

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16936

研究課題名(和文) PRPH2変異により発症するStargardt病の発症機序の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Disease modeling and development of therapies for Stargardt disease with PRPH2 mutations

研究代表者

新井 英介 (Arai, Eisuke)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：60568210

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)：Prph2Rd2/wt(ヘテロ)マウス、Prph2Rd2/Rd2(ホモ)マウス、Abac4-/-マウス、WTマウスの生後3週、4ヶ月、8ヶ月を比較した。ヘテロはホモに比べ、外顆粒層の菲薄化の程度が緩徐で網膜変性の進行が遅い事がわかった。Abac4-/-マウスと同様にヘテロマウスにおいても網膜変性の原因となるA2Eやリポフスチンの蓄積を確認出来た。ヘテロマウスにおいてABCA4とRDH12の発現が低下しており、それがA2Eやリポフスチンの蓄積の原因となっている可能性が、また、RDH12の発現低下の原因としては小胞体ストレス応答が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Stargardt病は、構造タンパク質であるPRPH2の変異によっても発症する事がわかっているが発症機序は不明である。モデルマウスによってPRPH2変異によって発症するStargardt病もABCA4の変異のStargardt病と同様にA2Eやリポフスチンの蓄積していた。また、ABCA4とRDH12の機能異常がA2Eやリポフスチンの蓄積させる原因となっており、RDH12の機能異常には小胞体ストレス応答が関与している可能性が示唆された。本研究によってPRPH2変異によるStargardt病の病態解明と治療法の開発につながり、学術的かつ社会的に意義が高いものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We compared Prph2Rd2/wt mice, Prph2Rd2/Rd2 mice, Abac4-/- mice and WT mice at 3 weeks, 4 months and 8 months of age.

ONL was significantly thinner in Prph2Rd2/wt and Prph2Rd2/Rd2 mice than WT, suggesting that Prph2Rd2/wt and Prph2Rd2/Rd2 mice display retinal degeneration during aging. Moreover, Prph2Rd2/wt mice showed moderate degeneration compared to Prph2Rd2/Rd2 mice. We found accumulations of A2E and Lipofuscin which cause retinal degeneration in Prph2Rd2/wt mice as well as Abac4-/- mice.

Expressions of Abca4 and Rdh12 in Prph2Rd2/wt mice were significantly reduced compared to WT. These results provide evidence that reduced Abca4 and Rdh12 expressions might contribute to accumulations of A2E and Lipofuscin in Prph2Rd2/wt mice. Expressions of ER stress markers significantly increased in Prph2Rd2/wt mice, suggesting that reduced RDH12 expressions in Prph2Rd2/wt mice might correlate with unfolded protein response.

研究分野：網膜変性疾患

キーワード：PRPH2 A2E Stargardt disease ABCA4 RDH12 ER stress

1. 研究開始当初の背景

視覚を維持するためのビタミンAの一種である11-*cis*-retinal再生のための視細胞外節と網膜色素上皮内で行われる一連の酵素反応はレチノイドサイクルと呼ばれる。*ABCA4*はレチノイドサイクル内で、網膜内でPEと結合し、N-retinylidene-PEとなったall-*trans*-retinalを視細胞内側膜から外側膜へと運ぶ輸送体として働き、視細胞外節円板膜辺縁部に局在する。*ABCA4*が異常をきたし輸送機能が失活すると、網膜色素上皮に毒性を持つA2Eが蓄積し網膜変性を引き起こす。一方、*PRPH2*は視細胞外節円板膜辺縁部に存在し、*ABCA4*と局在を同じくする構造タンパク質で、*PRPH2*変異によるSTGD1類似多発性パターンジストロフィ / 黄色班眼底は、*ABCA4*変異によるStargardt病と類似の眼底所見を示す。*ABCA4*の機能や、その変異によるStargardt病の発症機序は上記の通り知られている。このとき、局在は同じであるが働きの全く異なる*PRPH2*による変異が、「なぜ*ABCA4*変異による疾患と類似の表現系を示すのか。」という疑問が生じる。しかしながら、*PRPH2*は構造タンパク質であるが、機能に関しては不明で*PRPH2*変異によるStargardt病の発症機序は解明されていないため、この疑問の解消は困難であった。この課題に対して*PRPH2*変異によって発症するStargardt病の分子遺伝生物学的特徴を明らかにすることを目的とし、実験動物モデルマウスを利用した実験系(in vivo)と、ヒト幹細胞由来の3次元立体構造を持つ眼杯を利用した疾患モデルの実験系(in vitro)にて病態を解明する事で、その発症機序や治療の開発につながり、この疑問を解消できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では前述の考えのもと、実験動物モデルマウスを利用した実験系(in vivo)と、ヒト幹細胞由来の3次元立体構造を持つ眼杯を利用した疾患モデルの実験系(in vitro)により未だ解明されていない*PRPH2*変異によって発症するStargardt病の発症機序を明らかにし、それを防ぐ事によって病態に即した治療法を開発することを目的とした。これが達成されることにより、*Prph2*^{Rd2/wt}マウス、*Prph2*^{Rd2/Rd2}マウスにStargardt病の病因となるA2Eとリポフスチンが蓄積している事を確認し、その蓄積の原因を明らかにする。これによって今まで知られていなかった*PRPH2*が眼疾患のStargardt病にどのように関与しているのかがわかり、病態に即した治療法を開発する事ができ、さらにそれは類縁疾患への治療につながる。本研究によって*PRPH2*の基礎研究から臨床応用までの一貫した研究の基盤を確立でき、それはStargardt病によって日常生活が制限され、苦しんでいる方々を救い、多大な社会貢献となる。

