

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11471

研究課題名(和文) 脈絡膜血管板形成を担う神経網膜由来因子の作用機序の解析

研究課題名(英文) The molecular basis of choroidal vascular development and RPE maintenance

研究代表者

大西 暁士(Akishi, Onishi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・上級研究員

研究者番号：70569102

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)：我々は、背側部神経網膜発現するレチノイン酸合成酵素Aldh1a1の欠損マウスが脈絡膜低形成の表現型を示す事を見出し、脈絡膜形成の分子機序および低形成より引き起こされる病態について解析を行った。この結果、神経網膜で合成されるレチノイン酸が胎生期においてRPEでの転写因子Sox9の発現を増強し、このSox9が脈絡膜側に分泌されるVEGFを調節することで脈絡膜血管形成を制御する事、および老化に伴い萎縮型加齢黄斑変性の病態を認めた。脈絡膜の発生が脈絡膜以外の部位から制御されるという本研究成果は、AMDを含めた網脈絡膜疾患の病態解明、および発症前診断や治療法開発に対し新たな知見を提供する事が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Aldh1a1はマウスでは神経網膜背側部分に特異的に発現し、欠損マウスでは外側の脈絡膜毛細血管板に低形成を認めた解析結果は、神経網膜由来のレチノイン酸がRPEを挟んで更に外側の脈絡膜血管の形態形成に影響を及ぼす事を示す。これは、網膜発生学的に新規性が極めて高い研究成果であり、他の組織の血管形成機構の分子機序に関する新たな知見をもたらす。

また、前駆病変における遺伝子発現を同定した本研究成果は、中途失明原因の上位疾患である加齢黄斑変性の病態解明および先制医療(発症前予測・予防的治療)への応用が期待される事から医学的意義が高く、患者QOLの向上に寄与する事からも社会的にも大きな意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Age-related macular degeneration (AMD) is characterized by degeneration in photoreceptors, retinal pigment epithelium (RPE), and choriocapillaris, however, the etiology of AMD remains largely unknown. We found that Aldh1a1 KO mice show choroidal hypoplasia with the poor vasculature phenotype at the dorsal area from embryonic stage. Aldh1a1, an enzyme that synthesizes retinoic acids (RAs), is expressed in the embryonic dorsal neural retina, not in the RPE/choroid complex. We showed that RAs produced by Aldh1a1 in the neural retina directs dorsal choroidal vascular development via Sox9 upregulation in the dorsal RPE cells to enhance RPE-derived VEGF secretion. In the aged Aldh1a1 KO mouse, we found RPE degeneration and mislocalization of RPE markers. Also, these mice showed fragmentations of photoreceptors and attenuated REG b-wave response. The degeneration of RPE and photoreceptors in the aged Aldh1a1 KO mice are reminiscent of geographic atrophy, a characteristic lesion of dry AMD.

研究分野：分子発生学

キーワード：神経網膜 網膜色素上皮 脈絡膜血管 加齢黄斑変性 レチノイン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

網膜組織は、光情報伝達を担う神経網膜と、その外側の栄養供給や老廃物除去を行う色素上皮細胞（RPE）および脈絡膜血管により構成される。加齢黄斑変性症は、網膜色素上皮下のドルーゼン（老廃物）の蓄積を初期変化として、網膜下脈絡膜に新生血管を生じて RPE と神経網膜を傷害する滲出型と、網脈絡膜毛細血管板萎縮を生じる萎縮型に分類される。近年、血管形成を司る血管内皮増殖因子（VEGF）に対する薬剤（抗 VEGF 薬）の開発により滲出型の病状の悪化の抑制が可能となったが、対症療法としての域を出ず再発・増悪に至る事例も散見される。また、萎縮型に関しては有効な治療法は全く無く、脈絡膜毛細血管板の形成・維持の分子機序の理解が加齢黄斑変性症の病理解明と病変の早期発見に有効と考えられている。

脈絡膜毛細血管板の発達および維持において、RPE より脈絡側に分泌される VEGF が重要である事が動物実験による研究結果から明らかになっている。我々は、レチノイン酸合成活性を持つアルデヒド脱水素酵素 Aldh1a1 (Aldehyde Dehydrogenase 1a1) がマウス神経網膜背側部で発現し、同欠損マウスが背側脈絡膜のメラノサイト欠損と脈絡膜血管の低形成を示す事を見出した (図 1)。この結果は、神経網膜由来のレチノイン酸が脈絡膜血管の発達・維持に関与する事を強く示唆した。

