

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16954

研究課題名(和文) RPE65遺伝子変異網膜色素変性に対する9-シス-レチノイドによる視細胞保護効果

研究課題名(英文) Photoreceptor protection by 9-cis-retinoid in retinal degeneration in RPE65<sup>-/-</sup> mice

研究代表者

前田 奈津姫 (Maeda-Monai, Natsuki)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：20748769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性の原因遺伝子の一つであることが知られているRPE65遺伝子を人工的に変異させて作成したRPE65ノックアウトマウスを用いて、9-シス-レチナルを生後27日齢にて経口摂取させ、その後の視細胞変性の進行を光干渉断層計と網膜電図にて観察した。その結果、摂取7日後では光干渉断層計所見では摂取群と対照群との形態的な差異はみられなかったが、網膜電図にてa波およびb波とのその振幅は摂取群の方が統計学的に有意に大きかった。以上から、RPE65遺伝子欠損には9-シス-レチナル経口摂取の有効性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RPE65 (retinal pigment epithelium 65kDa protein) は網膜色素上皮において視細胞から運搬された全-トランス-レチナルを11-シス-レチナルに変換することにより11-シス-レチナルの再生を司っている。RPE65遺伝子変異により、11-シス-レチナルの再生が障害されることで視細胞が変性するが、この遺伝子型をもつ網膜色素変性に対しては9-シス-レチナルを経口投与にて摂取することで視細胞変性を抑制することができる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the RPE65 gene have been known to cause retinitis pigmentosa. To confirm the photoreceptor protective effects of 9-cis-retinal, we fed RPE65 knock-out mice by per os administration of 9-cis-retinal on postnatal 27 days old and checked whether we could find photoreceptor protective effects after administration of 9-cis-retinal using optical coherence tomography (OCT) and electroretinography (ERG). Results showed that although there was no morphological difference by OCT, there were statistically significant differences in the amplitudes of ERG a- and b-waves after 7 days of administration of 9-cis-retinal. The result indicated that administration of 9-cis-retinal has a therapeutic potential for retinitis pigmentosa caused by the mutations in the RPE65 gene.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素変性 RPE65 9-シス-レチナル 視サイクル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は遺伝性の視細胞変性疾患で、視細胞杆体変性を初発とし、次第に視細胞錐体変性へと進行する。したがって、初期症状として夜盲などの暗順応障害が生じ、徐々に周辺部から求心性に視野狭窄が進行する。その後、やがて中心視野障害から視力低下や色覚異常へと進むのを特徴としている。本疾患は、本邦における視覚障害の原因疾患の14%を占め、緑内障に次いで第2位に位置する視覚障害対策としては主要な疾患に位置する。本疾患の原因遺伝子異常が判明している症例は網膜色素変性全体の高々40%程度でしかないものの、判明した原因遺伝子はすでに65種類以上になっており、原因遺伝子の多様性が際立っている。このうちRPE65 (retinal pigment epithelium 65-kDa protein) 遺伝子の変異によって発症する網膜色素変性では網膜色素上皮に特異的に発現するRPE65の欠損によって網膜色素上皮による全トランスレチナルが11-シス-レチナルに変換されないために、視細胞に存在する視物質の発色団の供給不良が生じて、結果的に視細胞変性が生じることが知られている。この病態に対しては近年、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて野性型塩基配列のRPE65遺伝子を網膜色素上皮細胞に導入する方法が成果を上げたことが報告され、一部では臨床応用されつつあるが、このような遺伝子治療は高額な医療費を必要とするため現段階では誰にでも行える治療とは言えないのが実情である。そこで、本研究では再生できない11-シス-レチナルの代替として外因性に9-シス-レチナルを経口投与することで視細胞の機能を補助できれば、結果的に視細胞変性を遅延させる効果があるのではないかと考えて研究を進めることとした。RPE65遺伝子異常に対する9-シス-レチナル経口投与の効果についてはすでに報告があるところではあるが、当教室にて飼養しているRPE65ノックアウト(RPE65<sup>-/-</sup>)マウスを用いて、光干渉断層計(optical coherence tomography, 以下OCT)にて形態的に、また全視野網膜電図(full-field ERG, 以下ERG)を用いて機能的に評価することも十分意義があるのではないかと考えて研究を行うべく計画した。もし、この治療法の有効性が確認されれば遺伝子治療に比べてはるかに安価で簡便な治療法として日常臨床に応用可能となるはずである。

