

平成 22 年 6 月 24 日現在

研究種目：若手 (B)  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20791291  
研究課題名 (和文) 黄斑変性症発症機構における HtrA1 の作用  
研究課題名 (英文) Overexpression of HtrA1 leads to retinal abnormality in mice  
研究代表者  
赤堀 正和 (AKAHORI MASAKAZU)  
独立行政法人国立病院機構 (東京医療センター臨床研究センター)・分子細胞生物学研究部・流動研究員  
研究者番号：30343544

研究成果の概要 (和文) : 我々を含め、多くの研究グループから日本人に多い滲出型黄斑変性症と強く関連することが報告されている HtrA1 を高発現するトランスジェニックマウスの作製を試みた。その結果、9 系統のトランスジェニックマウスが得られた。Real time-PCR 法によるコピー数測定、ウェスタンブロットティングにより選別した 3 系統のトランスジェニックマウスについて眼底観察および、眼球の切片を作製し HE 染色を行ったところ、眼底撮影によりドルーゼン様の沈着が観察され、HE 染色による形態観察により網膜に変性部位が認められた。これらの研究成果から日本人に多い滲出型 AMD と強く関連する HtrA1 は、滲出型 AMD の発症に関与していることが強く考えられ、HtrA1 を高発現させたトランスジェニックマウスは滲出型 AMD の発症機構の解明に有用なモデル動物として利用できることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Age-related macular degeneration (AMD) is a common cause of blindness in the elderly. Genetic association in the 10q26 (ARMS2/HTRA1) region has been established in many ethnic groups for dry-type AMD, typical wet-type AMD. Here, we describe the phenotypic characteristics of transgenic mice overexpressing HtrA1. The copy numbers for cDNA construct were approximately 8 to 14 per mouse as determined by TaqMan real-time PCR assay. Fundus observation by gonio lens and slit lamp showed drusen-like deposition on transgenic mice retina. Histopathological examination by HE stain of the retina showed that the animals had choroidal neovascularization. Our results indicate that HtrA1 transgenic mice may be a good model system in which to study the mechanism of AMD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：遺伝子、動物

1. 研究開始当初の背景

(1) 医学的背景

黄斑部が加齢に伴い様々な異常をきたした状態を黄斑変性(AMD)と呼ぶ。AMDには脈絡膜から新生血管を伴い進行の早い滲出型と色素細胞層とブルッフ膜の間に黄白色のドルーゼンと呼ばれる物質の沈着がおり色素上皮細胞の萎縮が起こる萎縮型とに大別される。米国では加齢黄斑変性症が65歳以上の失明原因の1位となっており、我が国においても、急速な高齢化や生活様式の欧米化などのために近年増加傾向にある。九州大学石橋教授らによる1998年に久山町の50歳以上の住民を対象に行われた調査では少なくとも1眼に滲出型を有する人は0.67%、萎縮型を有する人は0.2%であり、男性に多いと報告されている。今後、我が国において急速に進む高齢化社会の問題点となることが予測されており、進行が早く失明にいたる可能性の強い滲出型AMDの早期診断法の開発や根本的な治療法や治療薬の開発は急務である。

## (2) 学術的背景

### ①遺伝学的解析

複数のグループが全ゲノムを対象としたマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析を行った結果、AMDと関連する領域が明らかになっている(Abecasis et al. 2004, Iyengar et al. 2004, Majewski et al. 2003, Schick et al. 2003, Seddon et al. 2003, Weeks et al. 2004)。一方、最近、一塩基多型(SNPs)を用いた連鎖解析により2005年に補体H因子遺伝子(Complement factor H, CFH)の402番目のアミノ酸がチロシンからヒスチジンに置換される変異(rs1061170)が米国白人患者において強く関連していることが明らかとなり(Klein et al. 2005)、2006年に中国人患者および白人患者におけるリスク変異としてセリンプロテアーゼの一つであるHtrA1の上流に位置するSNP変異(rs11200638, rs10490924)が報告された(Yang et al. 2006, Dewan et al. 2006)。