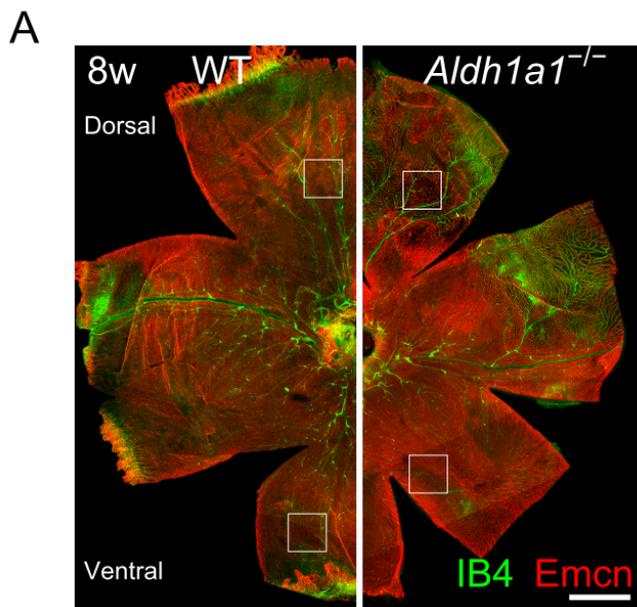


図 1 Aldh1a1 欠損マウスは背側部脈絡膜血管の低形成を呈する。中大血管は IB4（イソレクチン B4）で、毛細血管は Endomucin 抗体で染色

2. 研究の目的

我々は、Aldh1a1 の時空間的発現パターンおよび欠損マウスの表現型より、RPE より分泌される VEGF 量が神経網膜で合成されるレチノイン酸により制御され、その破綻が脈絡膜毛細血管板の低形成や加齢黄斑変性発症の原因となる仮説に至った。そこで本研究課題では、(1) 神経網膜由来レチノイン酸による RPE 由来 VEGF 増強の分子機構、(2) Aldh1a1 欠損マウスの脈絡膜低形成に伴う病変と、(3) 病変に至る分子機序 を解析し、脈絡膜血管の発達維持を担う分子機序および加齢黄斑変性病変の発症機構について神経網膜由来のレチノイン酸の作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

上記の研究目的の遂行のため、以下の研究を行った。

(1) レチノイン酸依存的に RPE 由来 VEGF 分泌が増強される分子機構の解明

Aldh1a1 欠損マウスにおける背側部 VEGF の発現量の低下およびレチノイン酸依存的 VEGF 発現を検証する。また、血管形成に関与する既知の分子のレチノイン酸濃度依存的発現および脈絡膜血管形成への関与を検証する。

(2) Aldh1a1 欠損マウスの表現型解析と加齢黄斑変性病変との比較解析

Aldh1a1 マウスは網膜背側部で脈絡膜低形成の表現型を示す。そこで胎生期、成体（若年期・老齢期）において脈絡膜血管および RPE 特異的マーカーによる免疫組織化学的解析および電子顕微鏡による形態学的解析による比較解析を行う。また、電気生理学的解析・行動学的解析より、老齢マウスの視覚弁別機能を評価する。

(3) 網膜変性に至る分子機序の解析

網膜由来のレチノイン酸の不足が RPE・神経網膜の形態異常を引き起こすと考えられる。そこで病態進行前の時期の RPE・神経網膜を用いて RNA-seq 解析を行い、発現変動を示す分子より病態に至る分子機序を解析する。

4. 研究成果

(1) Aldh1a1 に合成されるレチノイン酸は RPE の Sox9 の発現を促進する事により VEGF の分泌を制御する

マウス脈絡膜の発生は胎生 13.5 日頃から始まり、RPE から VEGF が分泌されるのが胎生 12.5 日頃である。また、*Aldh1a1* は胎生 11.5 日頃より背側部神経網膜に発現する。まず、胎生 17.5 日と生後 24 日の脈絡膜の VEGF 量を ELISA にて測定した結果、WT マウスに比して *Aldh1a1* 欠損マウスで有意に VEGF 発現量が低下し、また胎生期 VEGF mRNA の発現パターンを *in situ* hybridization により比較したところ、*Aldh1a1* 欠損マウス背側部 RPE において有意な低下を認めた (図 2 上段)。レチノイン酸の基質となるビタミン A を含有しない飼料を WT の妊娠マウスに与え、生体内レチノイン酸量を低下させた場合の脈絡膜血管の発達を評価した結果、ビタミン A 欠損飼料にて飼育したマウスから生まれた産仔は背側部にのみ脈絡膜低形成を呈した (図 2 中段)。逆に、*Aldh1a1* 欠損マウス胎児を妊娠している母親マウス対しレチノイン酸を経口投与したところ、産仔マウスの背側部の脈絡膜血管密度は有意に増加した (図 2 下段)。さらに、ヒト初代培養 RPE においてレチノイン酸濃度依存的に VEGF 分泌量が増加した。これら結果から、RPE から分泌される VEGF は *Aldh1a1* に合成されるレチノイン酸より制御されていることが示された。

