

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16982

研究課題名(和文) AdipoR1シグナリングの網膜視細胞保護・失明予防の効果のメカニズム

研究課題名(英文) The underlying mechanisms of protective role of AdipoR1 on retinal degeneration

研究代表者

長田 秀斗 (Osada, Hideto)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員

研究者番号：50748770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アディポネクチン1型受容体(Adiponectin receptor 1: AdipoR1)は全身で広く発現する内在性膜タンパク質で、脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンにより活性化され、骨格筋などではグルコースおよび脂質の代謝を制御している。近年マウス、ヒトにおいてAdipoR1変異による網膜色素変性が報告されており、網膜におけるAdipoR1の重要性が示唆されている。しかし、網膜におけるAdipoR1機能の詳細は依然として不明な点が多い。そこで本研究ではAdipoR1欠損による網膜変性の解析を通じて網膜におけるAdipoR1の機能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性症は国内の失明原因の第3位を占め、数多くの原因遺伝子が同定されている。本研究で解析を行ったAdipoR1は近年報告された原因遺伝子であり、発症機構の不明であった網膜色素変性症の一端を明らかにしたことは有意義である。

また、本研究で着目した網膜という神経組織はこれまでアディポネクチン研究に広く用いられてきた筋肉や脂肪組織とは異なるものである。そのため、いまだ不明な点の多い脳や他の神経系組織におけるアディポネクチンシグナル研究にも役立つような有意義なものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Adiponectin receptor 1 (AdipoR1) is expressed in various organs, including skeletal muscle, the liver, the spleen, and the retina. AdipoR1 is a well-known receptor of adiponectin, a major regulator of glucose and lipid homeostasis. Recent studies have reported that the mutation of AdipoR1 gene causes retinal degeneration, but its detailed mechanism remains unknown. Here we reported the detailed phenotype of retinal degeneration caused by AdipoR1 mutation. The mutation of AdipoR1 showed the retinal degeneration from very early stage of retinal development, and the severe retinal dysfunction. This indicates the important function of AdipoR1 in retinal development.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素変性症

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会において必要とされる健康長寿の一環として、高齢者の視機能維持は重要である。そのためには、網膜色素変性症や糖尿病網膜症といった、加齢とともに進行する失明疾患に対する新規治療法の開発は欠かせない。国内の失明原因の第3位を占める網膜色素変性症では多くの原因遺伝子が知られているが、近年ヒト、マウスにおいてアディポネクチン1型受容体(AdipoR1)変異による網膜色素変性症が報告された。また、国内の失明原因の第2位である糖尿病網膜症でも視細胞死が報告されているが、血中アディポネクチン低下はAdipoR1を介して糖尿病発症を促進することが知られており、網膜におけるアディポネクチン-AdipoR1シグナリングの重要性も示唆されている。アディポネクチン、およびAdipoR1の機能は全身の筋肉や肝臓等で広く解析がなされてはいるものの、網膜における機能に関しては不明な点が多かった。

2. 研究の目的

そこで本研究では網膜におけるAdipoR1の機能の詳細を明らかにすることで、網膜色素変性症をはじめとする網膜疾患の新たなメカニズムの解明と新規の治療法の開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

まず、野生型マウスの網膜におけるAdipoR1の発現パターンを発生期から成体まで詳細に解析した。次にAdipoR1ノックアウトマウスの網膜における表現系を、電気生理的解析によって明らかにした。その後ノックアウトマウスの網膜を形態学的に解析し、網膜色素変性症の進行メカニズムを解析した。さらに、網膜を回収し、機能性タンパクやAdipoR1シグナル伝達分子の遺伝子発現やタンパク質発現を指標としてAdipoR1シグナル欠損の影響を検討した。得られた変化は培養視細胞株や培養色素上皮細胞株等におけるAdipoR1のノックダウンによってさらなる検討を行った。

4. 研究成果

・研究の主な成果

はじめに野生型マウス網膜におけるAdipoR1の遺伝子発現を検討した。AdipoR1 mRNAの発現は生後網膜の発達にともなって上昇し、生後3週目でプラトーに達した(図1)。*in situ* hybridization法によりmRNAの発現部位を検討したところ、発現は網膜の視細胞および網膜色素上皮に特に限局していた。

次にAdipoR1ノックアウトマウスを用いて網膜における表現型を詳細に検討した。野生型マウス網膜では生後14日頃までに視細胞外節の形成が完了するが、電子顕微鏡観察によりAdipoR1ノックアウトマウスの網膜では生後14日ですでに視細胞外節の顕著な変性を呈していることが確認された。その後視細胞死をともなう網膜の菲薄化が生じた(図2)。このとき網膜電図によって視機能を測定したところ、視機能低下が観察された。(図3)。特に変性初期においては主に桿体視細胞に由来する機能低下が顕著であり、錐体視細胞は桿体視細胞変性の後に生じていることが示唆された。免疫染色により、網膜に存在する各種の細胞の形態的な変化を検討したが、視細胞以外の神経網膜の細胞における顕著な変化は認めなかった。これらのことから網膜におけるAdipoR1の機能が正常網膜において桿体視細胞外節の形成を通じた視機能の発揮に重要であることが示された。

AdipoR1ノックアウトマウスの網膜において既知のAdipoR1シグナリングの下流因子であるリン酸化AMPK、Akt、MAPK、Sirt1等の各種タンパク質の網膜における発現を検討したが、変性初期の網膜における顕著な変化は認められなかった。

一方で、AdipoR1ノックアウトマウス網膜では早い段階から酸化ストレスマーカーや炎症マーカーの遺伝子発現の上昇が確認され、視細胞変性が網膜の発達初期から生じてい