### 2. 研究の目的

本研究者の研究室では近年、RPE65<sup>-/-</sup>マウスにおける網膜視細胞変性の自然経過をOCTによる形態変化とERGによる機能変化の両面から解析した(参考文献1)。本研究では、RPE65<sup>-/-</sup>マウスの視細胞変性過程に9-シス-レチナルを経口で投与した場合に、視細胞変性がどのような影響を受けるかを明らかにすることを目的とした。本研究ではOCTにより、網膜とくに視細胞形態の定性的および定量的解析を行い、ERGにより視細胞の電気生理学的な機能の変化に注目することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) RPE65<sup>-/-</sup>マウスの飼養

RPE65<sup>-/-</sup>マウスはカリフォルニア大学サンフランシスコ校のMathew M. LaVail博士から供与され、本学大学院医学研究科附属動物実験施設にて継代的に飼養されている個体を用いた。飼育環境は12時間ずつの明暗周期(明順応:50lx照明、暗順応:10lx未満)で、飼料と飲用水の摂取は*ad libitum*とされた。このRPE65<sup>-/-</sup>マウスにおける視細胞変性の自然経過の詳細についてはすでに報告されている(参考文献1)。

#### (2) 9-シス-レチナル液の調整と経口投与

研究用9-シス-レチナルを10mg/mlになるように食用ベジタブルオイルに溶解した。この溶解液0.25mlをgavage needle(20-gauge 3.5cm long gavage needle)を用いて生後27日齢のRPE65<sup>-/-</sup>マウス9頭に対して無麻酔で経口的に胃内へ注入し、これを投与群とした。対照群として無処置のRPE65<sup>-/-</sup>マウス6頭を用いた。

#### (3) OCTによる形態的観察

投与群5頭と対照群6頭を使用した。生後34日齢(投与群では9-シス-レチナル投与7日後)と生後38日齢(投与群では9-シス-レチナル投与11日後)のRPE65<sup>-/-</sup>マウス(両群)をメドミジン(0.315g/kg)、ミダゾラム(2.0mg/kg)、およびブトルファノール(2.5mg/kg)の三種混合液を腹腔内投与することにより全身麻酔とし、右眼を0.5%トロピカミドと0.5%フェニレフリンの配合点眼液により散瞳した。散瞳眼についてMicron IV OCT(Phoenix社、USA)を用いてOCT画像を撮像した。撮像部位は生後34週齢時には視神経乳頭を含む水平断面とし、生後38日齢においては既報同様、視神経乳頭の中心から半径500 $\mu$ mの円周断面とした。得られた画像は生後34日齢像については両群を定性的に観察し、生後38日齢像については両群を定性的および定量的に解析した。定量解析に当たっては、ソフトウェアであるInSight<sup>®</sup>を使用して網膜表層(神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層、外網状層)、外顆粒層、光受容体層、網膜色素上皮から外層までの4層に分けて画像上の平均層厚を算出して両群間の統計学的な差異を比較検討した。

#### (4) ERGによる機能解析

生後34日齢の投与群5頭と対照群6頭を使用した。両群とも24時間の暗順応の後、前述の

全身麻酔を施行し、右眼を散瞳させた。ERG は Phoenix 社の Full-field ERG を用い、 $3.0\text{cd}/\text{m}^2$  の緑色光刺激により桿体と錐体の両者を刺激して得られる波形 (a 波と b 波) を記録した。波形から両群間の両波の振幅を求め、統計学的に比較解析した。

#### (5) 統計学的解析

統計学的な解析には SPSS (IBM 社) vol. 26 を用い、両群の各データの正規性を確認した後に Student t-検定により両群間の差異を解析した。