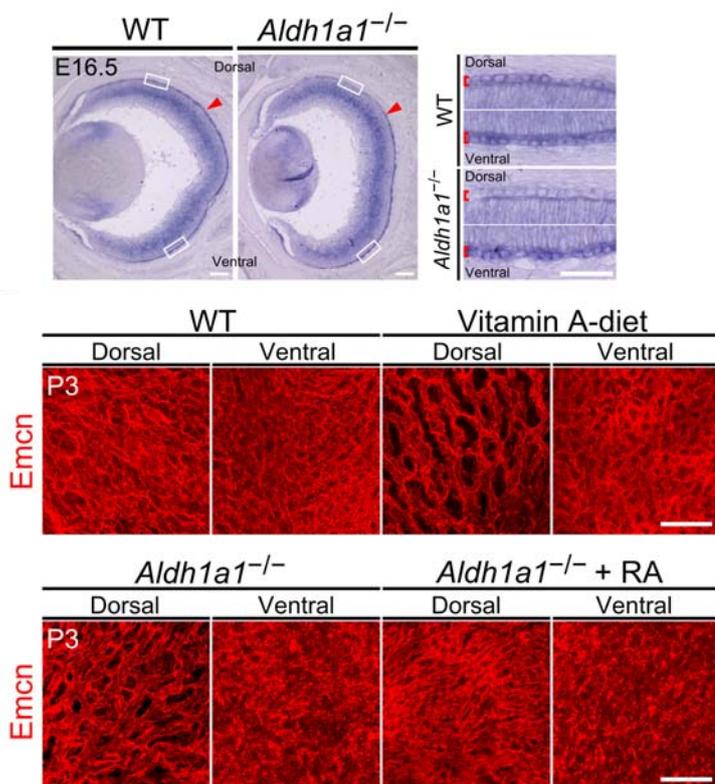
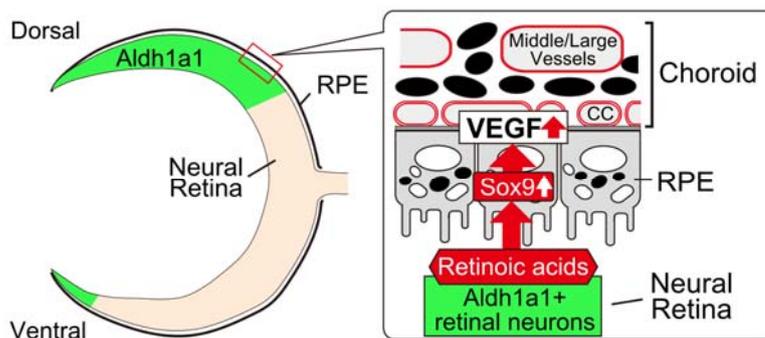
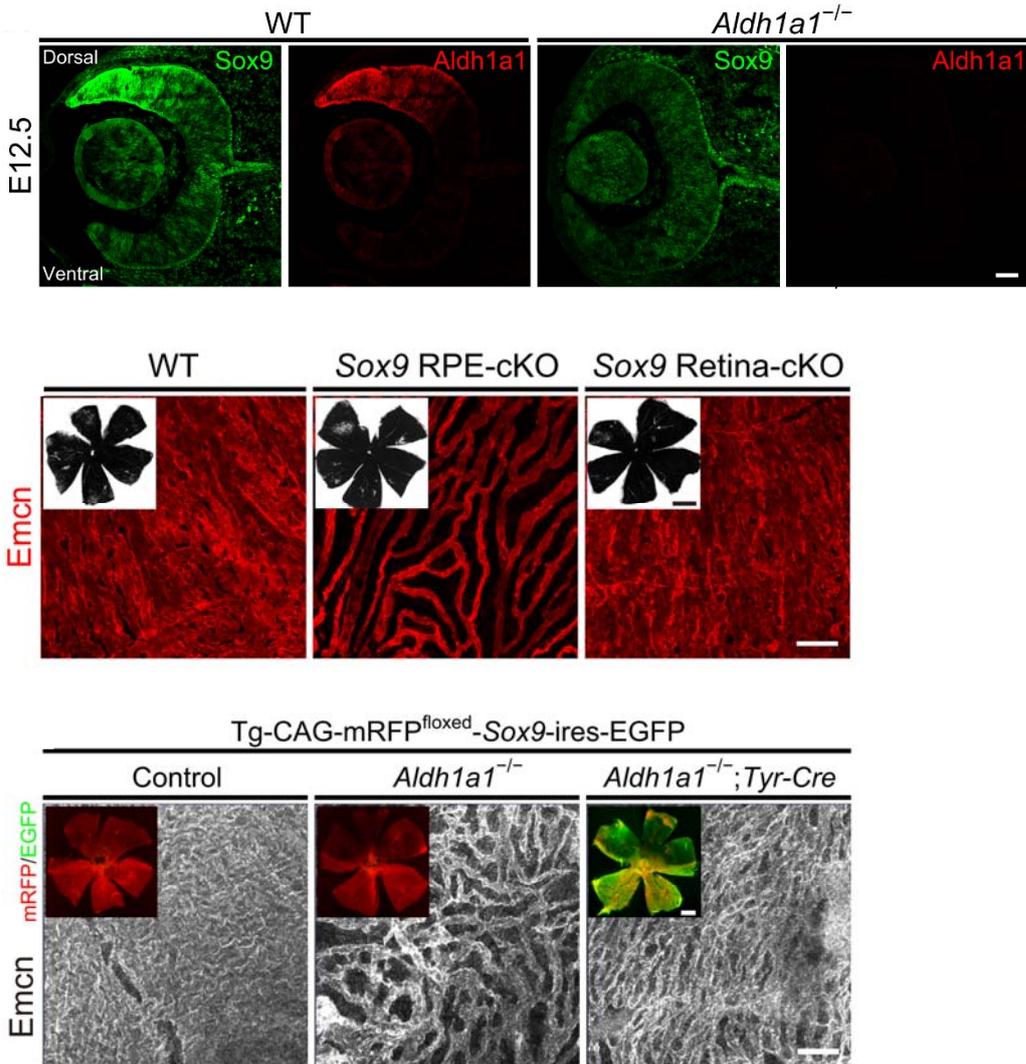


