

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20319

研究課題名(和文) 網膜変性モデルにおける視細胞と血管障害の相関とその分子機序解明

研究課題名(英文) The evaluation of correlation between photoreceptor's degeneration and angiopathy in retinal degenerative model mouse.

研究代表者

折田 朋子 (ORITA, Tomoko)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50467792

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)：網膜を組織学的に解析した結果、網膜血管内皮細胞の大きさが野生型と比較し小さくなっていたことが認められた。また網膜以外の異常も多数見つかり、Prom1変異マウスでは腎臓の繊毛の密度と長さが著しく減少しており、血尿も観察された。野生型マウスと比較して、Prom1変異マウスでは視細胞外節層の変性を認めた。視細胞の変性が、マウスが開眼するp14以降でみられることから、この視細胞変性に光が関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The histological analysis revealed that the retinal vascular endothelial cells in Prom1 KO mice were smaller than ones in WT. Moreover the density and the length of renal cilia in Prom1 KO are much lower than WT and Prom1 KO mice have hematuria. The outer segments of photoreceptor in the KO mice were shortened compared with that of WT. This degeneration was initiated after the mice open their eyes, thus it suggested that the light exposure might cause Prom1-mediated photoreceptor degeneration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：網膜色素変性 視細胞 血流障害 Prom1 血管内皮細胞

### 1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は網膜の桿体細胞に変性をきたす疾患で、初期症状は夜盲や視野狭窄であるが、徐々に網膜血管の狭細化と錐体細胞の変性をきたし、最終的には視力が著しく低下する疾患である。近年では網膜色素変性に対し、遺伝子治療や骨髄幹細胞を眼内に注入する治療法が試されているが、未だ確立された治療法はなく、わが国の中途失明原因の第3位となっている。

網膜の最外層に位置する視細胞には桿体と錐体の2種類があり、桿体は暗所視、錐体は明所視と色覚に関与する。いずれの細胞も外節、内節、細胞核、神経終末から構成されており、明確な極性をもって配列している。桿体の外節には約1000枚のディスクが入っており、一つのディスク膜に数十万の視物質ロドプシンが存在している。内節にはミトコンドリアが存在し、外節と内節の間は結合繊毛(connecting cilia)によりつながっている。結合繊毛は視細胞外節の発生にかかわるほか、視細胞内の視物質輸送という役割を担っており、視細胞の構築・維持・代謝に非常に重要な働きをしている。

従来より繊毛に関しては古くから研究されてきたが、ここ最近繊毛の異常が、予想外の疾患と関連していることが明らかとなってきた。これまでに繊毛異常が、精子の運動能低下による不妊や、嗅覚異常を引き起こすことは知られていたが、新たに腎嚢胞や網膜変性の発症にも関与していることが判明した。Retinis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)の変異は網膜色素変性症の原因の約20%を占めるが、RPGRは視細胞の結合繊毛に存在し繊毛内輸送と相互作用している(Hong DH, et al. IOVS. 2003)。最近ではStargardt病や黄斑変性にProminin-1遺伝子の変異が関与していることが報告された(Dellett M, et al. IOVS. 2014)。この遺伝子に変異を持つ患者は、誕生時は視力に大きな問題はないものの、成長するにつれ夜盲症、黄斑変性が認められはじめ、最終的には多くがほぼ失明してしまう。このProminin-1 (Prom1; CD133)は5回膜タンパク質で、発生から成体の段階に至るまで個体の様々な部位に発現する(Corbeil D, et al. Traffic. 2001)。特に幹細胞に発現が高く、以前から、より未熟で幹前駆細胞群の機能的マーカーとして広く使われてきた。また、これまでの研究から網膜では視細胞の結合繊毛部に特異的に局在し、この遺伝子が結合繊毛の機能に深くかかわっている可能性が明らかとなった(Dellett M, et al. IOVS. 2014)。実際、Prom1のノックアウトマウスでは網膜変性が徐々に進行する結果が得られている。これらのことから、Prom1遺伝子は視細胞の機能維持に必須の役割を果たすと考えられる。またProm1は幹前駆細胞群の中でも血管内皮前駆細胞にその発現を認める。これまでの研究で、肺における血管構築の維持に寄与して

