

平成 22 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19592018
 研究課題名 ゼブラフィッシュを用いたレチナルファシン遺伝子異常による
 網膜色素変性の病態解明
 研究課題名 Analysis of the retinal fascin gene for retinitis pigmentosa in zebrafish
 研究代表者 西信 良嗣（SAISHIN YOSHITSUGU）
 東邦大学・医学部・准教授
 研究者番号：30379193

研究成果の概要（和文）：日本人常染色体優性網膜色素変性に関わっていると考えられているレチナルファシン遺伝子の解析を行ってきた。ゼブラフィッシュにおいてもレチナルファシン遺伝子が網膜に発現していることが明らかになった。トランスジェニックフィッシュでの解析では形態変化を観察することはできなかった。何らかの機能的な変化が起こっている可能性が示唆され、網膜色素変性の病態を解明する手掛かりになると思われる。

研究成果の概要（英文）：Retinal fascin gene has been analyzed to determine its role in Japanese patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. We found the retinal fascin gene in zebrafish as well as in human. Morphological changes have not been found, however, some functional change might occur in transgenic fish, which could be helpful to determine the cause of retinitis pigmentosa.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：眼科学、遺伝子、網膜色素変性

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は進行性夜盲、視野狭窄、視力低下を主症状とし、確実に有効な治療法が現在も確立されていない疾患である。遺伝形式の違いにより網膜変性の進行に差が認められ、遺伝形式の情報が得られれば予後の差も分かり患者には有益な情報となる。候補遺伝子検索等により国内・外で現在までに 20

種類以上の網膜色素変性の原因遺伝子が報告されている。和田らはレチナルファシン遺伝子が日本人の常染色体優性網膜色素変性に関わっていることを報告し、その変異が日本人に特異的、または比較的高頻度に原因となる遺伝子異常であると推察している（Wada Y, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 2395-2410, 2001）。しかし、これらの遺伝子

異常のみでは網膜色素変性患者の原因の一部が解明されたにすぎず、レチナルファシン遺伝子の変異が日本人常染色体優性網膜色素変性をどのように引き起こすのか、その機序の解明が必要である。変性の機序の解明や治療法の開発の検討のためには遺伝子変異動物や遺伝子欠損動物などのモデル動物作製が必要である。研究代表者である西信良嗣は網膜の視細胞に特異的に発現する新規遺伝子、レチナルファシンを単離した (Saishin Y, et al. *FEBS Lett* 414 : 381-386, 1997)。さらにレチナルファシンが他のファシン gene family と同様に actin bundling protein (アクチン束形成蛋白) であることも証明した (Saishin Y, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 2087-2095, 2000)。研究分担者の辻川元一はゼブラフィッシュにおける視細胞の発生と機能を解析し (Tsuji-kawa M, et al. *Int J Dev Biol.* 48: 925-934, 2004.)、ゼブラフィッシュを用いて脊椎動物の感覚神経の分化と維持のためにある種の遺伝子が必要であることを報告している (Tsuji-kawa M, et al. *Neuron.* 42: 703-716, 2004.)。これまでの研究で得たレチナルファシンに関する知識や実験材料とゼブラフィッシュを用いた研究実績をもとに、本研究では、日本人常染色体優性網膜色素変性に関わっているレチナルファシン遺伝子に関連するトランスジェニックフィッシュを作製し、作製した様々なトランスジェニックフィッシュを用いていまだ有効な治療法のない網膜色素変性の機序を解明し、網膜色素変性に対する治療法の手がかりを探ることは可能ではないかと着想に至った。

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュ網膜におけるレチナルファシンの局在を明らかにする。次にゼブラフィッシュ網膜のレチナルファシンの全長を単離し、日本人の常染色体優性網膜色素変性に関わっているレチナルファシン遺伝子のトランスジェニックフィッシュをゼブラフィッシュを用いて作製する。作成したトランスジェニックフィッシュを解析することによっていまだ有効な治療法のない網膜色素変性に対する治療法の手がかりを得ることが最終的な目的である。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュのレチナルファシンの全長の単離：ゼブラフィッシュのゲノムおよび EST データベースを用いて、哺乳類 (ヒト、マウス) のレチナルファシン遺伝子配列を基に、高い相同性を示す EST クローンを検索する。