図 2

次に、レチノイン酸により VEGF 発現を促す RPE 内の責任分子の同定を試みた。脈絡膜血管低形成の表現型を示すマウスとして、転写因子 *Pax6* の RPE 特異的コンディショナルノックアウトマウスが報告されており、クロマチン免疫沈降法により *Vegf* プロモーターには *Pax6* と *Sox9* が結合する事が示されていた。そこで、我々は *Aldh1a1* 欠損マウスにおける *Pax6* および *Sox9* の発現を WT と比較したところ、胎生 14.5 日の *Aldh1a1* 欠損マウス RPE は WT マウスより *Sox9* 発現の有意な減弱を認めた (図 3 1 段目)。ヒト初代培養 RPE を用いてレチノイン酸暴露による *Sox9* と VEGF の発現を RT-qPCR で定量した結果、レチノイン酸濃度依存性に *Sox9* と VEGF の発現が増加し、*Sox9* の過剰発現およびノックダウンに伴い VEGF 発現が増減した。また RPE 特異的に *Sox9* を欠損するコンディショナルノックマウスにおいて、*Aldh1a1* 欠損マウスと同様の背側部の脈絡膜血管の低形成を認め (図 3 2 段目)、*Aldh1a1* 欠損マウスで RPE 特異的に *Sox9* を強制発現させると、脈絡膜低形成の回復を認めた (図 3 3 段目)。以上の結果から、*Aldh1a1* 由来のレチノイン酸に誘導される RPE 内の転写因子は *Sox9* であるこ

と、および Sox9 が背側部の脈絡膜毛細血管の形成に関与する事が示された (図3 4 段目)。



(2) 老齢期 Aldh1a1 欠損マウスは、萎縮型加齢黄斑変性の病態を示す

2ヶ月齢前後の成体 Aldh1a1 欠損マウスでは、脈絡膜ホルマウント組織による免疫組織学的解析において、脈絡膜の菲薄化すなわち脈絡膜毛細血管板および中大血管板の低形成の表現型が Aldh1a1 が発現する背側部分に限局して認められる。しかし、神経網膜および RPE における形態学的異常は免疫組織化学的解析および電子顕微鏡解析において WT マウスと比して有意な形態学的変容は認められなかった。

