

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462683

研究課題名(和文) 完全型先天停在性夜盲のイヌモデルの確立と機能・遺伝子解析

研究課題名(英文) Establishment of dog model of congenital stationary night blindness

研究代表者

近藤 峰生 (Kondo, Mineo)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80303642

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)：先天停在性夜盲(CSNB)は非進行性の遺伝性網膜疾患であり、生来の夜盲を特徴とする。我々は自然発症の常染色体劣性のビーグル犬の家系を発見した。この犬は明所では正常な視覚を有するが、暗所では明らかな視機能低下がみられた。網膜電図(ERG)は陰性型を示し、長時間刺激錐体応答では、ON応答は低下しているがOFF応答は残存していた。いわゆるヒトのSchubert-Bornschein型の完全型CSNBの犬モデルと考えられた。遺伝子検査では既知のCSNBの候補遺伝子は全てrule outされた。光学顕微鏡と電子顕微鏡では網膜形態は正常であった。我々の犬家系は世界で初めての完全型CSNBの犬モデルである。

研究成果の概要(英文)：Congenital stationary night blindness (CSNB) is a non-progressive, clinically and genetically heterogeneous disease of impaired night vision. We report a naturally-occurring, stationary, autosomal recessive phenotype in beagle dogs with normal daylight vision but absent night vision. Affected dogs had normal retinas on clinical examination, but showed no detectable rod responses. They had “negative-type” mixed rod and cone responses in full-field ERGs. Their photopic long-flash ERGs had normal OFF-responses associated with severely reduced ON-responses. The phenotype is similar to the Schubert-Bornschein form of complete CSNB in humans. Genetic testing ruled out most known CSNB candidates. Retinal morphology showed normal cellular layers and structure, and electron microscopy revealed normal rod spherules and synaptic ribbons. Our results indicate involvement of a yet unknown gene in this canine model of complete CSNB.

研究分野：眼科学

キーワード：動物モデル 網膜 夜盲 先天停在性夜盲 犬 網膜電図 遺伝 ERG

## 1. 研究開始当初の背景

先天停性夜盲の完全型 (complete-type congenital stationary night blindness: cCSNB) は遺伝性の網膜疾患の 1 つであり、生来の強い夜盲と強度近視、視力低下を特徴とする (Miyake et al. Arch Ophthalmol 1986)。遺伝形式は常染色体劣性か X 染色体のものが多い。その病態に関しては、視細胞から ON 型双極細胞への伝達が障害されていると考えられている。cCSNB の原因遺伝子については、患者の DNA 解析によって現在 5 つの遺伝子 (GRM6, NYX, TRPM1, GPR179, LRIT3) が報告されている。この中で TRPM1 については、研究代表者を含む研究グループが ON 型双極細胞の興奮に重要なカチオンチャネルであることを見だし (Koike et al. PNAS 2011)、また cCSNB の原因遺伝子となることも報告した (Nakamura et al. Mol Vis 2010)。さらに最近では、この TRPM1 は悪性黒色種によって失明する melanoma-associated retinopathy (MAR) の患者に生じる自己抗体の標的蛋白であることも研究代表者は報告している (Kondo et al. PLoS One 2011)。

cCSNB に対する新規治療法を開発するにあたり、cCSNB の動物モデルは必要不可欠である。これまで、ウマ (Witzel et al. IOVS 1978) と自然発症 (Purdue et al. IOVS 1998) および遺伝子改変マウス (Masu et al. Cell 1995; Koike et al. PNAS 2011) による cCSNB モデル動物の報告があるが、マウスのような小動物だけでなく中型のイヌやネコにおける動物モデルを確立することは重要なテーマである。

## 2. 研究の目的

最近になり、我々は、世界で初めてイヌにおいて cCSNB の表現系を有する常染色体劣性の 1 家系を発見した。今回の研究の目的は、この cCSNB のイヌ家系を樹立させ、その網膜機能を網膜電図で詳細に解析し、網膜組織を光顕、電顕、および免疫組織で観察し、さらに原因遺伝子を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) 正常イヌと夜盲イヌから杆体系 ERG と錐体系 ERG を正確に記録する。刺激の強度は 10 段階程度変化させ、intensity-response function をプロットする。錐体 ERG については、長時間刺激を用いて ON 反応と OFF 反応も記録する。また正常イヌと夜盲イヌの硝子体内に APB を注射し、シナプス伝達障害の程度を評価する。

(2) 夜盲イヌの組織を詳細に観察する。通常の光学顕微鏡に加え、電子顕微鏡にてシナプス部位を詳細に調べる。また、視細胞と双極細胞のシナプスに重要な種々のマーカーを用いて免疫組織学的観察を行う。

