

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11320

研究課題名(和文) 網膜色素変性における網膜内層の機能と形態

研究課題名(英文) Change of inner retinal function and structure 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・講師

研究者番号：80528670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性は、網膜外層の視細胞が変性・消失する遺伝性の疾患で、日本の失明原因の第2位を占める。しかしながら、視細胞が消失する際に残りの網膜内層にどのような変化が起きるかは詳細に解明されていない。本研究では網膜変性のモデルウサギを利用して、視細胞変性に伴う網膜内層の変化について検討した。網膜変性中期では、視細胞変性に伴い2次ニューロンである双極細胞の機能増強が起きることが分かった。また、網膜変性の末期には、網膜のグリーオーシスと呼ばれるグリア細胞の増生がおき、網膜内層機能が著しく傷害されることが分かった。ただし網膜変性の末期でも視神経の形態は比較的保たれていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在網膜色素変性に対しては、人工網膜、遺伝子治療、光感受性遺伝子の導入など様々な治療法が試みられている。その多くの治療が、視細胞消失後の網膜内層機能を利用しようとするものである。しかし、視細胞消失後にどのような変化が起きているかについては今まで詳細に研究されてこなかった。今回の研究は、ウサギという、比較的長寿のモデル動物を使うことにより、長期にわたる網膜内層の変化を観察できた。本研究の結果は、視細胞の消失に伴い網膜内層にもかなりの形態の障害をきたしていることを示しており、今後の治療法の開発には網膜内層の変化を考慮すべきであることを示していた。

研究成果の概要(英文)：Retinitis pigmentosa (RP) is a heterogeneous group of inherited retinal disorders characterized by progressive photoreceptor degeneration leading to a reduction of vision. However, the mechanisms of deconstruction and reprogramming of the middle and inner retina during and after the photoreceptor degeneration has not been elucidated. In the current study we used rhodopsin Pro347Leu transgenic rabbits (P347L Tg) as an animal model of RP and investigated the change of the inner retina in the course of photoreceptor degeneration. In the middle stage of retinal degeneration, enhancement of function in retinal bipolar cells was detected. In the end stage of RP, severe gliosis was observed and damaged the inner retinal function. However the structure of the optic nerve was relatively preserved.

研究分野：網膜変性

キーワード：網膜色素変性 リモデリング 網膜変性 遺伝子改変動物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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、失明原因の上位にくる難病である。原因は、主に杆体細胞に発現するタンパクをコードする遺伝子の異常により引き起こされるとされている。患者は通常、夜盲と求心性の視野狭窄を訴え、病気の進行に伴い残った中心視野がさらに狭窄し、最終的に中心視野が消失すると視機能がほぼ消失する。以前は網膜色素変性の治療はないとされていたが、最近では人工網膜による治療により視機能の一部を回復されたとの報告が散見されるようになっている。また、将来的には失った視機能を回復させる治療として、光感受性受容体による遺伝子治療や iPS 細胞による視細胞の移植などが有望視されている。これらの治療の成否のひとつは、視細胞が変性した後の 2 次ニューロン及び 3 次ニューロンの機能にある。すなわち、iPS 細胞や人工網膜による視細胞の代用が可能になった時に、患者の 2 次ニューロン及び 3 次ニューロンがどの程度機能するかによって、得られる視機能が左右される。そのため、これらのニューロンが、視細胞変性を起こす過程、もしくは消失後に、どのような変化がおきているかについて研究することは重要である。今までも、網膜変性後に剖検の結果や網膜色素変性のモデル動物などの検討により、リモデリングによりグリア細胞の増生や双極細胞の配列の乱れなどが生じているとの報告があるが、その変化が内層の機能に及ぼす影響などは検層されておらず十分にされていない。

2. 研究の目的

今回、我々はいままで網膜色素変性モデルである網膜色素変性のモデルウサギである P347LTg ウサギ (Tg ウサギ) を用いて研究を行ってきた。ウサギはマウスよりも長寿で長期間にわたり網膜変性中および変性後の網膜の評価を行うことができる。今回は 3 つの事象の解明を目的にした。