いるとの報告があるが、網膜血管への影響は不明である。これらのことから申請者は網膜変性と網膜血管の構造・機能維持に生物学的な関係があると考えた。そこで本研究では視細胞と血管内皮前駆細胞に局在を認めるProm1に焦点をあて、網膜におけるこの分子の機能およびその作用機序を明らかにし、網膜色素変性の視細胞変性と網膜血管異常の共通の分子機序解明を目的とする。最終的には、網膜色素変性の進行を抑制する新たな治療法の確立を目指す。

### 2. 研究の目的

網膜色素変性は、網膜の視細胞のうち、桿体細胞の変性および細胞死を生じる疾患である。しかしながら病変の首座は桿体細胞だけにとどまらず、徐々に網膜血管の狭細化が生じ、錐体細胞にも変性がおよび、ついには視力低下をきたす。現在わが国の中途失明原因の第3位を占める疾患であり、この疾患に対する治療法はまだ確立されていない。

一方、網膜血管の再構築をすることで錐体細胞の変性を防げるという報告もある。本研究の目的は、網膜変性を引き起こすモデルマウスを用いて、網膜色素変性における血管障害の分子メカニズムについて病態解明を行い、より特異的な治療法を開発することである。

### 3. 研究の方法

網膜変性における血管障害の分子メカニズムの解明を行い、網膜色素変性の進行抑制の治療薬の開発を目的として研究を遂行する。妊娠可能なProm1ノックアウトマウスを新たに作成し、この変異マウスにおける視細胞を含めた網膜組織と網膜血管構造を解析する。さらに、視細胞を含めた網膜細胞および血管内皮細胞に対する分子マーカーの発現変化を検討し、網膜機能や網膜血流の評価を行う。さらに、初期培養した網膜血管内皮細胞の増殖能や細胞死について検討する。またtube formationを検討することで、網膜変性を生じている血管形成・維持への作用を評価する。最終的にProm1を遺伝子導入し、この変異マウスにおける治療効果を確認する。

### 4. 研究成果

Prom1変異マウスを解析するにあたり、mouse Prominin1のエクソン2を含む遺伝子領域にlac-Zが組み込まれたProm1変異マウスを用いた。網膜を組織学的に解析した結果、Prom1変異マウスの網膜血管内皮細胞の大きさは、野生型のそれと比較し小さくなっていたことが認められた。また網膜以外の異常も多数見つかっており、Prom1変異マウスでは腎臓の繊毛の密度と長さが著しく減少しており、血尿も観察された。

さらにProm1がカルシウム作動性塩化物イオンチャネル(CaCC)であること、また

Prom1 が培養細胞において PI3K シグナルを惹起し、細胞の形態形成を制御することが明らかとなった。このことから、Prominin1 はアクチンの重合を促進し、細胞膜動態の調節にかかわっていると考えられた。

次年度の研究では、引き続き Prom1 変異マウスの解析を行った。野生型マウスと比較して、Prom1 変異マウスでは視細胞外節層の変性を認めた。Prom1 変異マウスの視細胞外節を用いて免疫組織学的にロドプシンと M-Opsin の局在を検討したところ、異所性にその発現が認められた。また視細胞の変性が、マウスが開眼する p14 以降でみられることから、この視細胞変性に光が関与していると考えられた。暗闇で Prom1 変異マウスを飼育すると視細胞外節の変性は認められず、ERG を用いて網膜機能を検討したが、やはり暗闇で飼育した Prom1 変異マウスは普通の明暗サイクルで飼育された Prom1 変異マウスと比較して障害は認められなかった。現在 Prom1 変異マウスの網膜から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた発現プロファイリングを施行している最中である。

つぎに繊毛形成のモデル細胞である RPE1 細胞を用いて検討した結果、RPE1 において Prom1 をトランスフェクションで強制発現させるとアクチン骨格が再編成され、細胞周囲にアクチン主体の突起、つまり Filopodia が発生することを認めた。

#### 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5件)

木村 和博, 守田 裕希子, 折田 朋子, 藤津 揚一郎, 小賀 厚徳: 眼窩原発 Merkel 細胞癌の 1 例. 日本眼科学会雑誌 121(12): 930-935, 2017. 査読有

