

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861436

研究課題名(和文) ミュラー細胞におけるWRN遺伝子を介したアポトーシス制御機構

研究課題名(英文) The regulation of apoptosis systems with WRN gene in the Muller cells

研究代表者

北橋 正康 (Masayasu, Kitahashi)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：30456040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト網膜凍結切片を用いてWRNタンパクの局在を調べた。WRNタンパクは、神経節細胞から外顆粒層にかけて発現していた。主にミュラー細胞のマーカーであるVimentinの局在と一致したが、アストロサイトのマーカーであるGFAPとは一致しなかった。WRN遺伝子は細胞内においてDAPI染色した核と一致せず、核周囲の細胞質基質内であることが示された。

研究成果の概要(英文)：WRN protein signals were detected in the inner nuclear layer and the outer nuclear layer. The WRN protein signals co-existed with vimentin signals but not with GFAP signals. These results indicate that the WRN proteins are expressed not in the nucleus but in the cytosol of Muller cells in human retinas.

研究分野：加齢黄斑変性

キーワード：WRN遺伝子 ミュラー細胞

1. 研究開始当初の背景

Werner 症候群は遺伝性早老症の一つであるが、その原因遺伝子として WRN 遺伝子の変異があげられる。

Werner 症候群は常染色体劣性遺伝を呈し世界中で約 1400 名程度報告があるが、その 8 割が日本人である。まず 20 代で毛髪の脱毛・白髪化、嚔声、強皮症様の皮膚変化などが出現し、30 代で両眼白内障、2 型糖尿病、性腺機能低下症、皮膚の潰瘍、骨粗鬆症などが出現する。さらに 40 代になると、高頻度に心筋梗塞や悪性腫瘍を合併して死に至ることが多い。非常に急速な老化は細胞レベルでも観察されており、テロメアの急速な短縮と DNA の不安定化が起こる。これらの顕著な臨床所見と基礎研究の結果から、Werner 症候群は、ヒト老化のモデル疾患と考えられている。

我々は Werner 症候群に合併した難治性嚔胞様黄斑浮腫(CME)を呈した症例を経験し報告してきた。(水野 眼循環学会 2010) 症例は 32 歳男性で両眼視力低下で千葉大学眼科を受診した際に両眼 CME を認めた。ありとあらゆる治療(ドルゾラミド点眼・トリアムシノロンテノン嚔下注・bevacizumab 硝子体注射・硝子体手術)に抵抗性を示した。1)過去の報告でも Werner 症候群に合併した CME の報告は散見されている 2)Müller 細胞の膨潤や細胞死が CME を誘導すること 3)ある種の遺伝性 CME では Müller の機能低下が関与すること 4)脳での WRN の発現パターンなどを併せて考え、WRN 遺伝子は網膜の支持組織である Müller 細胞に発現しており、WRN 遺伝子の変異が Müller 細胞の機能低下を引き起こし、CME を引き起こすという仮説を立てた。

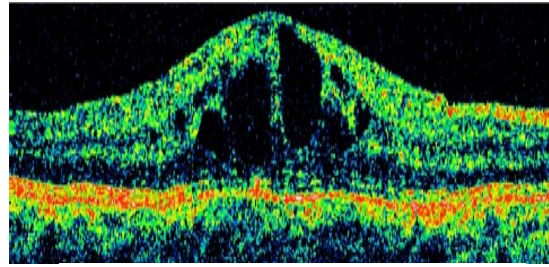


図1)初診時光干渉断層計所見：右眼嚔胞様黄斑浮腫 矯正視力 0.5

2. 研究の目的

我々は難治性嚔胞様黄斑浮腫を呈した Werner 症候群の一例を経験し、本疾患における黄斑浮腫の発生に Müller 細胞の機能低下が大きく関与しているとの仮説を立てた。Müller 細胞を用い in vitro で WRN 遺伝子を knockdown し、その発現型の解析を通して、Müller 細胞を中心とした網膜のエイジングの機序を解析する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1)ヒト網膜凍結切片における WRN タンパクの局在