1、網膜変性過程における網膜双極細胞機能の変化

2、Tg ウサギの長期経過とグリオシスの出現

3、視細胞消失後の網膜内層機能と視神経の形態変化の関係

3. 研究の方法

3-1、網膜変性過程における網膜双極細胞機能の変化

18 か月齢の Tg ウサギの網膜内層機能を 2、3 次ニューロンを抑制する薬剤を使い、Tg ウサギにおいて網膜内層機能がどのように変化したかを検討した。白色家兎の 18 か月齢の野生型 (WT) と P347LTg ウサギそれぞれ 4 羽を対象とし、種々の条件で錐体 ERG を記録した。2、3 次ニューロンを抑制する薬剤を硝子体内投与し ERG 波形の変化を解析した。

3-2、Tg ウサギの長期経過とグリオシスの出現

New Zealand White (NZW) 種由来の Tg ウサギ 25 羽 25 眼と野生型 (以下 WT ウサギ) 5 羽 5 眼の全視野 ERG を経時的に記録した。

また、全視野 ERG の消失した Tg ウサギ 5 羽 5 眼、WT ウサギ 5 羽 5 眼 (平均 43.8 月齢) の網膜厚を SD-OCT で測定し比較検討した。網膜の構造について透過型電子顕微鏡および光学的顕微鏡における検討も加えた。

3-3、視細胞消失後の網膜内層機能と視神経の形態変化の関係

全視野ERGの消失したTgウサギ6羽6眼（40.3か月齢）とWTウサギ6羽6眼（43.8か月齢）に対して経角膜電気刺激を行いElectrically Evoked Response(EER)と呼ばれる脳波を記録した。記録後、安楽死させた後視神経を摘出しの神経の軸索の評価を行った。EERの振幅とその視神経軸索の本数や形態の関係を評価した。

4. 研究成果

4-1 網膜変性過程における網膜双極細胞機能の変化の結果

光刺激 off 時に Tg ウサギでは特異的な陽性波が確認され(図 1)、この陽性波は薬剤投与による解析から主に 3 次ニューロン成分由来と考えられた。薬剤投与によるさらなる解析では Tg ウサギにおいて OFF 型双極細胞以後の成分が増幅し、Tg ウサギの視細胞成分がかなり減弱していることが示された。これらの結果から、Tg ウサギの ERG 波形はほとんどが 2 次ニューロン以後の成分であり、特に OFF 型双極細胞以後の成分は WT ウサギよりも増幅していると考えられた。網膜変性の進行した Tg ウサギにおいて 2、3 次ニューロンがリモデリングを起こし機能変化を起こしている可能性が示唆された