(3) 夜盲イヌの遺伝子変異を同定する。まずは cCSNB の原因遺伝子として知られている 5 つの遺伝子のイヌの相同部位をスクリーニ

ングする。それらに変異がみられなかった場合には、我々のイヌ家系の DNA を用いて全ゲノム解析を行って原因遺伝子を同定する試みを行う。

## 4. 研究成果

我々の CSNB 犬の交配により、この家系が常染色体劣性遺伝であることを確認した。行動学的実験により、この犬は明所では正常な視覚を有しているが、暗所では明らかな視機能低下があることが証明された。

この CSNB 犬から網膜電図 (ERG) を記録すると、波形は陰性型を示し、長時間刺激錐体応答では、ON 応答は低下しているが OFF 応答は残存していた。これらの結果により、この犬には ON 型双極細胞に機能が障害されており、いわゆるヒトの Schubert-Bornschein 型の完全型 CSNB の犬モデルと考えられた。光学顕微鏡と電子顕微鏡では網膜形態は正常であった。我々の犬家系は世界で初めての完全型 CSNB の犬モデルである。

この夜盲イヌの網膜を ON 型双極細胞のシグナル伝達経路に特異的な抗体を用いて免疫組織学的に研究した結果、特にシナプスにおける TRPM1 (ON 型双極細胞におけるカチオンチャネル) の局在に乱れがみられたことにより、我々の夜盲イヌの原因が ON 型双極細胞側にあることが推測された。2015 年に我々が中間報告として発表した PLoS One の論文ではこのイヌの夜盲の原因遺伝子は不明のままであった。

我々が飼育している cCSNB の犬家系の DNA を抽出し、ターゲットシーケンシング法と次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析によって原因遺伝子を確定する試みを行った。まずは、人で cCSNB の原因となることが知られている 5 つの遺伝子 (GRM6, TRPM1, GPR179, LRIT3, NYX) の犬における相同部位をターゲットシーケンシングによって全てスクリーニングしたが、この段階では検出できなかった。次に、次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析を使って我々の犬家系の遺伝子を調べ正常なビーグル犬の遺伝子と比較したところ、原因遺伝子を突き止めることに成功した。(競争的理由により、現在この情報は非開示)

## 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 32 件)

1) Fuma S, Nishinaka A, Inoue Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Kondo M, Hara H.

A pharmacological approach in newly established retinal vein occlusion model. Sci Rep. 2017 Mar 2;7:43509. 査読有

2) Kominami T, Ueno S, Okado S, Nakanishi A, Kondo M, Terasaki H. Contributions of Second- and Third-Order Retinal Neurons to

Cone Electroretinograms After Loss of Rod Function in Rhodopsin P347L Transgenic Rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 Mar 1;58(3):1417-1424. 査読有

3) Asakawa K, Ishikawa H, Uga S, Mashimo K, Kondo M, Terasaki H. Histopathological Changes of Inner Retina, Optic Disc, and Optic Nerve in Rabbit with Advanced Retinitis Pigmentosa. *Neuroophthalmology*. 2016 Oct 6;40(6):286-291. 査読有

4) Nagai N, Koyanagi E, Izumida Y, Liu J, Katsuyama A, Kaji H, Nishizawa M, Osumi N, Kondo M, Terasaki H, Mashima Y, Nakazawa T, Abe T. Long-Term Protection of Genetically Ablated Rabbit Retinal Degeneration by Sustained Transscleral Unoprostone Delivery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Dec 1;57(15):6527-6538.

5) Fukuo M, Kondo M, Hirose A, Fukushima H, Ikesugi K, Sugimoto M, Kato K, Uchigata Y, Kitano S. Screening for diabetic retinopathy using new mydriasis-free, full-field flicker ERG recording device. *Sci Rep*. 2016 Nov 8;6:36591. 査読有

6) Hasegawa T, Muraoka Y, Ikeda HO, Tsuruyama T, Kondo M, Terasaki H, Kakizuka A, Yoshimura N. Neuroprotective efficacies by KUS121, a VCP modulator, on animal models of retinal degeneration. *Sci Rep*. 2016 Aug 9;6:31184. 査読有

7) Fujii M, Sunagawa GA, Kondo M, Takahashi M, Mandai M. Evaluation of micro Electroretinograms Recorded with Multiple Electrode Array to Assess Focal Retinal Function. *Sci Rep*. 2016 Aug 2;6:30719. 査読有

8) Yaguchi Y, Katagiri S, Fukushima Y, Yokoi T, Nishina S, Kondo M, Azuma N. Electroretinographic effects of retinal dragging and retinal folds in eyes with familial exudative vitreoretinopathy. *Sci Rep*. 2016 Jul 26;6:30523. 査読有