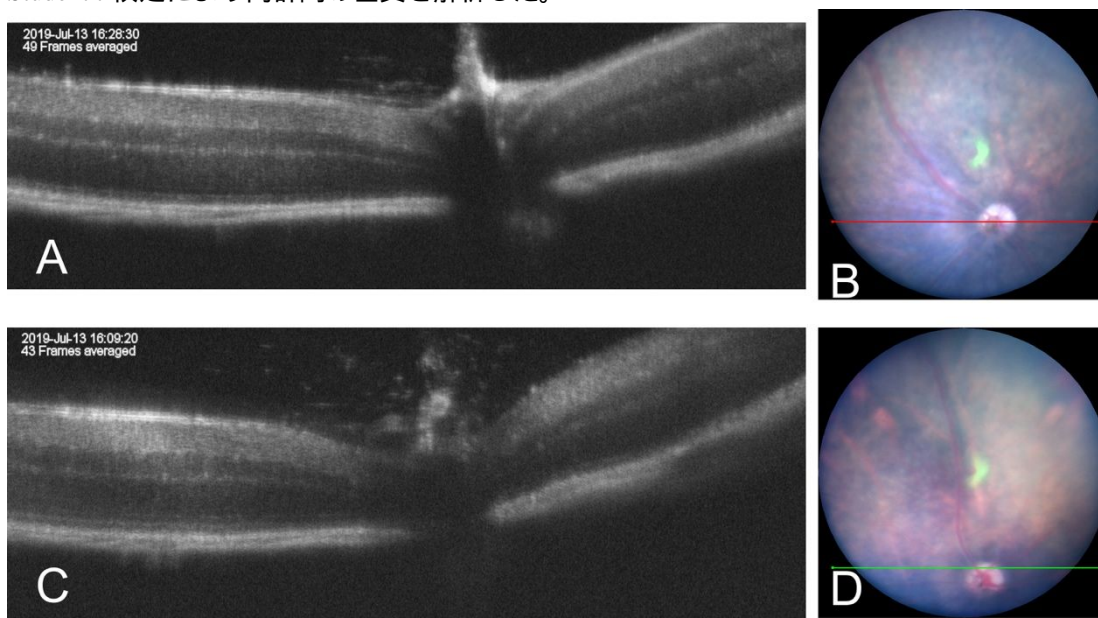


図 1 生後 34 日齢の RPE65<sup>-/-</sup>マウスの OCT 像と眼底写真を示す。A、対照群の OCT 像。B、A の個体の眼底写真。赤線は OCT を撮像した断面の位置を示す。C、投与群の OCT 像。D、C の個体の眼底写真。緑線は OCT 断面の位置を示したもの。両群とも網膜各層厚に差異はみられず、ellipsoid zone もほぼ正常の構造を示している。

## 4. 研究成果

### (1) 9-シス-レチナール経口投与後の OCT による解析

生後 34 日齢での OCT 像と眼底所見を図 1 に示す。対照群 (図 1 A, B) と投与群 (図 1 C, D) との間には網膜厚と網膜内の構造に定性的な差異は生じていない。また、この時期には両群とも光受容体層内の ellipsoid zone と称される部位の所見もほぼ正常構造と言ってよい所見である事がわかる。次に生後 38 日齢での両群での OCT 象と眼底所見を図 2 に示す。図 1 同様に両群間で網膜厚と網膜内構造に定性的な差異は生じていないように観察された。実際に各層厚を計測してみると網膜表層 (投与群  $109.936 \pm 2.611\mu\text{m}$   $n = 5$ 、対照群  $110.456 \pm 3.752\mu\text{m}$   $n = 6$ 、 $P = 0.800$ ) 外顆粒層 (投与群  $53.124 \pm 2.522\mu\text{m}$ 、対照群  $51.802\mu\text{m}$ 、 $P = 0.336$ ) 光受容体層 (投与群  $30.828 \pm 3.621\mu\text{m}$ 、対照群  $31.691 \pm 1.650\mu\text{m}$ 、 $P = 0.611$ ) 網膜色素上皮細胞以降 (投与群  $33.292 \pm 1.911$ 、対照群  $31.277 \pm 2.874$ 、 $P = 0.215$ ) とともに両者間には有意な差異は認められなかった。また、生後 34 日齢時に比較して光受容体層が両者とも同様にびまん性に高輝度化しており、生後 34 日から 38 日までの間に視細胞変性が両群共に進行したことが推察された (図 2)。