WRN タンパクに対する抗体を用いてヒト成人網膜凍結切片における WRN タンパクの局在を調べた。

WRN タンパクと Müller 細胞のマーカーである VIMNETIN、アストロサイトのマーカーである GFAP との共染色を行った。

外顆粒層に存在する錐体細胞と杆体細胞のアレスチンタンパクと WRN タンパクの共染色を行った。

細胞内における WRN 遺伝子の局在を調べるために DAPI 染色と WRN 遺伝子の発現を調べた。

(2) マウス Müller 細胞培養株である TR-MUL5 を用いて、Wrn 遺伝子の RNAi を誘導し、培養細胞に紫外線照射・DNA 障害性薬剤の添加・放射線照射などによる DNA ダメージを与え

vimentin(Müller 細胞マーカー)、GFAP (アストロサイトマーカー) 発現強度の変化

細胞膨潤

アポトーシスの有無 (TUNEL 染色・トリパンプルー取り込み試験) をコントロール細胞と Wrn 遺伝子 knockdown 細胞による表現型を比較検討した。

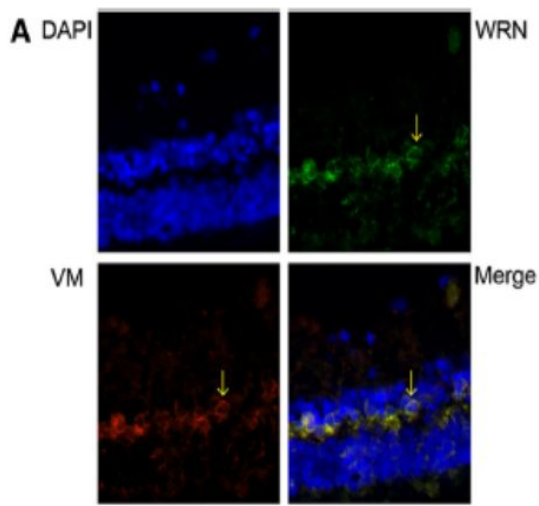
ヒト Müller 細胞培養株である MIO-M1 を用いて RNAi を誘導した。

4. 研究成果

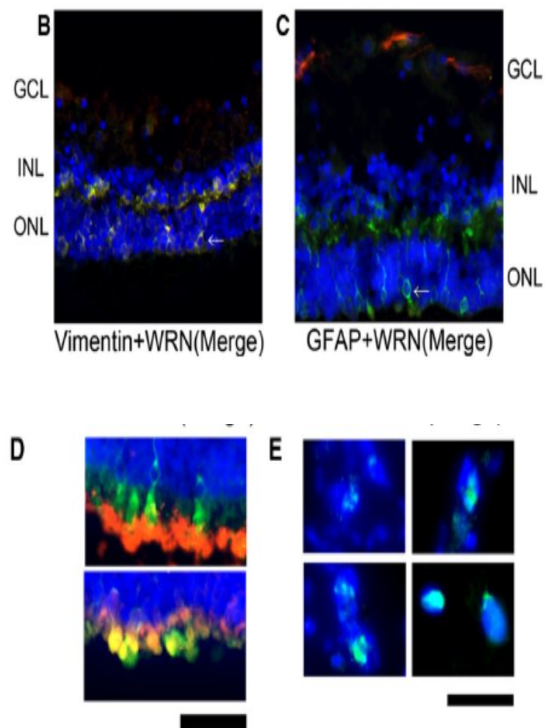
(1) ヒト網膜凍結切片における WRN タンパクの局在

WRN タンパクは、神経節細胞から外顆粒層にかけて発現することが確認された。

(図 A)



主にミュラー細胞のマーカーである Vimentin の局在と一致したが、アストロサイトのマーカーである GFAP とは一致しなかった。(図 A, B, C, D)



WRN タンパクと錐体および杆体のアレスタンパクに対する免疫染色を行ったところ、WRN タンパクは錐体および杆体にも存在することが分かった。このことから WRN タンパクは外顆粒層に主に局在し、Müller 細胞と視細胞である錐体および杆体細胞に局在することが示された。(図 D)

DAPI による核染色では DAPI とは一致せず、その周囲の細胞質基質に染色されていた。このことから WRN タンパクの局在は細胞核であることが示された。(図 E)

(2) マウスにおける Wrn 遺伝子の単独ノックダウンでは Wrn 遺伝子単独では表現型を示すことはなかった。ヒトでは WRN 遺伝子の単独ノックダウンで表現型が確認されているが、マウスでは Wrn 遺伝子の安定性の問題から単独ノックダウンでは表現型を呈することはないと考えた。

(3) ヒト Müller 細胞 MIO-M1 を用いて WRN 遺伝子のノックダウンを試みたが、安定株を得ることはできなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Oshitari T, Kitahashi M, Mizuno S, et al. (2014).

Werner syndrome with refractory cystoid macular edema and immunohistochemical analysis of WRN proteins in human retinas.

BMC Ophthalmology 査読あり14,31-36.

DOI: 10.1186/1471-2415-14-31

〔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 0 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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

北橋 正康 (Kitahashi, Masayasu)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号 : 30456040