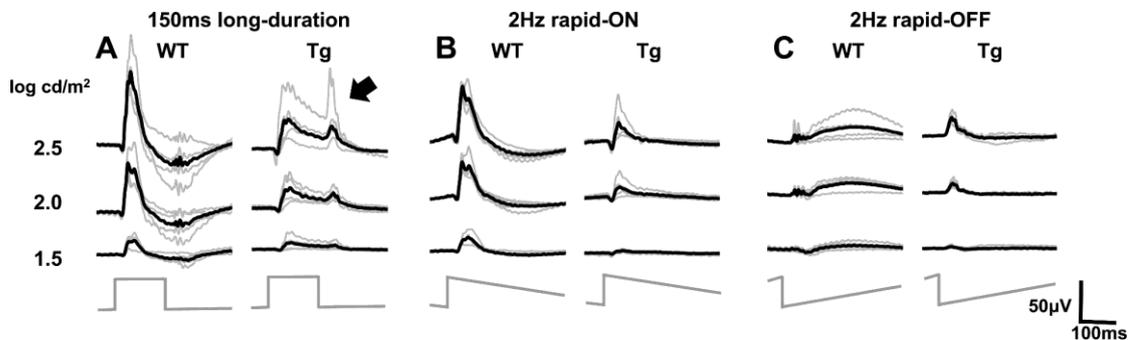


図 1 WT ウサギと Tg ウサギにおける矩形波刺激による ERG。矢印に示すように Tg ウサギでは光刺激 off 時に大きな陽性波がみられた。

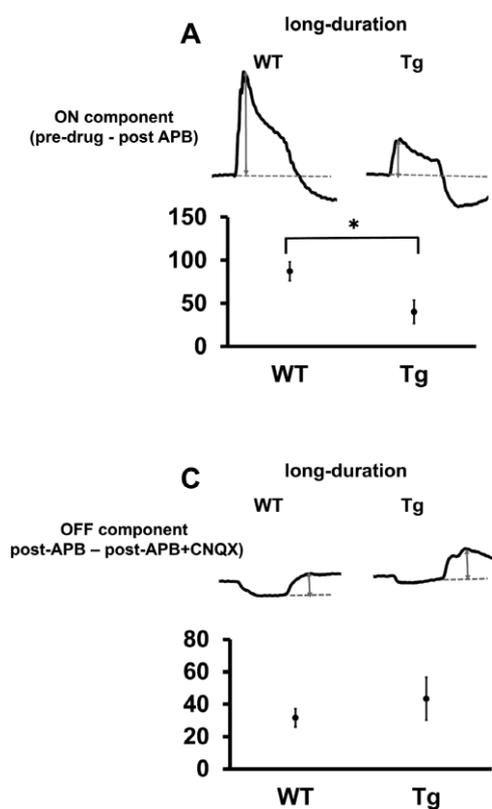


図 2 薬物を使った構成成分の解析の結果 ON型双極細胞由来のON成分はWTウサギに比べてTgウサギでは減少しているが (A)、OFF型双極細胞由来のOFF成分はTgウサギの方が野生型より増大しており (C) リモデリングによりOFF型双極細胞の機能亢進が起きていると考えられた。

この内容は以下の論文に掲載された

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. *Investigative ophthalmology & visual science* 2017

4-2 Tg ウサギの長期経過とグリオシスの出現

Tgウサギは30か月齢からERG波形が消失する個体が確認され54か月齢では全てで消失した(図3)。WTウサギのERGには特に異常所見は無かった。OCTで測定したTgウサギとWTウサギの網膜厚はほぼ同等であり、Tgウサギの網膜内層は肥厚していると考えられた。Tgウサギの網膜では透過型電子顕微鏡像にて視細胞が消失しており、内顆粒層や神経節細胞層の構造が著しく乱れやミュラー細胞の増殖がみられた。これはGFAPにより免疫組織染色でも確認された(図4)。