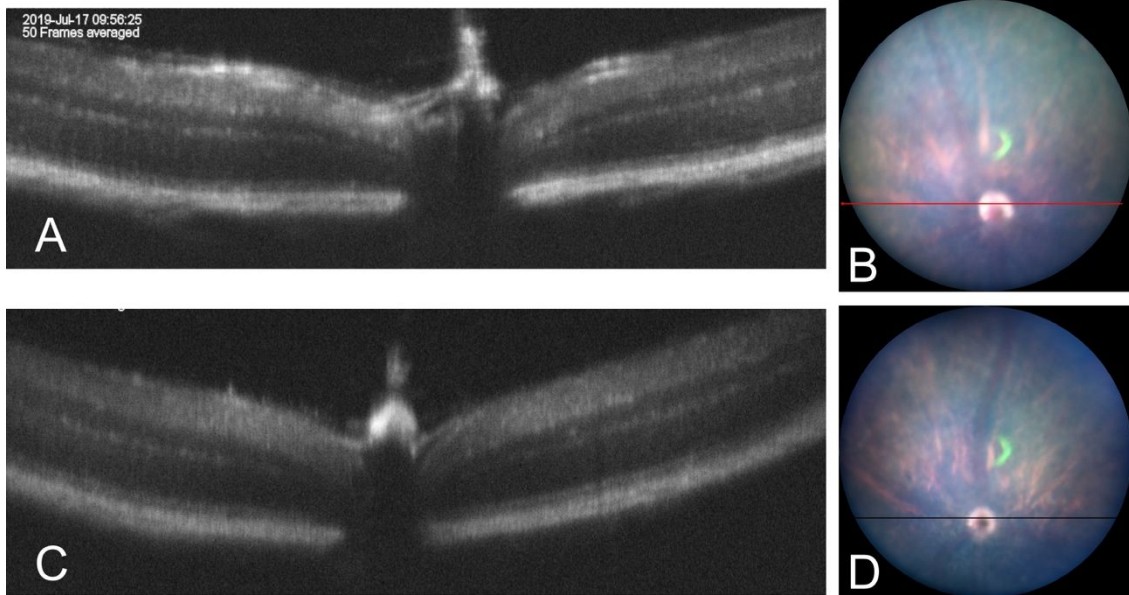


図2 生後38日齢のRPE65<sup>-/-</sup>マウスのOCT像と眼底写真。A, Bは対照群、C, Dは投与群であることは図1と同様である。生後34日齢と異なり、ellipsoid zone ははっきりとは判別できなくなりびまん性に高輝度となっている。両群とも硬膜各層厚には差異はみられない。

(2) 9-シス-レチナール経口投与後のERGによる解析

生後34日齢でのERGの代表的波形を図3に示す。両群を比較するとa波、b波ともに明らかに投与群の方が振幅が保持されていることが分かる。定量的にみてもa波振幅は投与群が  $54.40 \pm 9.84 \mu\text{V}$  ( $n=5$ ) であるのに対して対照群は  $17.60 \pm 3.97 \mu\text{V}$  ( $n=5$ ) で両者の間に有意の差を認めた ( $P=0.009$ )。しかしb波振幅は投与群が  $127.60 \pm 44.61 \mu\text{V}$  であるのに対して、対照群は  $36.00 \pm 1.92 \mu\text{V}$  であり、両者の間にはt検定では有意の差異を認めなかった ( $P=0.074$ )。