3. 研究の方法

(1)*Prph2*^{Rd2/wt}マウス、*Prph2*^{Rd2/Rd2}マウス、*Abca4*^{-/-}マウス、WTマウスを解析に利用した。*PRPH2*の発現が低下しているの確認するため、生後3週のマウスを用いて抗*PRPH2*抗体を用いたWestern blotと免疫染色にて調べた。Western blotの結果は画像処理ソフトのImage Jで定量化した。また、網膜変性の経時的変化を確認するため、OCTにて外顆粒層の厚みを生後3週、4ヶ月、8ヶ月で計測した。さらに視細胞層の詳細な観察のため、変性が十分に進んでいる8か月のマウスを用いて、ロドプシン抗体である1D4抗体と錐体細胞に特異的に結合するPNA抗体を用いた免疫染色にて組織学的に評価した。

(2)*ABCA4*が異常をきたし輸送機能が失活すると、網膜色素上皮に毒性を持つA2E、リポフスチンが蓄積し網膜変性を引き起こす。このStargardt病を引き起こす要因であるA2Eやリポフスチンの蓄積があるかを調べるため、RPEに蓄積するA2Eやリポフスチンから発せられる自発蛍光をSLQ(共焦点型走査型レーザー検眼鏡)と蛍光顕微鏡を用いて測定した。自発蛍光の強度はImageJで定量化した。また、高速液体クロマトグラフィー(HPLC法)にてA2Eを生後4か月のマウスで測定した。

(3)レチノイドサイクル内でAll-*trans*-retinalは*ABCA4*によって視細胞内側から外側へ輸送される。そして、all-*trans*-dehydrogenaseである外節に局在する*RDH8*と、内節に局在する*RDH12*によってAll-*trans*-retinolに還元される。*ABCA4*の他に*RDH8*と*12*の異常でもA2Eが蓄積する事が知られており、*Prph2*^{Rd2/wt}マウスにおけるA2Eの蓄積の原因を調べるため、Western blotによって生後4ヶ月の*Prph2*^{Rd2/wt}マウスとWTにおける*ABCA4*、*RDH12*と*8*の発現を調べた。結果はImage Jで定量化した。

(4)*RDH12*の発現低下の原因を調べるため、生後4ヶ月の*Prph2*^{Rd2/wt}マウスとWTマウスにおいて、小胞体ストレスマーカーの*Bip*、*Atf4*、*Chop*の発現をqRT-PCRを用いて調べた。

(5)視細胞の成熟、網膜変性に有効とされる物質を用いて、視細胞の豊富な正常ヒトES細胞由来の3次元立体構造を持つ眼杯を作製する。

4. 研究成果

(1)Western blotと免疫染色とともに、*Prph2*^{Rd2/Rd2}マウスでは*PRPH2*の発現が消失しているのに対し、*Prph2*^{Rd2/wt}マウスでは半分程度に減弱している事がわかり、*PRPH2*の発現が低下している事を確認できた。外顆粒層の厚みは、生後3週では各マウスで同程度であったのに対し、4ヶ月、8ヶ月と加齢とともに菲薄化が進んでいく様子が観察された。また*Prph2*^{Rd2/wt}マウスは*Prph2*^{Rd2/Rd2}マウスに