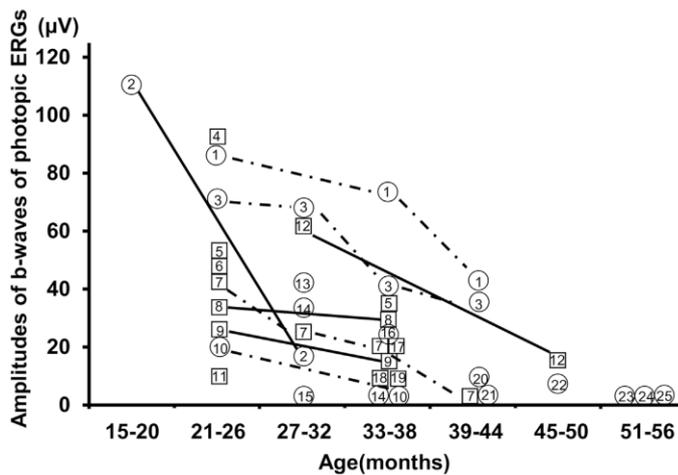


図3 Tgウサギの錐体ERGの振幅の推移

Tgウサギの錐体ERGは振幅が徐々に減少し、5歳までには消失していた。

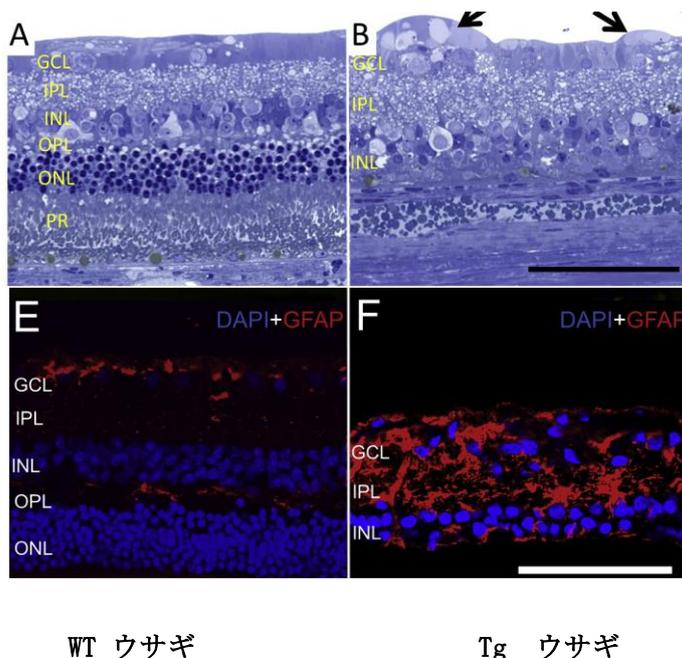


図4 WTウサギとERGが消失後のTgウサギの網膜組織像
トルイジンブルー染色(A, B)
Tgウサギ(B)ではWTウサギ(A)に比べて網膜内層の肥厚がみられる。

GFAPによる免疫組織染色(E, F)
Tgウサギ(F)ではGFAP陽性(赤)のグリアと考えられる細胞がWTウサギ(E)に比較して増殖し視細胞変性後グリオシスが進行している。

WT ウサギ

Tg ウサギ

この内容は以下の論文に掲載された

Ueno S, Kominami T, Okado S, Inooka D, Kondo M, Terasaki H (2019) Course of loss of photoreceptor function and progressive Muller cell gliosis in rhodopsin P347L transgenic rabbits. *Experimental eye research*. 2019

4-3、視細胞消失後の網膜内層機能と視神経の形態変化の関係

網膜内層機能を反映するEERはTgウサギで有意に振幅が低下していた(図5)。一方、Tgウサギの視神経の軸索の本数はWTウサギの60%ほどに有意に減少していたが、その減少度はEERの振幅の方が有意であり、EERは軸索の残存数とは相関しなかった(図6)。このことは、人工網膜の移植などで角膜電気刺激にて網膜内層機能を評価する際には、視神経の形態がよい患者でも治療の対象から除外される可能性を示していた。

