPM1 ノックアウトマウスでは染色が 24 時間経過しても存在することから、ON 型双極細胞の消失は、抗 TRPM1 抗体が ON 型双極細胞に細胞死を起こすためと考えられた。

今まで、ON 型双極細胞の特異的な細胞死を報告した論文はなく、我々がとらえた現象は新しい知見と考えられる。

我々は組織学的検討をさらに行い、変性した ON 型双極細胞はその後血清投与 3 日後にマクロファージに貪食され排出され組織学的には光学顕微鏡レベルでは異常が検出できなかった。しかし内顆粒層の厚みを計測すると正常血清を投与したコントロール群に比較して薄くなっていた。

今回の研究より抗 TRPM1 抗体による腫瘍関連網膜症では ON 型双極細胞の細胞死が生じてお

り不可逆的な機能障害を生じている可能性が示唆された。しかしながら、抗 TRPM1 抗体が検出されなかった血清をマウス硝子体中に投与しても網膜電図及び組織に変化が見られなかったことから、今回の方法が患者血清の網膜に対する影響を常に証明できるというわけではない。原因としては、マウスとヒトとの交差性の問題や、血清を採取した病期が自己抗体が消失したあとであった可能性も考えられる。今後もさらなる検討が必要になる。

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 6 件)

- (1) Iwata E, Ueno S, Ishikawa K, Ito Y, Uetani R, Piao CH, Kondo M, Terasaki H. Focal macular electroretinograms after intravitreal injections of bevacizumab for age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Jun 28;53(7):4185-4190. 査読有り
- (2) Omori Y, Araki F, Chaya T, Kajimura N, Irie S, Terada K, Muranishi Y, Tsujii T, Ueno S, Koyasu T, Tamaki Y, Kondo M, Amano S, Furukawa T. Presynaptic dystroglycan-pikachurin complex regulates the proper synaptic connection between retinal photoreceptor and bipolar cells. *J Neurosci.* 2012 May 2;32(18):6126-6137. 査読有り
- (3) Hirota R, Kondo M, Ueno S, Sakai T, Koyasu T, Terasaki H. Photoreceptor and post-photoreceptor contributions to photopic ERG a-wave in rhodopsin P347L transgenic rabbits.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Mar 15;53(3):1467-1472. 査読有り

- (4) Hosono K, Ishigami C, Takahashi M, Park DH, Hirami Y, Nakanishi H, Ueno S, Yokoi T, Hikoya A, Fujita T, Zhao Y, Nishina S, Shin JP, Kim IT, Yamamoto S, Azuma N, Terasaki H, Sato M, Kondo M, Minoshima S, Hotta Y. Two novel mutations in the EYS gene are possible major causes of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Japanese population. PLoS One. 2012;7(2):e31036. Epub 2012 Feb 17. 査読有り
- (5) Sanuki R, Onishi A, Koike C, Muramatsu R, Watanabe S, Muranishi Y, Irie S, Ueno S, Koyasu T, Matsui R, Chérasse Y, Urade Y, Watanabe D, Kondo M, Yamashita T, Furukawa T. miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression. Nat Neurosci. 2011 Aug 21;14(9):1125-1134. 査読有り
- (6) Kondo M, Sanuki R, Ueno S, Nishizawa Y, Hashimoto N, Ohguro H, Yamamoto S, Machida S, Terasaki H, Adamus G, Furukawa T. Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar cell dysfunction. PLoS One. 2011;6(5):e19911. Epub 2011 May . 査読有り

[学会発表] (計4件)

- (1) 上野 真治. 腫瘍関連網膜症におけるON型双極細胞の機能障害機序. (シンポジウム) 第60回日本臨床視覚電気整理学会

(ミッドランドホール・名古屋市) 2012年10月6日

- (2) 上野 真治. 腫瘍随伴網膜症における抗TRPM1自己抗体の双極細胞機能障害の作用機序. (一般講演) 第116回日本眼科学会総会(東京国際フォーラム・東京都) 2012年4月 5日
- (3) 上野 真治. AIRはあるか (シンポジウム) 第45回眼炎症学会 (京都国際会議場・京都市) 2011年 7月 9日
- (4) 上野 真治. こんな時こそERG VEPを (シンポジウム) 第115回日本眼科学会総会 (東京国際フォーラム・東京都) 2011年5月14日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 真治 (UENO SHINJI)
名古屋大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 80528670

(2) 研究分担者 (なし)

(3) 連携研究者 (なし)