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

比べ、菲薄化の程度が緩徐であった。視細胞層は $Prph2^{Rd2/Rd2}$ マウスにおいてはほぼ消失しているのに対して、 $Prph2^{Rd2/wt}$ マウスは8か月の時点においてもまだ視細胞外節が維持されている様子が観察された。これらの結果から $Prph2^{Rd2/wt}$ マウスは加齢と共に網膜が菲薄化するが、視細胞の形態は保ちながら、PRPH2の発現が低下しているという事がわかった。

Stargardt病の病因となるA2E、リポフスチンの蓄積にはレチノイドサイクルが回っている必要があり、それにはRPEと視細胞外節が存在しなければいけない。 $Prph2^{Rd2/Rd2}$ マウスは変性が強く、視細胞外節が存在せず、レチノイドサイクルが回っていないのに対して、 $Prph2^{Rd2/wt}$ マウスは視細胞外節が存在していて、レチノイドサイクルが回り、A2E、リポフスチンが蓄積する可能性があるという事が示された。

(2)SLOでは、 $Abca4^{-/-}$ マウスは4ヶ月の時点ですでに過蛍光であったのに対し、 $Prph2^{Rd2/wt}$ マウスはそれから遅れて8ヶ月で過蛍光を示した。また、蛍光顕微鏡でも生後8か月後で、 $Prph2^{Rd2/wt}$ マウスと $Abca4^{-/-}$ マウスでは $Prph2^{Rd2/Rd2}$ マウス、WTマウスよりも有意に蛍光強度が強い事がわかった。HPLC法では、 $Abca4^{-/-}$ マウスはA2Eが最も蓄積しており、 $Prph2^{Rd2/wt}$ マウスにおいてもWTマウスと比較すると6倍程度のA2Eが蓄積している事がわかった。これらの結果から、 $Prph2^{Rd2/wt}$ マウスは $Abca4^{-/-}$ マウスと同様にA2E、リポフスチンが蓄積するという事が示された。また、SLOの結果からは $Prph2^{Rd2/wt}$ マウスが $Abca4^{-/-}$ マウスより遅れてA2E、リポフスチンが蓄積するという事が示され、ABCA4-STGDよりもlate on setであるというPRPH2-STGDの臨床的特徴に一致しており、 $Prph2^{Rd2/wt}$ マウスがPRPH2-STGD疾患モデルとなり得る可能性が示唆された。

(3)RDH8の発現は $Prph2^{Rd2/wt}$ マウスとWTマウスで同等だったが、ABCA4とRDH12の発現は $Prph2^{Rd2/wt}$ マウスはWTマウスに比べ有意に低下していた。これによって、 $Prph2^{Rd2/wt}$ マウスにおいてABCA4とRDH12の発現の低下がA2Eを蓄積させている可能性が示唆された。

(4)PRPH2とABCA4は同じ視細胞外節円盤膜縁部に局在しているが、RDH12は視細胞内節に局在している。構造タンパク質であるPRPH2の変性が視細胞外節円盤膜縁部の構造を不安定にさせ、同じ局在のABCA4の発現を低下させるのは合理的である。しかし、 $Prph2^{Rd2/wt}$ マウスは生後8ヶ月でも視細胞内節が保たれていて、外節に局在するPRPH2が内節に局在するRDH12にどのように発現を低下させているのかを検討した。WTのPRPH2は同一膜状に並んで形成されるPRPH2の四量体が核となり、対側膜上に存在する四量体同士が、各々の膜上の四量体に含まれるPRPH2のD2ループにあるシステイン残基を介してジスルフィド結合をすることで重合体を形成している。PRPH2変異のC214Sなどは二量体を形成するが、四量体を形成する事ができず、構造的に不安定で、高次構造の異常なタンパク質である折りたたみ不全タンパク質となり、視細胞内節にある小胞体内に蓄積し、小胞体ストレスを引き起こすと言われている。そこで、PRPH2変異が小胞体ストレスを通して、視細胞内節に影響を与えている可能性を考えた。Bip, Atf4, Chopの3つ全てのマーカーの発現が、 $Prph2^{Rd2/wt}$ マウスにおいて有意に上昇している事が分かった。これにより、変異PRPH2が視細胞内節の小胞体内に蓄積し小胞体ストレスを発生させ、小胞体ストレス応答を引き起こしRDH12の発現を低下させている可能性が示唆された。