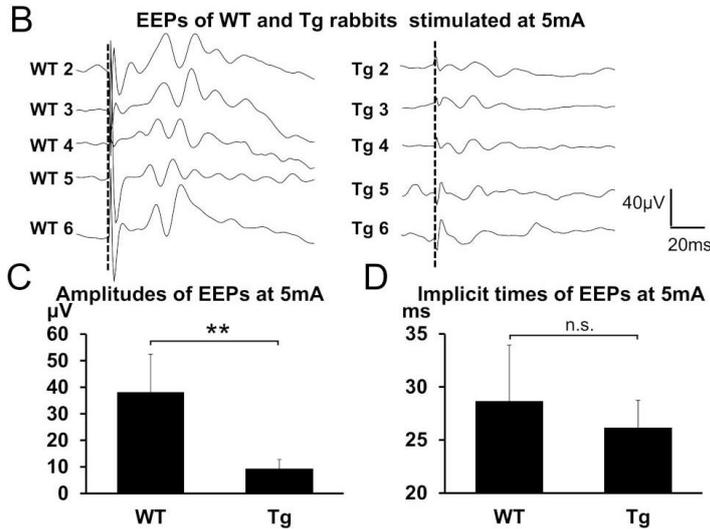


図5 WTウサギ5匹とTgウサギ5匹のEERの波形(B)
Tgウサギの波形はWTウサギに比べて有意に振幅が低下していたが(C)潜時に差はなかった(D)。

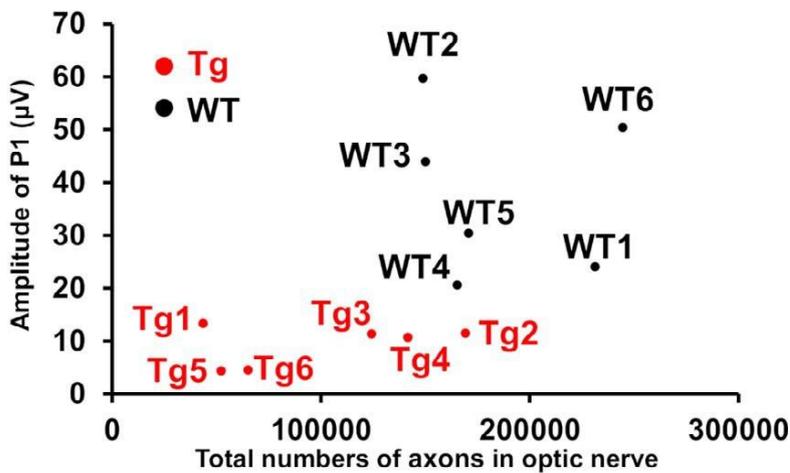


図6 EERの振幅と視神経の数の関係
TgウサギにおいてEERの振幅はおおむね低下しており、軸索の数がWTウサギと同程度であってもEERの振幅は小さいことを示している。

この内容は以下の論文に掲載された

Kominami T, Ueno S, Nishida K, Inooka D, Kominami A, Kondo M, Terasaki H. Electrically Evoked Potentials Are Reduced Compared to Axon Numbers in Rhodopsin P347L Transgenic Rabbits With Severe Photoreceptor Degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ueno Shinji, Inooka Daiki, Meinert Monika, Ito Yasuki, Tsunoda Kazushige, Fujinami Kaoru, Iwata Takeshi, Ohde Hisao, Terasaki Hiroko	4. 巻 63
2. 論文標題 Three cases of acute-onset bilateral photophobia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 172 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-018-00649-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sayo A, Ueno S, Kominami T, Okado S, Inooka D, Komori S, Terasaki H	4. 巻 2;59(8)
2. 論文標題 Significant Relationship of Visual Field Sensitivity in Central 10° to Thickness of Retinal Layers in Retinitis Pigmentosa.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 3469-3475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.18-24635.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kominami T, Ueno S, Kominami A, Nakanishi A, Yasuda S, Piao CH, Okado S, Terasaki H	4. 巻 1;58
2. 論文標題 Associations Between Outer Retinal Structures and Focal Macular Electroretinograms in Patients With Retinitis Pigmentosa.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 5122-5128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.17-22040.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okado S, Ueno S, Kominami T, Nakanishi A, Inooka D, Sayo A, Kondo M, Terasaki H	4. 巻 1;58
2. 論文標題 Temporal Properties of Flicker ERGs in Rabbit Model of Retinitis Pigmentosa.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 5518-5525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.17-22332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sayo A, Ueno S, Kominami T, Nishida K, Inooka D, Nakanishi A, Yasuda S, Okado S, Takahashi K, Matsui S, Terasaki H	4. 巻 27;7
2. 論文標題 Longitudinal study of visual field changes determined by Humphrey Field Analyzer 10-2 in patients with Retinitis Pigmentosa.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 16383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-16640-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inooka D, Ueno S, Kominami T, Sayo A, Okado S, Ito Y, Terasaki H	4. 巻 1;59
2. 論文標題 Quantification of Macular Microvascular Changes in Patients With Retinitis Pigmentosa Using Optical Coherence Tomography Angiography.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 433-438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.17-23202.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taro Kominami, Shinji Ueno, Satoshi Okado, Ayami Nakanishi, Mineo Kondo, Hiroko Terasaki	4. 巻 58 (3)
2. 論文標題 Contributions of Second- and Third-Order Retinal Neurons to Cone Electroretinograms After Loss of Rod Function in Rhodopsin P347L Transgenic Rabbits.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology and Visual Science	6. 最初と最後の頁 1417-1424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.16-20344.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueno Shinji, Kominami Taro, Okado Satoshi, Inooka Daiki, Kondo Mineo, Terasaki Hiroko	4. 巻 184
2. 論文標題 Course of loss of photoreceptor function and progressive Muller cell gliosis in rhodopsin P347L transgenic rabbits	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 192 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2019.04.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----