

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462709

研究課題名(和文) 網膜色素変性における網膜色素上皮の機能異常と形態異常のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Function of retinal pigment epithelium in retinitis pigmentosa

研究代表者

上野 真治 (Ueno, Shinji)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：80528670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はロドプシンP347L Tgウサギ(Tgウサギ)という網膜色素変性のモデルウサギを用いた。視細胞がほぼ消失した高齢のTgウサギに人工的に網膜剥離を作成し、網膜色素上皮のポンプ機能を検討した。網膜下液は24時間で消失しておりポンプ機能は、正常と考えられた。また電子顕微鏡による形態観察でも高齢のTgウサギの色素上皮の形態に異常が見られなかった。今回の結果は視細胞変性後でも網膜色素上皮の形態及びポンプ機能は保たれていることを示していた。

研究成果の概要(英文)：In this study we used rhodopsin P347L transgenic (Tg) rabbits which are models of retinitis pigmentosa. We confirmed the full-field ERG of these Tg rabbit became non-recordable between 24 and 36 months. We performed subretinal injection of PBS to these old Tg rabbits and created retinal detachment artificially. The subretinal fluid was resolved within 24 hours after injections and there were no difference in the recovery time of retinal detachment between Tg and control rabbits. Structures of RPE evaluated by transmission microscope showed no specific abnormalities compared to those of wild type rabbits. Our results indicated even after photoreceptor death the function of RPE were still preserved normally.

研究分野：網膜変性

キーワード：網膜色素変性 網膜電図 網膜変性動物モデル 網膜色素上皮

### 1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は発生頻度が約 3000-5000 人に一人という遺伝性網膜疾患で、失明原因の上位である。現状では有効な治療法は確立されてない。将来的には遺伝子治療、iPS 細胞を使った網膜再生治療、人工網膜などによって失明患者の視機能回復が目標となっている。

網膜色素変性は周辺部にある視細胞の杆体の細胞死からはじまり、中心部にある錐体細胞の視細胞変性が進行し視機能を失う。しかし、その過程で様々な合併症を生じる。その中でも黄斑浮腫は網膜色素変性患者の 10 - 30% 程度の頻度で生じるとされている。これにより患者は残った中心視野の機能障害のため視力の低下を生じ、Quality of vision を悪化させるといわれている。この黄斑浮腫の原因としては、視細胞に隣接する網膜色素上皮の機能の低下によるというのが一説である。そのため、色素上皮の機能を向上させる目的で炭酸脱水素酵素阻害薬の内服や点眼などがおこなわれ、黄斑浮腫を減少させる効果があるとされている。なぜ視細胞の細胞死によって網膜色素上皮の機能低下が生じるか、なぜ黄斑浮腫が生じるのかということに関してはまだ詳細が不明である。

### 2. 研究の目的

今回の研究では、名古屋大学で作成された網膜色素変性のモデルウサギである P347LTg ウサギ (Tg ウサギ) を用いることにより、このウサギの網膜変性過程とその網膜色素上皮の機能の解析を解析することを目標とした。ウサギを用いた理由はマウスやラットでは研究しにくかった、網膜の生体での観察が可能である光干渉断層計

(Optical Coherence Tomography;OCT) を使った画像検査による経過観察が容易であること、手術などの外科的処置のしやすさという利点を生かすためである。今回はこの Tg ウサギの網膜の機能の長期経過を観察し今まで報告のなかった生後一年を経過したウサギの網膜機能を網膜電図で評価した。また同時に網膜機能の局所性を確認するために局所網膜電図を用いて、網膜機能の局所性を評価した。最後に Tg ウサギの網膜機能が消失したと考えられる部位に外科的に網膜剥離を作成し、その回復過程をみることにより網膜色素上皮のポンプ機能を評価した。