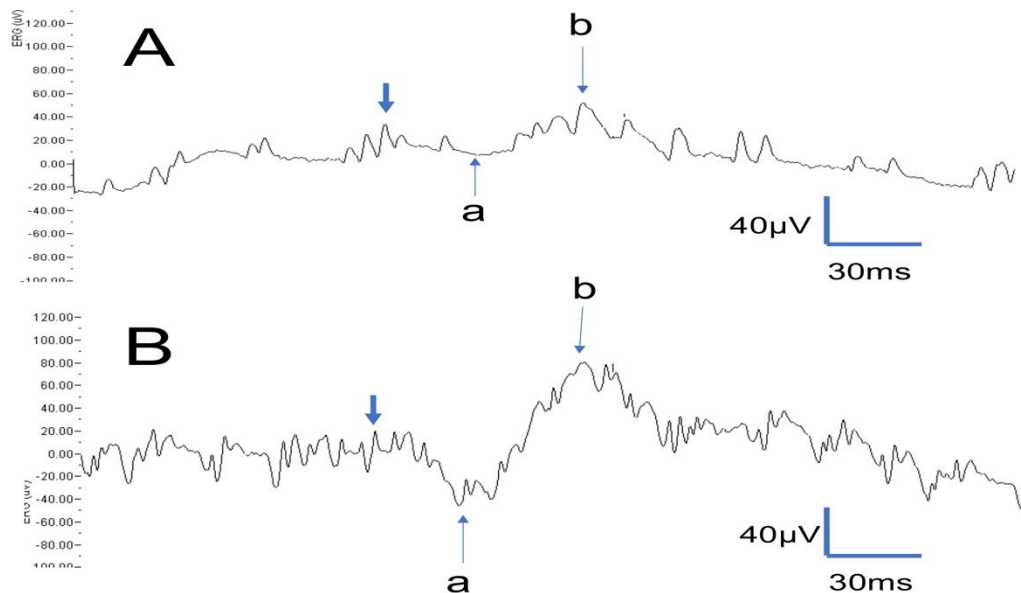


図3 生後34日齢のRPE65<sup>-/-</sup>マウスのERGの典型例。A、対照群、B、投与群。太矢印が光刺激照射時点を示す。a波とb波の位置はそれぞれ細矢印で示した。

### (3) 考按

本研究においてRPE65欠損による視サイクル異常によって引き起こされる網膜色素変性は主として網膜色素上皮の異常が原発巣であり、視細胞自体には代謝異常がないため視細胞の変性は比較的軽症である可能性がある。このため外部から11-シス-レチナールの代わりに9-シス-レチナールを供給することにより、9-シス-レチナールを視物質の発色団として利用することで比較的容易に視細胞機能が改善させることが可能となると考えられる。この機能改善は比較的速やかに生じ、かつ形態的に変化がでる相当以前からみられる変化であることが確認された。今回の研究では投与群のERGの各波振幅には個体差がみられ、これは恐らく9-シス-レチナールの投与手技の問題であり、強制的な胃への注入効率にバラツキが生じたためであるかもしれないと考えられた。実際に9頭に対して経口投与したが、うち4頭は投与1週以内に死亡した。これは胃内への挿管と薬液注入が相当なストレスとなった可能性もあり、今後の改善点かと思われた。しかし、上手く胃内に注入できたと考えられた個体についてはERGでみるように、視細胞機能回復は明らかであり、それは投与後短期ではOCTによる形態変化の観察以上に効果的な判定法であることが明らかとなった。今後の臨床応用を考えた場合、網膜色素変性の遺伝子診断によりRPE65遺伝子バリエーションによる網膜色素変性であることが診断された症例については9-シス-レチナールの経口投与も治療法の選択肢として考慮してもよいのではないかと考えられる。まだ長期投与後の副作用、例えば全-トランス-レチナールや全-トランス-レチニルエステルなどの異常蓄積による弊害などがどの程度なのかなどを検討する必要性は残るが、今後さらに本研究を発展させる意義は十分認められるものと考えられた。

### <参考文献>

1. Tanabu R, Sato K, Monai N, Yamauchi K, Gonome T, Xie Y, Takahashi S, Ishiguro S, Nakazawa M. The findings of optical coherence tomography of retinal degeneration in relation to the morphological and electroretinographic features in RPE65<sup>-/-</sup> mice. PLOS ONE, 14 (1): e0210439, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210439>