9) Pfeiffer RL, Marc RE, Kondo M, Terasaki H, Jones BW. Müller cell metabolic chaos during retinal degeneration. *Exp Eye Res*. 2016 Sep;150:62-70. 査読有

10) 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;57(3):1264-9. 査読有

11) Nakagami Y, Hatano E, Inoue T, Yoshida K, Kondo M, Terasaki H. Cytoprotective Effects of a Novel Nrf2 Activator, RS9, in Rhodopsin Pro347Leu Rabbits. *Curr Eye Res*. 2016 Aug;41(8):1123-1126. 査読有

12) Kato K, Takashima Y, Matsunaga K, Sugimoto M, Matsubara H, Hirano K, Kondo M. Effect of topical rebamipide on

conjunctival goblet cell recovery after vitrectomy. *Sci Rep*. 2016 Jan 14;6:19516. 査読有

13) Nakanishi A, Ueno S, Kawano K, Ito Y, Kominami T, Yasuda S, Kondo M, Iwata T, Tsunoda K, Terasaki H. Pathologic Changes of Cone Photo-receptors in Eyes With Occult Macular Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Nov;56(12):7243-9. 査読有

14) Kondo M, Das G, Imai R, Santana E, Nakashita T, Imawaka M, Ueda K, Ohtsuka H, Sakai K, Aihara T, Kato K, Sugimoto M, Ueno S, Nishizawa Y, Aguirre GD, Miyadera K. A Naturally Occurring Canine Model of Autosomal Recessive Congenital Stationary Night Blindness. *PLoS One*. 2015 Sep 14;10(9):e0137072. 査読有

15) Coppieters F, Todeschini AL, Fujimaki T, Baert A, De Bruyne M, Van Cauwenbergh C, Verdin H, Bauwens M, Ongenaert M, Kondo M, Meire F, Murakami A, Veitia RA, Leroy BP, De Baere E. Hidden Genetic Variation in LCA9-Associated Congenital Blindness Explained by 5'UTR Mutations and Copy-Number Variations of NMNAT1. *Hum Mutat*. 2015 Dec;36(12):1188-96. 査読有

16) Sugimoto M, Ichio A, Kondo M. Short Pulse Duration High-Power Laser Photocoagulation during Vitrectomy for Diabetic Retinopathy Reduces Postoperative Inflammation. *PLoS One*. 2015 Aug 14;10(8):e0135126. 査読有

17) Asakawa K, Ishikawa H, Uga S, Mashimo K, Shimizu K, Kondo M, Terasaki H. Functional and morphological study of retinal photoreceptor cell degeneration in transgenic rabbits with a Pro347Leu rhodopsin mutation. *Jpn J Ophthalmol*. 2015 Sep;59(5):353-63. 査読有

18) Takihara Y, Inatani M, Eto K, Inoue T, Kreymerman A, Miyake S, Ueno S, Nagaya M, Nakanishi A, Iwao K, Takamura Y, Sakamoto H, Satoh K, Kondo M, Sakamoto T, Goldberg JL, Nabekura J, Tanihara H. In vivo imaging of axonal transport of mitochondria in the diseased and aged mammalian CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Aug 18;112(33):10515-20. 査読有

〔学会発表〕(計 52 件)

1) Kondo M: RETeval - A New ERG Device for the Diagnosis of Inherited Retinal Diseases. APAO 2016 Symposium. Taipei(Taiwan) 2016.3.26.

2) Kondo M: Clinical application of new, small hand-held ERG device for diagnosis of retinal diseases. The Fifth Global Chinese Ophthalmic Conference Sino-Japan Miyake Clinical Visual Electrophysiology

Forum. Suzhou(China). 2016.9.9.

3) Kondo M: Assessing macular function - Electrophysiological techniques. ARVO 2016 Education Course. Seattle(USA). 2016.4.30.

4) Kondo M: Clinical Application of mfERG. ISCEV2016. Singapore. 2016.8.13.

5) Kondo M: A Clinical Diagnostic Approach to Retinal Disease. ISCEV2016. Singapore(Singapore). 2016.8.14.

〔図書〕(計 4 件)

1) 飯田知弘、近藤峰生、他：眼底疾患パーフェクトアトラス. 777(p612-617). 文光堂. 東京. 2017.

2) 根木昭、飯田知弘、近藤峰生、他：眼科検査ガイド. 382(p125-125). 文光堂. 東京. 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 峰生 (KONDO, Mineo)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80303642

### (2) 研究分担者

生杉 謙吾 (IKESUGI, Kengo)

三重大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10335135

杉本 昌彦 (SUGIMOTO, Masahiko)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：422874

松原 央 (MATSUBARA, Hisashi)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20378409