### 3. 研究の方法

#### (1) Tg ウサギの網膜局所機能

ロドプシン P347LTg ウサギ (Tg ウサギ) のダッチ種を用いてその変性過程において網膜の部位による変性の程度の差を局所 ERG にて検討した。今回は、錐体系と杆体系の両方の局所 ERG を記録した。今までウサギの局所 ERG を記録したという報告がなかったため、局所 ERG を記録する条件を検討した。局所 ERG の刺激範囲は通常臨床で比較的良好に用いられる直径 15 度とした。局所性が保たれているかの確認には、網膜光凝固にて網膜変性部位を作成し、その部位の光刺激では局所 ERG が記録できないことによって確認した。記録条件は、今回の検討の結果杆体系の局所 ERG は 3 phot cd/m<sup>2</sup> で 10 ms、錐体系の局所 ERG は 30 phot cd/m<sup>2</sup> で 100 ms で記録することが最適条件であることが分かった。局所 ERG は 3 か月、6 か月、12 か月で正常ウサギ、Tg ウサギ各 6 匹から記録した。ウサギでは網膜の視細胞密度が高いとされる、視神経乳頭下方の visual streak の中心とその周囲 4 か所の計 5 か所を 15 度の円形刺激

を用いて記録した。

## (2) Tg ウサギの網膜機能の長期経過

Tg ウサギ 22 羽を全視野網膜電図にてその振幅の経過を観察した。ウサギはアルビノであるニュージーランドホワイト種を利用した。全視野網膜電図は 12 か月の時点で杆体機能は、ほぼ消失していると以前に報告されていたため、今回は全視野錐体網膜電図にて経過を観察し、生後どのくらいの月例で網膜電図が消失するかを検討した。

## (3) Tg ウサギの網膜色素上皮の機能評価

ウサギに全身麻酔を行った後、顕微鏡下にリン酸緩衝液 (PBS) を 0.01 ミクロリットル網膜下に注入し網膜剥離を作成した。その直後より OCT にて網膜剥離の状態を確認することにより、網膜下液の吸収を検討し、網膜色素上皮のポンプ機能を検討した。Tg ウサギ 4 眼、WT 3 眼の検討した。Tg ウサギの検討には網膜電図が消失したものを使用した。網膜色素上皮の機能はアルビノウサギであるニュージーランドホワイト種と有色家兎であるダッチウサギを使用した。また、電子顕微鏡を用いて高齢 Tg ウサギの透過型電子顕微鏡による網膜色素上皮を含む網膜断層像の検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1)

#### Tg ウサギの網膜局所反応

暗順応下で杆体系の局所 ERG はすべての部位で反応はなかった。このことは、比較的早期から、杆体は変性を起こしていることが推測された。明順応下の局所 ERG は、図2に示すようにすべての部位で時間の経過とともに局所網膜電図の b-wave の振幅は小さくなっていったが、b-wave の振幅は visual streak と呼ばれる図で C に相当する部位の中心が最も振幅が小さく、網膜変性

が中心でより進んでいることを示唆していた。また律動様小波は図1で A にあたる視神経乳頭の上方で大きくなっており、このことは視細胞の変性に伴い、その内層の変化は網膜部位によって異なることを示唆していた。組織学的な検討では、律動様小波が大きくなっていった visual streak 上方の A の部位に網膜内層の厚みに変化はなく、この網膜電図の変化に伴う組織学的な変化は見られなかった。以下に局所 ERG の記録部位 (図1) と Tg ウサギの生後3か月、6か月、12か月の代表波形と正常ウサギの3か月の波形 (図2) を示す。12か月齢で局所 ERG はほぼ記録されないのが分かる。また、図3に局所網膜電図の各成分の振幅を示した。