Kimura K, Orita T, Kobayashi Y, Matsuyama S, Fujimoto K, Yamauchi K: Concentration of acute phase factors in vitreous fluid in diabetic macular edema. Jpn J Ophthalmol 61(6): 479-483, 2017. 査読有  
DOI: 10.1007/s10384-017-0525-x

Kimura K, Zhou H, Orita T, Kobayashi M, Nishida T, Sonoda KH: Suppression by an RAR- Agonist of Collagen Degradation Mediated by Corneal Fibroblasts. Invest Ophthalmol Vis Sci 58(4): 2250-2257, 2017. 査読有  
DOI: 10.1167/iov.15-18701

Kimura K, Zhou H, Orita T, Kobayashi S, Wada T, Nakamura Y, Nishida T, Sonoda KH: Inhibition by all-trans retinoic acid of collagen degradation mediated by corneal fibroblasts. Clin Experiment Ophthalmol 44(6):

502-508, 2016. 査読有

DOI: 10.1111/ceo.12709

Hatano M, Kimura K, Nomi N, Teranishi S, Orita T, Fujitsu Y, Sonoda KH: Combination management by C-arm fluoroscopy and extraocular muscle severance for penetrating ocular trauma with a retrobulbar foreign body. Orbit 35(3): 167-169, 2016. 査読有

DOI: 10.3109/01676830.2016.1139596

#### [学会発表](計9件)

野田 健, 折田 朋子, 緒方 惟彦, 吉本 拓矢, 湧田 真紀子, 徳田 和央, 柳井 亮二, 木村 和博: IgA 腎症に伴って網膜色素上皮障害をきたした 1 例. 第 56 回日本網膜硝子体学会総会, 東京都(東京国際フォーラム), 2017/12/02

吉本 拓矢, 守田 裕希子, 折田 朋子, 寺西 慎一郎, 山田 直之, 柳井 亮二, 木村 和博: 全層角膜移植術と硝子体手術を併施した症例. 第 56 回日本網膜硝子体学会総会, 東京都(東京国際フォーラム), 2017/12/02

折田 朋子: 糖尿病網膜症とその治療について. 目の健康講座 in 周南, 山口県(スターピアくたまつ), 2017/09/03

吉本 拓矢, 折田 朋子, 寺西 慎一郎, 山田 直之, 柳井 亮二, 木村 和博: 角膜移植を併施した硝子体手術症例の臨床像. 第 63 回山口眼科手術懇話会, 山口県(霜仁会館), 2017/07/08

西本 綾奈, 内 翔平, 波多野 誠, 折田 朋子, 原田 大輔, 柳井 亮二, 木村 和博: 広範囲な網膜病変がみられた HLA-B51 陽性の APMPE の一例. 第 129 回山口県眼科医会春季総会及び集談会, 山口県(翠山荘), 2017/05/28

波多野 誠, 折田 朋子, 徳田 和央, 柳井 亮二, 武田 篤信, 石橋 達朗, 園田 康平, 木村 和博: RAR アゴニストによる網膜色素上皮細胞の上皮間葉転換の抑制. 第 121 回日本眼科学会総会, 東京都(東京国際フォーラム), 2017/04/07

小林 由佳, 木村 和博, 折田 朋子, 藤津 揚一郎, 松山 茂生, 富士本 一志, 山内 一彦, 園田 康平: 糖尿病黄斑浮腫における硝子体液中 acute phase factor と視力の検討. 第 55 回日本網膜硝子体学会総会, 東京都(ベルサール渋谷ガーデン), 2016/12/03

原田 大輔, 柳井 亮二, 内 翔平, 折田 朋子, 藤津 揚一郎, 木村 和博, 園田 康平: 高齢者の急性網膜壊死 3 例の臨床像の検討. 第 53 回日本眼感染症学会, 東京都(東京国際フォーラム), 2016/07/01

波多野 誠, 柳井 亮二, 折田 朋子,

近本 信彦, 木村 和博: 強膜内陥術後に眼窩・皮下に迷入した MIRgel®を眼内内視鏡を用いて除去した一例. 第 61 回山口眼科手術懇話会, 山口県(霜仁会館), 2016/06/18

〔図書〕(計 0 件)

〔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

折田 朋子 (ORITA, Tomoko)  
山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 5 0 4 6 7 7 9 2

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

なし