

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861437

研究課題名(和文) 視細胞におけるミトコンドリアの生理、病理学的役割の検証

研究課題名(英文) Photoreceptor-specific role of mitochondria

研究代表者

上田 高志 (Ueta, Takashi)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：90631573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：網膜視細胞の細胞死は多くの失明原因となっている。本研究ではマウスの体内で、網膜視細胞だけでミトコンドリア異常を引き起こし、他の組織・細胞では異常をきたさないマウスを作成し、視細胞におけるミトコンドリア機能の重要性について検討した。ミトコンドリア異常のマウス網膜は錐体視細胞の細胞死を引き起こし、桿体細胞は比較的後期まで残存した。このことからミトコンドリア異常に対して錐体視細胞は高い感受性を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Mouse lacking transcription factor A (TFAM) in photoreceptor cells were created to test the importance of the gene in photoreceptors. Interestingly, The TFAM deficient photoreceptor precursors were able to differentiate into cone and rod photoreceptors, but then followed by cone-rod dystrophy phenotypes.

研究分野：網膜硝子体疾患

キーワード：網膜変性 ミトコンドリア異常 視細胞 transcriptional factor A

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性に代表される網膜変性疾患は人類にとって主な失明原因であるにも関わらず、未だ治療法のないのが現状である。これまでに抗酸化酵素、神経栄養因子などによる遺伝子治療もしくはiPS治療が提唱されているが、実用化と普及までの道のりはまだ遠い。近年の画像診断技術の急速な進歩において視細胞におけるミトコンドリア領域(エリプソイド)と病態進行の関連性が注目されているが、そもそも視細胞におけるミトコンドリアの重要性は未だ十分に明らかにされていない。

本研究代表者が過去に行った研究の一つで、抗酸化酵素の glutathione peroxidase 4 (GPx4)[1]を視細胞特異的にコンディショナルノックアウトしたマウスでは急速に視細胞死が観察された(下図)。しかも桿体細胞よりも錐体細胞が早期に死滅した。GPx4はsplicing variantとして、細胞質型、ミトコンドリア型、核小体型があるが、視細胞では特にミトコンドリア型優位に発現していたため、この結果は視細胞にとってのミトコンドリアの重要性を示唆していると考えられたが、ミトコンドリア型以外の他のバリエーション GPx4 をノックアウトした影響も否定できず、確定的な根拠は得られなかった。また、他の報告としては、ミトコンドリア機能に重要な PGC-1 の knockout マウスでは phenotype は正常であったものの、光障害モデルで視細胞死がおりやすくなったという報告[2]も視細胞にとってのミトコンドリア機能の重要性を示唆しているが、PGC-1 の多岐にわたるターゲットを考えるとミトコンドリア機能異常以外が原因となっている可能性は否定できない。本研究はミトコンドリア特異的タンパク質分子 Tfam の CKO マウスを作製することによって、また Tfam の transgenic マウスにおける視細胞を研究することによって視細胞におけるミトコンドリア役割を明らかにしていくことを目的とした。

2. 研究の目的

視細胞におけるミトコンドリアに標的をしぼった視細胞、網膜変性の研究は本研究代表者の知る限りでこれまでほとんどなされておらず、本研究によって視細胞にとってのミトコンドリアの重要性が明らかになることが期待された。また、ミトコンドリア

活性化による網膜変性の抑制効果が確認されれば、現在確立した治療法が存在しない網膜色素変性における新たな治療法の可能性を提示する可能性も考えられる。

3. 研究の方法

Tfam flox マウスと Crx-Cre マウスの交配により視細胞特異的な Tfam の CKO マウスの作成を行う。

Tfam CKO マウス網膜において視細胞の発生、分化、その後の細胞死につき、組織切片における免疫組織染色にて検討を行った。具体的には以下の(免疫)染色を行った。

- (1) 網膜形態:
hematoxylin and eosin (HE)染色
- (2) 細胞死:
terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)染色、
cleaved caspase 3 抗体を用いた免疫染色
- (3) 視細胞分化:
Rxr-、m-opsin、rhodopsin 抗体を用いた免疫染色