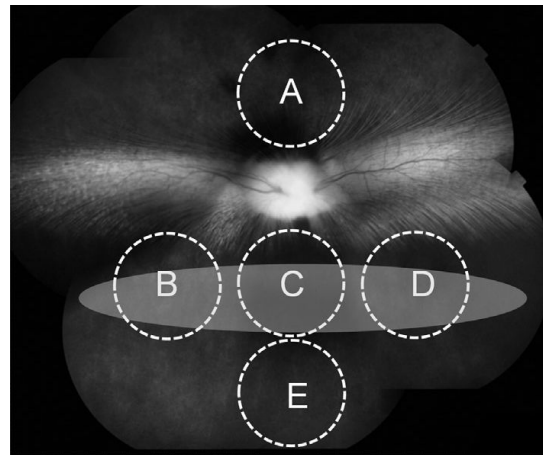


図1 ウサギ網膜と局所網膜電図の記録部位

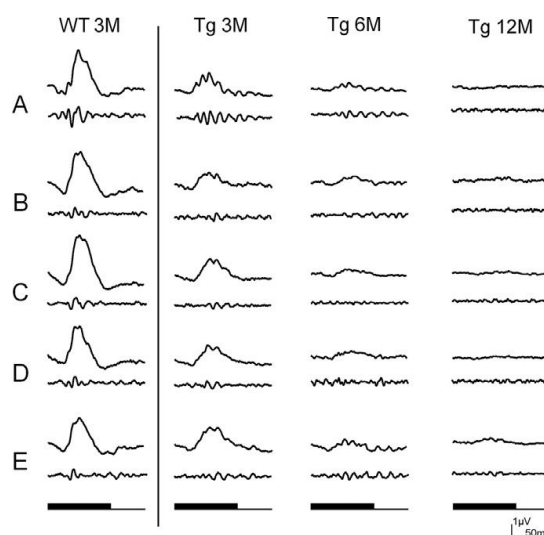


図2 生後3か月の野生型と生後3, 6, 12か

月の各局所網膜電図の代表波形局所 E R G は早期から振幅の低下を示している。

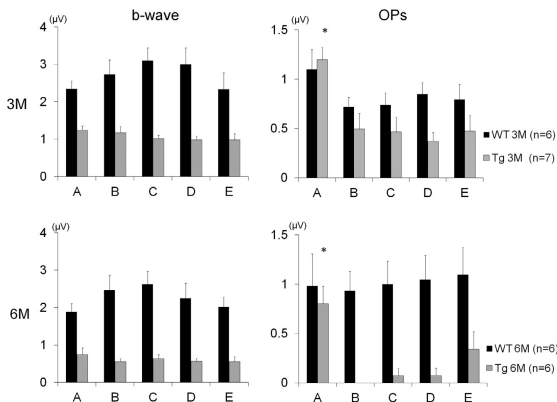


図3 局所網膜電図のb波と律動様小波の振幅。Aの部位で他の部位に比べて有意に律動用小波が大きい。

(2) Tgウサギの全視野網膜電図の経過  
ウサギ22羽を検討したところ、網膜電図が約24か月で消失するTgウサギが出現し、生後36か月では全てのウサギのERGが消失した。すなわちこのウサギは生後36か月までにほぼ錐体視細胞の機能が消失することが分かった。

(3) 網膜色素上皮の機能評価  
網膜電図が消失したTgウサギ4眼、WT3眼の検討では、図4に示すように、両者とも網膜下液は翌日にほぼ消失しており、両群に差はみられなかった。このことから、視細胞の変性が進行し、視細胞がほぼ消失した状態でも色素上皮のポンプ機能は保たれていることが考えられた。ただし、網膜色素変性患者では視細胞が変性してからはより長期になるため今回の結果からすぐに網膜色素上皮の機能が保たれているとすることはできないが、少なくとも視細胞が消失してもある程度の期間は網膜色素上皮の機能は保たれていることが分かった。網膜色素上皮のポンプ機能はアルビノウサギであるニュージーランドホワイト種とダッチ種