一方、18ヶ月齢の老齢 Aldh1a1 欠損マウスにおいて、僅かに網膜色素変性の初見を認め、RPE ホールマウント免疫組織化学的解析において、RPE の縮退および RPE マーカーの減弱を認めた。また、電子顕微鏡解析において、RPE が菲薄化しておりメラノソームの局在変化や内部の空隙増加等の変容を認め、神経網膜視細胞外節部の断片化が観察された。網膜電図の応答も老

齢マウスにて有意な減弱が認められ、これらの変容は萎縮型加齢黄斑変性の病態に類似していた。この変容は網膜全体で認められたが、脈絡膜低形成が認められる背側部でより顕著であった。

(3) Aldh1a1 の網膜変性前の RPE・神経網膜での遺伝子発現変化

Aldh1a1 欠損マウスの網膜色素上皮細胞および神経網膜の RNA-seq 解析を行った。免疫組織化学的解析では変性の表現型が認められない 10 ヶ月齢の壮年期マウスにおいて RPE および神経網膜の mRNA 発現について解析したところ、RPE においては AMD や L-ORMD (late-onset retinal macular degeneration) 関連の原因遺伝子・リスク因子の有意な変化を認めた。また、神経網膜においては炎症系・ストレスマーカー因子の有意な上昇を認めた。また、Aldh1a1 で発現変化した遺伝子について、出生後よりビタミン A を含有しない飼料で 10 ヶ月飼育したマウス RPE にて RT-qPCR により発現量比較したところ、遺伝子発現変動は Aldh1a1 欠損マウスと異なる傾向を示した。この結果より、Aldh1a1 欠損マウスにおける加齢黄斑変性様の病態は胎生期から新生児期における脈絡膜血管の低形成の影響である事が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Goto S, Onishi A, Misaki K, Yonemura S, Sugita S, Ito H, Ohigashi Y, Ema M, Sakaguchi H, Nishida K, Takahashi M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Neural retina-specific Aldh1a1 controls dorsal choroidal vascular development via Sox9 expression in retinal pigment epithelial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 none
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.32358	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11件（うち招待講演 6件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 So Goto, Onishi Akishi, Yoko Ohigashi, Sakaguchi Hirokazu, Nishida Kohji, Takahashi Masayo
2. 発表標題 RPE-specific Sox9 controls dorsal choroidal vascular development in the mouse retina.
3. 学会等名 ARVO 2018 annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akishi Onishi, So Goto, Kazuyo Misaki, Shigenobu Yonemura, Sunao Sugita, Hiromi Ito, Yoko Ohigashi, Masatsugu Ema, Hirokazu Sakaguchi, Kohji Nishida, Masayo Takahashi
2. 発表標題 Aldh1a1 controls choroidal vascular development and RPE maintenance.
3. 学会等名 Gordon Research Conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akishi Onishi
2. 発表標題 Effect of neural retina on choroidal development
3. 学会等名 French-Japan Seminar “Regenerative Medicine for Vision Restoration”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akishi Onishi
2. 発表標題 Exploring retinal development and disease with stem cells and animal models
3. 学会等名 Duke-NUS Research Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akishi Onishi
2. 発表標題 Exploring retinal development and disease with stem cells and animal models
3. 学会等名 SERI Research Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西暁士、後藤聡、増田智浩、松下登起義、松山高、西田光宏、松村みちる、大東揚子、高橋政代
2. 発表標題 網膜疾患の病態解析モデルの確立と創薬展開について
3. 学会等名 第27回 視覚障害リハビリテーション研究発表大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akishi Onishi
2. 発表標題 On the leading edge of clinical work on iPS cells
3. 学会等名 AAAS 2019 Annual meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Goto S., Onishi A., Misaki K., Yonemura S., Sakaguchi H., Nishida K., Takahashi M.
2. 発表標題 Retinal degeneration with choroidal hypoplasia in aged Aldh1a1 ^{-/-} mice
3. 学会等名 arvo 2018 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 後藤聡、大西暁士、伊藤裕美、大東揚子、坂口裕和、高橋政代、西田幸二
2. 発表標題 神経網膜由来レチノイン酸による網膜色素上皮を介した脈絡膜発達制御機構
3. 学会等名 第7回AOMS眼科先進医療研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 後藤聡、大西暁士、高橋政代
2. 発表標題 脈絡膜毛細血管の発達は神経網膜由来レチノイン酸によって制御される
3. 学会等名 第2回秋期特別日本血管生物医学会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akishi Onishi
2. 発表標題 Neural retina-derived retinoic acids control choroidal vasculature development
3. 学会等名 International Symposium on Biophysics of Rhodopsins (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----