(5)ヒトES細胞由来の網膜組織を無血清凝集浮遊培養法とBMP法にて作製した。さらに視細胞の豊富な網膜組織へと分化させることを目指して、視細胞の成熟や網膜変性に有効とされたDHAを添加した。その結果、視細胞の豊富な正常ヒトES細胞由来の網膜組織の構築でき、DHAは視細胞への分化促進作用がある事が示された。

<引用文献>

Maeda, A., Maeda, T., Golczak, M. and Palczewski, K. Retinopathy in mice induced by disrupted all-trans-retinal clearance. *J. Biol. Chem.* 2008;283:26684-26693.

Zhu, Q., Sun, W., Okano, K., Chen, Y., Zhang, N., Maeda, T. and Palczewski, K. Sponge transgenic mouse model reveals important roles for the microRNA-183 (miR-183)/96/182 cluster in postmitotic photoreceptors of the retina. *J. Biol. Chem.* 2011;286: 31749-31760.

Zhang N, Tsybovsky Y, Kolesnikov AV, Rozanowska M, Swider M, Schwartz SB, Stone EM, Palczewska G, Maeda A, Kefalov VJ, Jacobson SG, Cideciyan AV, Palczewski K. Protein misfolding and the pathogenesis of ABCA4-associated retinal degenerations. *Hum Mol Genet.* 2015;24:3220-37.

Maeda, A., Maeda, T., Imanishi, Y., Kuksa, V., Alekseev, A., Bronson, J. D., Zhang, H., Zhu, L., Sun, W., Saperstein, D. A., Rieke, F., Baehr, W., and Palczewski, K. Role of photoreceptor-specific retinol dehydrogenase in the retinoid cycle *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 2005;280:18822-18832.

Sahu B, Sun W, Perusek L, Parmar V, Le YZ, Griswold MD, Palczewski K, Maeda A. Conditional Ablation of Retinol Dehydrogenase 10 in the Retinal Pigmented Epithelium Causes Delayed Dark Adaptation in Mice. *J Biol Chem.* 2015;290:27239-47.

Perusek L, Sahu B, Parmar T, Maeno H, Arai E, Le YZ, Subauste CS, Chen Y, Palczewski K, Maeda A. A2E Accumulation and the Maintenance of the Visual Cycle are Independent of Atg7-mediated Autophagy in the Retinal Pigmented Epithelium. *J Biol Chem.* 2015;pii: jbc.M115.682310.

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

Wataya, T., Ando, S., Muguruma, K., Ikeda, H., Watanabe, K., Eiraku, M., Kawada, M., Takahashi, J., Hashimoto, N., and Sasai, Y. Minimization of exogenous signals in ES cell culture induces rostral hypothalamic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105:11796-11801.

Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., and Sasai, Y. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell*. 2008;3:519-532.

Watanabe, K. et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2007;25:681-686.

Wataya, T. et al. Minimization of exogenous signals in ES cell culture induces rostral hypothalamic differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008;105:11796-11801.

Eisuke Arai, Vipul M Parmar, Bhubanananda Sahu, Lindsay Perusek, Tanu Parmar, Akiko Maeda. Docosahexaenoic Acid Promotes Differentiation of Photoreceptor Cells in Three-Dimensional Neural Retinas. *Neurosci Res*. 2017 Oct;123:1-7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 新井 英介, Bhubanananda Sahu, Lindsay Perusek, Vipul M Parmar, 村上晶, 前田亜希子
2. 発表標題 ES細胞由来の立体網膜組織作製におけるDHAによる視細胞への分化促進
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eisuke Arai, Bhubanananda Sahu, Lindsay Perusek, Vipul M Parmar, Akira Murakami, Akiko Maeda
2. 発表標題 DHA promotes differentiation of photoreceptor cells in 3D neural retinas
3. 学会等名 ARVO Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----