で相違はなかった。

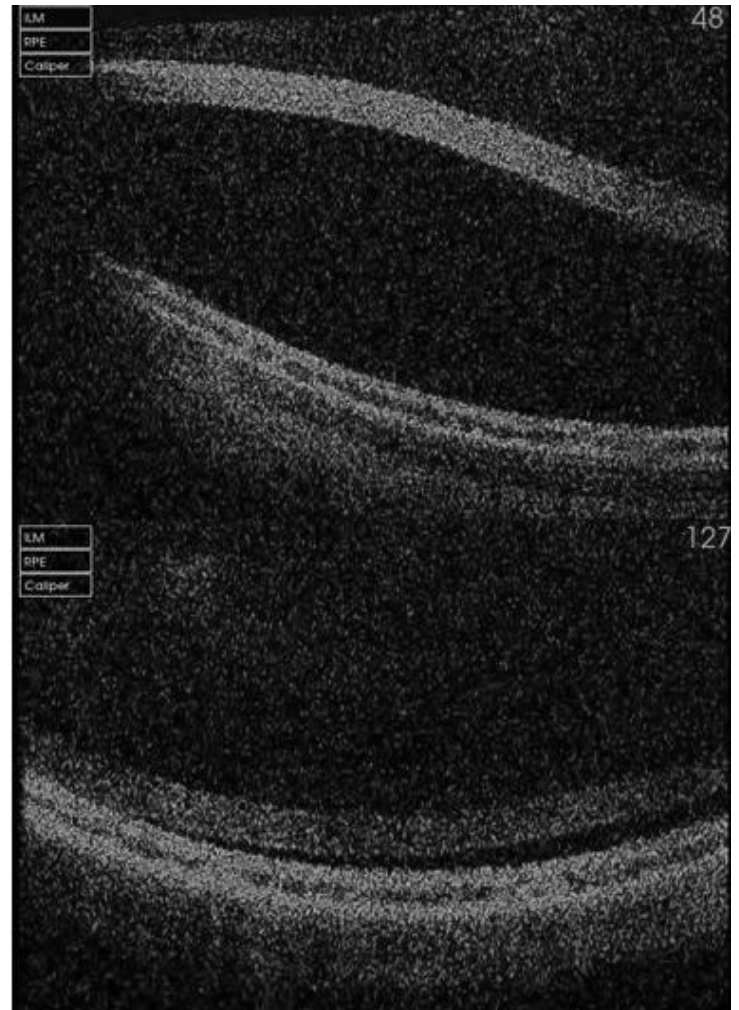


図4 網膜下液の吸収機能

Tgウサギの網膜下にPBSを注入し投与後直後(上)と投与後24時間のOCT像。投与直後確認できた網膜剥離は24時間後(下)にはほぼ消失した。また、電子顕微鏡による観察では網膜色素上皮の明らかな形態の異常はなかった。

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 7 件)

1. Kominami T, Ueno S, Nakanishi A, Kominami A, Kondo M, Furukawa T, Terasaki H. Temporal Properties of Cone ERGs of Pikachurin Null Mutant Mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 Mar 1;57(3):1264-9. 査読有

2. Nakanishi A, Ueno S, Kawano K, Ito Y, Kominami T, Yasuda S, Kondo M, Tsunoda K, Iwata T, Terasaki H. Pathologic Changes of Cone Photoreceptors in Eyes With Occult Macular Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Nov 1;56(12):7243-9. 査読有
3. Nagaya M, Ueno S, Kominami T, Nakanishi A, Koyasu T, Kondo M, Furukawa T, Terasaki H. Pikachurin protein required for increase of cone electroretinogram b-wave during light adaptation. *PLoS One*. 2015 Jun 19;10(6):e0128921. 査読有
4. Ueno S, Kawano K, Ito Y, Ra E, Nakanishi A, Nagaya M, Terasaki H. Near-infrared reflectance imaging in eyes with acute zonal occult outer retinopathy. *Retina*. 2015 Aug;35(8):1521-30. 25923954 査読有
5. Ueno S, Nakanishi A, Nishi K, Suzuki S, Terasaki H. Case of paraneoplastic retinopathy with retinal ON-bipolar cell dysfunction and subsequent resolution of ERGs. *Doc Ophthalmol*. 2015 Feb;130(1):71-6. 査読有
6. Ueno S., Ito Y., Maruko R. Kondo M., Terasaki H. (2014). Choroidal atrophy in a patient with paraneoplastic retinopathy and anti-TRPM1 antibody. *Clin Ophthalmol*, 8, 369-373. 査読有
7. Ueno S., Koyasu T., Kominami T., Sakai T., Kondo M., Yasuda S., Terasaki H. (2013). Focal cone ERGs of rhodopsin Pro347Leu transgenic rabbits. *Vision Res*, 91, 118-123. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 上野真治. ERG の診かた (シンポジウム)第 119 回日本眼科学会総会 札

幌 2015 年 4 月 19 日 ロイトン札幌  
北海道札幌市

2. Ueno S Mechanism of paraneoplastic retinopathy with retinal ON bipolar cell dysfunction Asia ARVO 2015 年 2 月 18 日 Pacifico Yokohama,神奈川県横浜市
3. 上野真治 名古屋大学病院における網膜ジストロフィ患者の遺伝子解析; 第 62 回日本臨床視覚電気生理学学会 2014 年 10 月 6 日 両国 K F C ホール 東京都墨田区
4. 上野真治 後天性疾患と ERG; 電気生理を診療に役立出る、後天性疾患と ERG 第 118 回日本眼科学会総会 2014 年 4 月 5 日 東京国際フォーラム 東京都千代田区
5. 上野真治 網膜色素変性の診断と治療. 第 117 回日本眼科学会総会 東京 2013 年 4 月 7 日東京国際フォーラム 東京都千代田区

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

上野 真治 (UENO, SHINJI)  
名古屋大学医学部附属病院  
病院講師

研究者番号 : 80528670

##### (2)研究分担者

なし