(2) ゼブラフィッシュの網膜におけるレチナルファシンの発現の検討：

① ERG (electroretinogram) : 網膜電図を測定し、その波形を解析する。

② RT-PCR 法 : RT-PCR によりレチナルファシンの発現を確認する。

③ 免疫染色法 : 免疫染色は胚 (whole-mounted embryo) および 2 ヶ月齢のゼブラフィッシュから摘出した眼球の凍結切片の両方で行う。ゼブラフィッシュレチナルファシンのアミノ酸の部分配列よりなるペプチドを合成し白色家兔に免疫し、特異的抗体を作成する。抗レチナルファシン抗体で免疫染色を行う。

④ whole mount in situ ハイブリダイゼーション法 (WISH) : PCR 法によりゼブラフィッシュレチナルファシン 遺伝子に特異的なアンチセンス cDNA プローブを作製する

(3) レチナルファシン変異遺伝子を持つトランスジェニックフィッシュの作製 : Tol2 トランスポゾン転移システムを用いたトランスジェニックフィッシュ作製。レチナルファシン変異遺伝子を組み込んだ Tol2 トランスポゾンベクターを作製し、このプラスミド DNA と転移酵素 mRNA を受精卵とともに微量注入する。Tol2 トランスポゾンベクターはプラスミド DNA から切り出され、ゼブラフィッシュゲノムへ組み込まれる。微量注入した胚の半分以上が子孫にトランスポゾン挿入を伝えることができる founder fish となる。

(4) トランスジェニックフィッシュの解析：

① ERG (electroretinogram)

② RT-PCR 法 : RT-PCR によりレチナルファシンの発現を正常眼と比較する。

③ 免疫染色法 : 胚 (whole-mounted embryo) および 2 ヶ月齢のゼブラフィッシュから摘出した眼球の凍結切片の両方で抗レチナルファシン抗体を用いて免疫染色を行い野生型と比較する。

④ whole mount in situ ハイブリダイゼーション法 (WISH) : トランスジェニックフィッシュの 8 細胞期から孵化直後までの胚を用いて WISH を行う。初期発生、発達段階での mRNA の発現を正常ゼブラフィッシュと比較検討し、形態形成のどのような段階にレチナルファシンが関与しているかを検討する。

(5) GFP-retinal fascin ダブルトランスジェニックフィッシュの作成 : 視細胞 (ロドプシン) が GFP でマークされているゼブラフィッシュと 208delG 変異型レチナルファシントランスジェニックフィッシュを掛け合わせる。

(6) GFP-retinal fascin トランスジェニックフィッシュの解析 : 蛍光顕微鏡による観察を行う。

(7) siRNA : 変異型フィッシュ用いて、siRNA による遺伝子抑制実験を行い網膜内、特に視

細胞内のレチナルファシンの局在がどのように変化するかを検討する。

4. 研究成果

(1) RT-PCR 法によりレチナルファシンの部分クローンを単離した。これをプローブとしてゼブラフィッシュ幼魚の cDNA ライブラリースクリーニングをし、全長 ORF を含む cDNA クローンを単離した。蛍光シークエンサーを用いて塩基配列を決定し、それがマウスおよびヒトレチナルファシンと高い相同性を有しており、ゼブラフィッシュのレチナルファシンであることを証明した。

(2) 発生各段階のゼブラフィッシュの眼球から RNA を抽出し、RT-PCR 法により mRNA を検出した。その結果、幼魚の段階より発現を認め、成魚においてより多くの発現を認めた。免疫染色は胚 (whole-mounted embryo) および2ヶ月齢のゼブラフィッシュから摘出した眼球の凍結切片の両方で行った。抗レチナルファシン抗体を使用し、蛍光抗体方法の手法を用いて免疫染色を行った。幼魚の段階より発現を認め成魚においても継続して発現を認めることが証明された。コンフォーカル顕微鏡により、網膜の視細胞層外節に発現を認めた。

(3) Tol2 トランスポゾン転移システムを用いてトランスジェニックフィッシュを作製した。レチナルファシン変異遺伝子を組み込んだ Tol2 トランスポゾンベクターを作製し、このプラスミド DNA と転移酵素 mRNA を受精卵とともに微量注入した。このようにして founder fish を作成した。

(4) レチナルファシン変異遺伝子を持つトランスジェニックフィッシュの解析：網膜電図を用いて正常眼と比較検討した。正常眼との差異はなかったが、加齢とともに振幅の低下が見られることを証明した。匹数が少なかったため、更に検討する必要がある。RT-PCR によりレチナルファシンの発現を正常眼と比較した。その結果、幼魚の段階より mRNA の発現を認め、成魚において多くの発現を認めた。正常眼よりもトランスジェニックフィッシュにおいて多くの発現を認めることが証明された。抗レチナルファシン抗体で染色された部分の面積を測定し、野生型と変異型との間でレチナルファシンの発現の量的変化を検討した。幼魚の段階より発現を認め成魚においても継続して発現を認めることが証明された。正常眼よりもトランスジェニックフィッシュにおいて多くの発現を認めることが証明された。

(5) GFP-レチナルファシンダブルトランスジェニックフィッシュの解析：作成したダブルトランスジェニックフィッシュの視細胞に発現している GFP の発現変化を検討することによって、変異型におけるレチナルファシ

ンの発現変化を観察した。今回の検討の範囲では、レチナルファシンの発現は減弱していたが、視細胞の配列および形態変化を観察することはできなかった。変異型ゼブラフィッシュ用いて、siRNA による遺伝子抑制実験を行い網膜内、特に視細胞内のレチナルファシンの局在がどのように変化するかを検討した。今回の検討の範囲では、正常眼との差異を認めなかった。

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 24 件)

- ① Shiba T, Maeno T, Saishin Y, Hori Y, Takahashi M: Nocturnal Intermittent Serious Hypoxia and Reoxygenation in Proliferative Diabetic Retinopathy Cases. *Am J Ophthalmol*. Epub ahead of print, 2010. (査読有)
- ② Kandori M, Saishin Y, Kusaka S, Shimojyo H, Otori Y, Tano Y: Pupilloplasty for congenital pupillary-iris-lens membrane with 25-gauge vitreous cutter. *Acta Ophthalmol*. Epub ahead of print, 2009. (査読有)
- ③ Inoue R, Saishin Y, Shima C, Yoshikawa H, Ohguro N, Tano Y: A case of iris melanocytoma transformed to malignant melanoma. *Jpn J Ophthalmol*. 53: 271-273, 2009. (査読有)
- ④ Takahashi K, Saishin Y, Saishin Y, King AG, Levin R, Campochiaro PA: Suppression and regression of choroidal neovascularization by the multitargeted kinase inhibitor pazopanib. *Arch Ophthalmol*. 127: 494-499, 2009. (査読有)
- ⑤ Haruta H, Sawa M, Saishin Y, Ohguro N, Tano Y: Clinical findings in unilateral acute idiopathic maculopathy : New findings in acute idiopathic maculopathy. *Int Ophthalmol*. 30:199-202, 2010. Epub 2009 Jan 29. (査読有)
- ⑥ Miki A, Saishin Y, Kuwamura R, Ohguro N, Tano Y: Anterior segment optical coherence tomography assessment of iris bombé before and after laser iridotomy in patients with uveitic secondary glaucoma. *Acta Ophthalmol*. 88:e26-27, 2010. Epub 2008 Oct 24. (査読有)
- ⑦ Sato T, Kusaka S, Hashida N, Saishin Y, Fujikado T, Tano Y: Comprehensive gene-expression profile in murine

- oxygen-induced retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 93:96-103, 2009. Epub 2008 Oct 6. (査読有)
- ⑧ Sou R, Ohguro N, Maeda T, Saishin Y, Tano Y: Treatment of primary intraocular lymphoma with intravitreal methotrexate. *Jpn J Ophthalmol.* 52:167-174, 2008. (査読有)
- ⑨ Bessho K, Gomi F, Harino S, Sawa M, Sayanagi K, Tsujikawa M, Tano Y: Macular autofluorescence in eyes with cystoid macula edema, detected with 488 nm-excitation but not with 580 nm-excitation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 247: 729-734, 2009. Epub 2009 Jan 30. (査読有)
- ⑩ Ikuno Y, Sayanagi K, Soga K, Sawa M, Gomi F, Tsujikawa M, Tano Y: Lacquer crack formation and choroidal neovascularization in pathologic myopia. *Retina.* 28:1124-1131, 2008. (査読有)
- ⑪ Ikuno Y, Sayanagi K, Soga K, Sawa M, Tsujikawa M, Gomi F, Tano Y: Intravitreal bevacizumab for choroidal neovascularization attributable to pathological myopia: one-year results. *Am J Ophthalmol.* 147:94-100, 2009. Epub 2008 Sep 6. (査読有)
- ⑫ Sawa M, Gomi F, Tsujikawa M, Ikuno Y, Sakaguchi H, Sayanagi K, Tano Y: Abnormal fundus autofluorescence patterns in myopic choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol.* 92:1236-1240, 2008. (査読有)
- ⑬ Wakabayashi T, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Tano Y: Marked vascular changes of polypoidal choroidal vasculopathy after photodynamic therapy. *Br J Ophthalmol.* 92:936-940, 2008. (査読有)
- ⑭ Fang X, Sakaguchi H, Gomi F, Oshima Y, Sawa M, Tsujikawa M, Ikuno Y, Kamei M, Kusaka S, Tano Y: Efficacy and safety of one intravitreal injection of bevacizumab in diabetic macular oedema. *Acta Ophthalmol.* 86:800-805, 2008. (査読有)
- ⑮ Sawa M, Gomi F, Ohji M, Tsujikawa M, Fujikado T, Tano Y: Fundus autofluorescence after full macular translocation surgery for myopic choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 246:1087-1095, 2008. (査読有)
- ⑯ Fujimoto H, Gomi F, Wakabayashi T, Sawa M, Tsujikawa M, Tano Y: Morphologic changes in acute central serous chorioretinopathy evaluated by fourier-domain optical coherence tomography. *Ophthalmology.* 115: 1494-1500, 2008. (査読有)
- ⑰ Tsujikawa M, Wada Y, Sukegawa M, Sawa M, Gomi F, Nishida K, Tano Y: Age at onset curves of retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol.* 126: 337-340, 2008. (査読有)
- ⑱ Tsujikawa M, Omori Y, Biyanwila J, Malicki J. Mechanism of positioning the cell nucleus in vertebrate photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 14819-14824, 2007. (査読有)
- ⑲ Shima C, Sakaguchi H, Gomi F, Kamei M, Ikuno Y, Oshima Y, Sawa M, Tsujikawa M, Kusaka S, Tano Y: Complications in patients after intravitreal injection of bevacizumab. *Acta Ophthalmol.* 86: 372-376, 2008. Epub 2007 Nov 17. (査読有)
- ⑳ Gomi F, Sawa M, Sakaguchi H, Tsujikawa M, Oshima Y, Kamei M, Tano Y: Efficacy of intravitreal bevacizumab for polypoidal choroidal vasculopathy. *Br J Ophthalmol.* 92: 70-73, 2008. Epub 2007 Jun 13. (査読有)
- ㉑ Gomi F, Sawa M, Mitarai K, Tsujikawa M, Tano Y: Angiographic lesion of polypoidal choroidal vasculopathy on indocyanine green and fluorescein angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 245: 1421-1427, 2007. (査読有)
- ㉒ Gomi F, Nishida K, Oshima Y, Sakaguchi H, Sawa M, Tsujikawa M, Tano Y: Intravitreal bevacizumab for idiopathic choroidal neovascularization after previous injection with posterior subtenon triamcinolone. *Am J Ophthalmol.* 143: 507-510, 2007. (査読有)
- ㉓ Tsujikawa K, Tsujikawa M, Watanabe H, Maeda N, Inoue Y, Fujikado T, Tano Y: Allelic homogeneity in Avellino corneal dystrophy due to a founder effect. *J Hum Genet.* 52:92-97, 2007. (査読有)
- ㉔ Sakaguchi H, Ikuno Y, Gomi F, Kamei M, Sawa M, Tsujikawa M, Oshima Y, Kusaka S, Tano Y: Intravitreal injection of bevacizumab for choroidal neovascularisation associated with

pathological myopia. Br J Ophthalmol.
91:161-165, 2007. (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

- ① Saishin Y, Inoue R, Shima C, Yoshikawa H, Ohguro N, Tano Y: Malignant transformation of an iris melanocytoma to melanoma. World Ophthalmology Congress, 2008年7月1日, Hong Kong China.
- ② Saishin Y, Takahashi K, Saishin Y, King A, Levin R, Campochiaro PA: Oral administration of the VEGF receptor kinase inhibitor Pazopanib causes suppression and regression of choroidal neovascularization in mice. Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2008年4月29日, Fort Lauderdale, Florida USA.
- ③ Saishin Y, Ohguro N, Tano Y: Clinical evaluation of uveitis with Behcet disease after fifteen years follow-up. 9th International Congress of International Ocular Inflammation Society, 2007年9月17日, Paris, France.
- ④ Hoki S, Saishin Y, Mashimo H, Haruta H, Tsujikawa M, Ohguro N, Tano Y: Systemic administration of IL-6 receptor antibody suppresses choroidal neovascularization (CNV) in mice, Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2007年5月7日, Fort Lauderdale, Florida USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西信 良嗣 (SAISHIN YOSHITSUGU)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号：30379193

(2) 研究分担者

辻川 元一 (TSUJIKAWA MOTOKAZU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70419472
(H21: 連携研究者)

(3) 連携研究者

辻川 元一 (TSUJIKAWA MOTOKAZU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70419472
(H19→H20: 研究分担者)