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Tanaka-Gonome T, Xie Y, Yamauchi K, Maeda-Monai N, Tanabu R, Kudo T, Nakazawa M.	4. 巻 23
2. 論文標題 The protective effect of astaxanthin on the ganglion cell complex in glutamate/aspartate transporter deficient mice, a model of normal tension glaucoma, analyzed by spectral-domain optical coherence tomography.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 ID 100777
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2020.100777	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 Suzuki Y, Adachi K, Maeda N, Tanabu R, Kudo T, Nakazawa M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Proliferative diabetic retinopathy without preoperative pan-retinal photocoagulation is associated with higher levels of intravitreal IL-6 and postoperative inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Retina and Vitreous	6. 最初と最後の頁 24 eCollection
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40942-020-00222-3	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 Suzuki Y, Suzuki K, Tanabu R, Maeda N, Nakazawa M	4. 巻 18
2. 論文標題 Intraoperative choroidal detachment occurring in a case of perforating ocular injury.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology Case Reports	6. 最初と最後の頁 100643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoc.2020	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 Xie Y, Gonome T, Yamauchi K, Maeda-Monai N, Tanabu R, Ishiguro S-I, Nakazawa M	4. 巻 15
2. 論文標題 A spectral-domain optical coherence tomographic analysis of RDH5 <sup>-/-</sup> mice retina.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 pone.0231220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0231220.	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 Gonome T, Xie Y, Arai S, Yamauchi K, Maeda-Monai N, Tanabu R, Kudo T, Nakazawa M	4. 巻 2019
2. 論文標題 Excess glutamate may cause dilation of retinal blood vessels in glutamate/aspartate transporter-deficient mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 ID 6512195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/6512195	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 Tanabu R, Sato K, Monai N, Yamauchi K, Gonome T, Xie Y, Takahashi S, Ishiguro S, Nakazawa M	4. 巻 14
2. 論文標題 The findings of optical coherence tomography of retinal degeneration in relation to the morphological and electroretinographic features in RPE65 - / - mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0210439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0210439	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 Yamauchi K, Tanabu R, Monai N, Gonome T, Xie Y, Takahashi S, Ishiguro S, Nakazawa M	4. 巻 2018
2. 論文標題 The spectral domain optical coherence tomography findings associated with morphological and electrophysiological changes in a rat model of retinal degeneration, rhodopsin S334twr-4 rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 ID 5174986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/5174986	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 Monai N, Yamauchi K, Tanabu R, Gonome T, Ishiguro S, Nakazawa	4. 巻 13
2. 論文標題 Characterization of photoreceptor degeneration in the rhodopsin P23H transgenic rat line 2 using optical coherence tomography	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0193776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0193778	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 Monai N, Tanabu R, Gonome T, Yokoi K, Urushidate S, Morohashi S, Hirai H, Kurose A, Nakazawa M	4. 巻 9
2. 論文標題 Intraoperative adjunctive mitomycin C and cryotherapy for recurrent conjunctival papillary sebaceous carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Reports in Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 221-226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000487704	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7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Xie Yuting、中澤 満、山内宏大、毛内奈津姫、田名部玲子、江目孝幸
2. 発表標題 Optical coherence tomographic analysis of RDH5 knockout mice retina
3. 学会等名 第123回日本眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木幸彦、安達功武、毛内奈津姫、田名部玲子、鈴木 香、工藤孝志、中澤 満
2. 発表標題 硝子体手術用ポートを利用した眼内レンズ強膜内固定法
3. 学会等名 第123回日本眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中澤 満、安達功武、高橋 静、毛内奈津姫、山内宏大、田名部玲子、江目孝幸、Xie Yuting、石黒誠一、佐藤孝太
2. 発表標題 各種網膜変性モデルでのOCT所見、網膜電図および視細胞形態の関連性
3. 学会等名 第123回日本眼科学会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 江目孝幸、山内宏大、田名部玲子、毛内奈津姫、Xie Yuting、中澤 満
2. 発表標題 GLASTノックアウトマウスの網膜各層厚の経時変化
3. 学会等名 第123回日本眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田名部玲子、毛内奈津姫、山内宏大、江目孝幸、佐藤孝太、中澤 満
2. 発表標題 RPE65ノックアウトマウス視細胞変性過程のOCTを用いた定性的および定量的解析
3. 学会等名 第122回日本眼科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 毛内奈津姫、田名部玲子、山内宏大、高橋 静、安達功武、中澤 満
2. 発表標題 ロドプシンP23H変異ラットの網膜変性過程のOCT所見による解析
3. 学会等名 第121回日本眼科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山内宏大、田名部玲子、毛内奈津姫、高橋 静、安達功武、中澤 満
2. 発表標題 ロドプシンS334ter変異ラット網膜変性過程のOCT所見
3. 学会等名 第121回日本眼科学会総会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------