4. 研究成果

図1. CKO マウス網膜

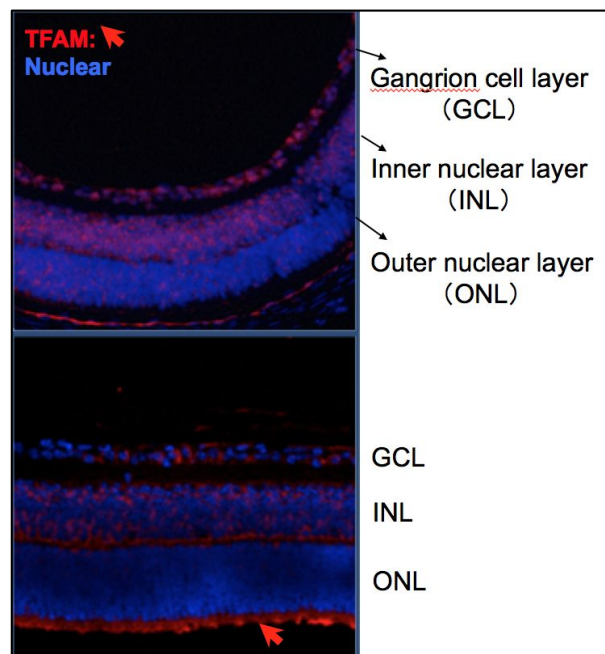


図 2 . HE 染色

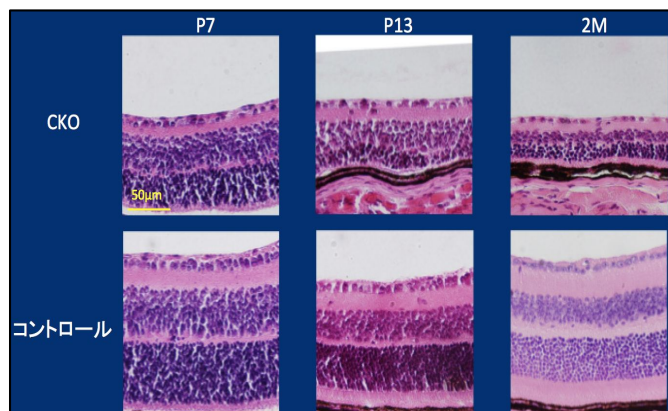


図 3. 錐体、桿体視細胞染色

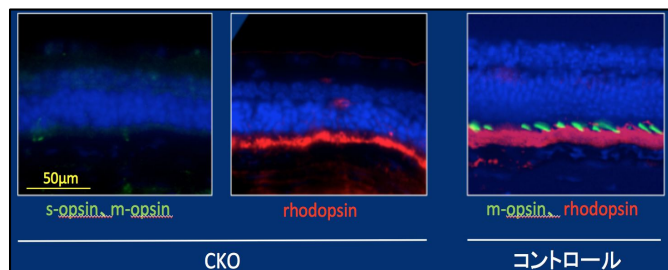


図 1 に示すように、視細胞特異的な Tfam の CKO マウスの作成に成功した。しかし、出産数が少なく、免疫組織染色によって検討を行った。

免疫組織染色により、以下の結果を得た。

- (1) 生後 7-13 日時点で既に網膜外層 Outer Nuclear Layer はコントロールマウスと比較すると菲薄化していた (図 2)
- (2) 各種視細胞マーカーの免疫染色により、錐体、桿体視細胞への分化は確認された。
- (3) しかしその後、速やかに錐体視細胞死が起こった。桿体視細胞死も起こったが、進行は比較的緩やかであった。rhodopsin タンパクの異所性発現は変性後期でも確認されず、錐体細胞死が主体のフェノタイプであった (図 3)

ミトコンドリアに標的をしばった視細胞、網膜変性の研究は本研究代表者の知る限りでこれまでほとんどなされておらず、本研究によって視細胞にとってのミトコンドリアの重要性の一端が明らかになった。また、将来的に、ミトコンドリア活性化による網膜変性の抑制効果が確認されれば、現在は治療法が存在しない網膜色素変性における

新たな治療法の可能性を提示することができると考えられる。

また、NARP (Neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa)、Kearns-Sayre syndrome、Maternally inherited Leigh syndrome (MILS) といったミトコンドリア病では網膜変性を合併し、時に cone-rod dystrophy のフェノタイプを取ることが報告されている[3,4]。また、ミトコンドリア DNA における point mutation で macular dystrophy を発症した報告もある[5]。このように稀ではあるが難知性疾患が存在している。本研究での CKO マウスはこうした疾患の病態解明の一助となる可能性が考えられた。

< 引用文献 >

1. Glutathione peroxidase 4 is required for maturation of photoreceptor cells. Ueta T, Inoue T, Furukawa T, Tamaki Y, Nakagawa Y, Imai H, Yanagi Y. *J Biol Chem.* 2012;287:7675-82.
 2. PGC-1 α determines light damage susceptibility of the murine retina. Egger A, Samardzija M, Sothilingam V, Tanimoto N, Lange C, Salatino S, Fang L, Garcia-Garrido M, Beck S, Okoniewski MJ, Neutzner A, Seeliger MW, Grimm C, Handschin C. *PLoS One.* 2012;7:e31272.
 3. Cone and rod dysfunction in the NARP syndrome I. Chowers, T. Lerman-Sagie, O. Elpeleg, A. Shaag, and S. Merin. *Br J Ophthalmol.* 1999; 83: 190-193.
 4. Isolated late-onset cone-rod dystrophy revealing a familial neurogenic muscle weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa syndrome with the T8993G mitochondrial mutation. Porto FB, Mack G, Sterboul MJ, Lewin P, Flament J, Sahel J, Dollfus H. *Am J Ophthalmol.* 2001;132:935-7.
 5. Characterisation of the macular dystrophy in patients with the A3243G mitochondrial DNA point mutation with fundus autofluorescence. Rath PP, Jenkins S, Michaelides M, Smith A, Sweeney MG, Davis MB, Fitzke FW, Bird AC. *Br J Ophthalmol.* 2008;92:623-9.
- 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 件)

天野史郎 (AMANO, Shiro)

〔学会発表〕(計 1件)

Totsuka K, Roggia MF, Ueta T. Retinal degeneration caused by deficient mitochondrial transcription factor A in murine photoreceptors. 2015 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Denver, CO, USA. 2015年5月3-7日 デンバー (アメリカ合衆国)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 高志 (UETA, Takashi)
東京大学・医学部付属病院・登録研究員
研究者番号：90631573

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

Murilo F. Roggia (ROGGIA, Murilo F.)