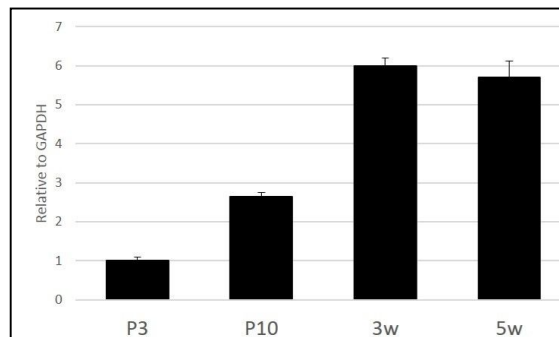


図1 マウス網膜におけるadipor1 mRNAの発現 adipor1は生後3日目には網膜における発現が確認され、3週目まで発現が上昇していく

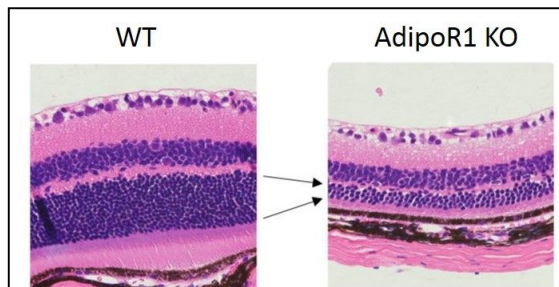


図2 AdipoR1ノックアウトマウス網膜では網膜が菲薄化 視細胞の核が存在する外顆粒層のみが顕著に薄くなった(矢印)

ることが示唆された。また、これらの遺伝子発現の変化をさらに検討するためにヒトの網膜色素上皮細胞株である ARPE19 やマウス視細胞株である 661W における AdipoR1 遺伝子のノックダウンを行い、各種に遺伝子発現変化を検討したところ、これらの培養細胞株においても AdipoR1 の機能阻害による炎症マーカーや、酸化ストレスマーカーの遺伝子発現上昇が認められた。これらのことから、AdipoR1 は網膜発達初期に特に桿体視細胞の形成に寄与し、機能欠損が生じた場合には網膜に炎症や酸化ストレスが生じ、その結果視細胞死が誘発され、網膜色素変性症を呈するメカニズムの存在が示唆された。

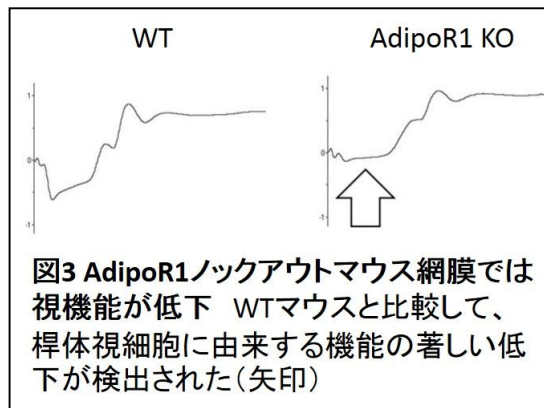


図3 AdipoR1ノックアウトマウス網膜では視機能が低下 WTマウスと比較して、桿体視細胞に由来する機能の著しい低下が検出された(矢印)

・得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究で得られた結果から推測される AdipoR1 の機能は、既知の AdipoR1 シグナリングとは異なるものであり、広く知られたアディポサイトカインであるアディポネクチンの新規の機能の存在を示唆するものである。網膜という神経組織における機能の解析は脳や他の神経系組織におけるアディポネクチンシグナル研究にも役立つような有意義なものであると考えられる。また、網膜色素変性の原因遺伝子として比較的最近報告された AdipoR1 の機能欠損による網膜色素変性症のメカニズムを解析したことは臨床的にも有用な結果となると考えられる。

・今後の展望

本研究は特に網膜における AdipoR1 の機能に着目し解析を行った。本研究から得られた知見により、網膜特異的な AdipoR1 の機能の存在が示唆された。肥満などによる血中アディポネクチンの低下などを介して全身性の代謝の影響が網膜に影響を与える可能性も考えられるため、全身の代謝動態と視機能との関連を検討する際のターゲットとして AdipoR1 が今後重要になっていくと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Ban N, Ozawa Y, Osada H, Jonathan B. Lin, Toda E, Watanabe M, Yuki K, Kubota S, Rajendra S. Apte, Tsubota K. Neuroprotective role of retinal SIRT3 against acute photo-stress. NPJ Aging Mech Dis. 査読有. 2017 Dec 4;3:19. doi: 10.1038/s41514-017-0017-8.
2. Osada H, Okamoto T, Kawashima H, Toda E, Miyake S, Nagai N, Kobayashi S, Tsubota K, Ozawa Y. Neuroprotective effect of bilberry extract in a murine model of photo-stressed retina. PLoS One. 査読有. 2017 Jun 1;12(6):e0178627. doi: 10.1371/journal.pone.0178627.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Kawashima H, Osada H, Toda E, Okamoto T, Kamoshita M, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y. Neuroprotective role of activated AMPK against light-induced photoreceptor cell death. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017
2. 長田秀斗, 岡本知大, 川島弘彦, 戸田枝里子, 小林沙織, 坪田一男, 小沢洋子 光障害に対するビルベリーエキスの網膜保護効果 第 17 回日本抗加齢医学会総会 2017 年
3. 川島弘彦, 岡本知大, 戸田枝里子, 長田秀斗, 鴨下衛, 永井紀博, 篠田肇, 坪田一男, 小沢洋子 光照射直後の網膜における酸素消費速度(OCR)の低下 第 56 回日本網膜硝子体学会 2017 年。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：小沢 洋子

ローマ字氏名：OZAWA, Yoko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。