### ②CFH, HtrA1について

CFHは、マイクロサテライトマーカーを用いた家系の研究で報告された領域(1q31-32)に位置しているが、我々はCFHのSNP(rs1061170)と滲出型日本人AMD患者に関連がないことを報告した(1; Okamoto et al. 2006)。

HtrA1はプロモーター領域のSNP変異(rs11200638)により発現が増すことが示唆されており、AMD患者のドルーゼンに含まれていることも報告されている(Yang et al. 2006, Dewan et al. 2006)。また最近我々は、これらのSNPsが滲出型の日本人AMDと強く関連していることを明らかにした(2; Yoshida et al. 2007)。しかしながら、HtrA1の上流のSNP(rs10490924)は仮想タンパク

(LOC387715)のアミノ酸置換を起こすSNPでもあること、SNP変異によるプロモーター活性への影響について否定的な報告もされている(Kanda et al. 2007)ことなどから、LOC387715とHtrA1のどちらがAMDのリスク因子なのか、またそのメカニズムなどの結論は未だ出ていない。

## 2. 研究の目的

これまでに我々は、AMDのリスク因子として報告された2つの因子(CFH, HtrA1)と日本人AMD患者との関連について解析し、CFHは関連が見られないが、HtrA1上流のSNPsは日本人AMD患者と強く関連することを相次いで報告してきた(1,2)。また、YangらはHtrA1上流のSNP変異によりHtrA1プロモーター部位の転写活性が増強されることを示唆している。本申請研究では、これらの背景および研究成果から、HtrA1を高発現させれば黄斑変性症と類似した症状を示す可能性が強いと考え、HtrA1高発現トランスジェニックマウスの作製を試みる。このトランスジェニックマウスのドルーゼンや新生血管の有無など形態学的・病理学的解析および視機能の検討を行うことにより動物個体でのHtrA1高発現が網膜組織におよぼす影響について検討する。

## 3. 研究の方法

HtrA1の動物個体内での生理活性および網膜色素上皮細胞への生理活性を明らかとするために、HAエピトープを付加したmHtrA1遺伝子を作成し、この高発現トランスジェニックマウスを作成する。PCR法により陽性個体を選別し、各陽性系統の繁殖をおこなう間、網膜色素上皮細胞におけるHtrA1の生理活性について解析する。次に、高発現トランスジェニックマウスの解析をおこない、AMDの発症機構におけるHtrA1の役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

まずマウス脳からTotal RNAを精製し、RT-PCR法によりマウスHtrA1遺伝子をクローニングした。さらにこの遺伝子にHAタグを有するベクタープラスミドにサブクローニングし、HtrA1遺伝子のC末にHAタグを付加した。このHA-HtrA1遺伝子を直鎖状にした後にマウス受精卵に注入しトランスジェニックマウスの作成を試みた。その結果、9系統のHA-HtrA1遺伝子を持つトランスジェニックマウスを得ることが出来た。

Tgマウスの導入遺伝子のコピー数を測定および遺伝子発現をウェスタンブロッティングでおこない3系統のTgマウスを選別した。これらのTgマウスについて眼底観察および、眼球の切片を作製しHE染色を行ったところ、眼底撮影によりドルーゼン様の沈着が観察

され、HE染色による形態観察により網膜に変性部位が認められた。

これらの研究成果から日本人に多い滲出型AMDと強く関連するHtrA1は、滲出型AMDの発症に関与していることが強く考えられ、HtrA1を高発現させたトランスジェニックマウスは滲出型AMDの発症機構の解明に有用なモデル動物として利用できることが示唆された。

#### 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1件)

Genetic analysis of typical wet-type age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Japanese population.

Goto A, Akahori M, Okamoto H, Minami M, Terauchi N, Haruhata Y, Obazawa M, Noda T, Honda M, Mizota A, Tanaka M, Hayashi T, Tanito M, Ogata N, Iwata T.

J Ocul Biol Dis Infor. 2009 Dec 22;2(4):164-175.

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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◇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

[http://www.kankakuki.go.jp/lab\\_e.html](http://www.kankakuki.go.jp/lab_e.html)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者 ( )

研究者番号:

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: