

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09801

研究課題名（和文）視細胞サブタイプ依存的な網膜色素上皮細胞の発達と機能低下機構の解析

研究課題名（英文）The maintenance and dysfunction of RPE cells depending on photoreceptor subtypes.

研究代表者

大西 暁士 (Onishi, Akishi)

立命館大学・総合科学技術研究機構・教授

研究者番号：70569102

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：加齢黄斑変性は加齢に伴い発症する黄斑部の萎縮または変性で、網膜色素上皮の老化・機能低下より視細胞が障害される疾患である。黄斑は赤・緑錐体視細胞のみが密集した構造であることから、本来黄斑構造を持たないマウスに遺伝子改変技術より錐体視細胞優位の領域を持つ個体を導出し解析した結果、杆体優位な領域に比して形態の変容および生理マーカーの発現の低下を認めた。加えて、錐体オプシンを杆体視細胞に発現させたノックインマウスでも網膜色素上皮の縮退を示した事より、加齢黄斑変性に至るストレス要因として錐体視細胞および錐体オプシンの生理活性が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで加齢黄斑変性の進行リスク要因としてストレス因子（喫煙・紫外線・食生活等）や遺伝的要因の関連性が研究されているが、本結果はストレス要因の一つとして隣接する赤緑錐体視細胞の生理代謝特性や発現する錐体オプシンの分子特性が関与することを示唆している。即ち本研究結果は、近年の光刺激に溢れて黄斑（錐体）を酷使する社会環境が加齢黄斑変性の発症リスクとなり得る事を示した点に意義があり、近年の光環境をストレス因子に含めて研究を発展させれば加齢黄斑変性の予防・処方に貢献しQOL向上の一助となる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：Age-related macular degeneration (AMD) is a macular atrophy or degeneration in which photoreceptor cells are damaged due to aging following functional deterioration of the retinal pigment epithelium (RPE). Here, we assume that the physiological and metabolic characteristics of red/green-sensitive cone photoreceptor cells on the macula are one of the stresses that cause AMD. To test this hypothesis, we generated transgenic mice with a cone-rich region at the central retinas. We found that RPE layers exhibit disease characteristics observed in AMD patients. In addition, knock-in mice expressing cone opsin in rod photoreceptor cells partially phenocopied disease characteristics, suggesting that the physiological activity of cone photoreceptor cells and cone opsin is involved as a stress factor leading to 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 加齢黄斑変性 網膜色素変性 視細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 外界からの視覚情報の受容する眼球後眼部組織は、光受容細胞である視細胞層を含む神経網膜と、視細胞層に隣接し視細胞に栄養供給・老廃物除去を行う色素上皮細胞 (RPE) RPE の外側の脈絡膜血管板に構成される。このうち、黄斑は網膜中心部分にある赤色もしくは緑色に波長感受性を持つ錐体視細胞が密集する領域であり、加齢黄斑変性 (Age-related Macular Degeneration; AMD) は、神経網膜視細胞に隣接する網膜色素上皮 (Retinal Pigment Epithelium; RPE) の老化・機能低下により視細胞が障害される中途失明疾患である。

(2) 加齢黄斑変性の進行リスクとして、これまでストレス因子 (喫煙・紫外線・食生活等)・遺伝的要因等の進行リスクとの関連性に着目した研究が進められているが、我々は実験動物において視細胞サブタイプである杆体および錐体視細胞の割合が異なる領域で、RPE の発達・変性過程に差異を認める予備的所見を得ていた。霊長類では、赤緑錐体視細胞が優位である黄斑部と、杆体視細胞優位な周辺部では光依存的な応答・代謝様式が異なるため、加齢黄斑変性を惹起する原因として錐体視細胞の光依存的な生理特性が関与すると考え、本研究の実施に至った。

2. 研究の目的

(1) 視細胞には、暗所視を担う杆体と、昼間視 (色覚) を担う赤・緑・青色に波長感受性をもつ 3 種類の錐体サブタイプがある。これらの杆体・錐体視細胞サブタイプに隣接する RPE の発達 (成熟) もしくは老化 (機能低下・変性) 過程の経時変化を比較して RPE へのストレスを検証する。

(2) 上記の発達・老化フェーズに影響を与える視細胞・RPE の相互作用・分子機構を明らかにする。杆体・錐体視細胞サブタイプの機能特性は、視細胞外節に発現する光受容蛋白質 (オプシン) の分子特性に依存する事から、特にオプシンの分子特性の RPE への影響について検証する。

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) 錐体視細胞優位な黄斑様構造を持つ遺伝子改変マウスの作出
杆体視細胞特異的な転写因子 Nr1 の Flox マウス (Montana CL et. al. PNAS, 2013) と、網膜中心部に一過性に Cre リコンビナーゼを発現するマウス (Cyp26c1-Cre, 申請者新規作出) との掛け合わせより、眼球内に錐体のみ局在する領域と杆体優位な領域を導出する。また、CAG-Cre マウスとの掛け合わせにより、Flox-out (Nr1 遺伝子を欠損) したマウスを作製する。前者は網膜中心部分の杆体視細胞が錐体視細胞に転換されるが、後者は全ての杆体視細胞が錐体視細胞に転換される。また、視細胞に発現するオプシンの分子生理特性の影響を検証するため、杆体視細胞でマウス緑錐体オプシンを発現するマウス (Sakurai K et. al. J Gen Physiol., 2007) の供与を受けた。

(2) 黄斑様構造を持つマウス RPE の成熟・老化過程の解析

上記のマウスについて、形態学的解析・免疫組織化学的解析による比較検証を進めた。成熟過程は新生児期~1ヶ月齢にて、老化・機能低下過程は7ヶ月齢から老齢 (2年齢) に至るまで定期的にサンプリングを行う。

眼球は RPE/脈絡膜ホールマウント標本と薄切片を作製する。RPE の形態比較を ZO-1 抗体で、RPE 機能維持を RPE65 で、貪食能をオプシン抗体により検証し、必要に応じて網膜電図解析 (ERG) と視運動性反応試験 (Optokinetic tracking; OKT) による視機能評価を行った。

4. 研究成果

(1) Visual streak マウスの網膜中心部分視細胞は青錐体・緑錐体が占める

Cyp26c1 遺伝子はレチノイン酸を代謝 (分解) する機能を持ち、マウス網膜では胎生の視神経部分よりやや上側にストライプ状に発現する (Visual streak)。この遺伝子の最後のエクソンに P2A 自己消化ペプチドと Cre リコンビナーゼ遺伝子をノックインした遺伝子改変マウスを作製した (Cyp26c1-Cre) Cre リコンビナーゼの組換えを確認するため、R26R-EGFP マウスを掛け合わせたところ、Cyp26c1 が発現した領域に EGFP の発現を認めた (図 1A)。この Cre 遺伝子座を持つ Nr1 flox/flox マウスを導出し、杆体オプシンであるロドプシンおよび緑・青錐体オプシン抗体でホールマウント染色すると、Visual streak 部分に青オプシンおよび緑オプシン抗体の強いシグナルを認め、ロドプシン抗体では染色されなかった (図 1B, C)。即ち、Visual streak 部分はマウスは本来は杆体優位であるが、Nr1 をノックアウトする事により錐体視細胞優位な領域へ転換できた。

次に、Visual streak の RPE へのストレスを評価するため、RPE65 および ZO-1 で生理機能および細胞形態について WT と比較した。図 2 はホルマウント染色像であり、上側が Dorsal (背側) 下側が Ventral (腹側) となる。Visual streak を持つマウスでは、錐体視細胞優位な領域である視神経よりやや上側に S opsin の染色像を認め、これは錐体視細胞の外節部分を貪食している事を意味するが、この部分の RPE65 の発現量が周辺の杆体視細胞優位な領域に比して弱い傾向があった。この結果は Visual streak 部分の RPE が杆体に比べてストレスが高い事が示唆された。なお、ZO-1 の染色像に有意な違いを認めず、PRE 形態は保持されている事が分かった。

図 1

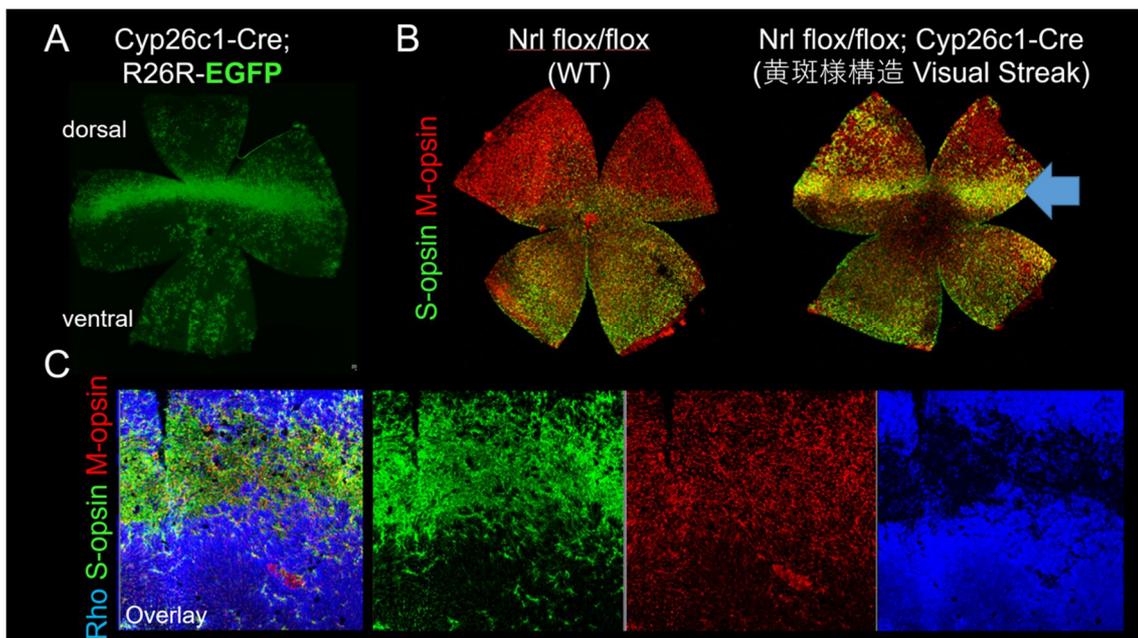
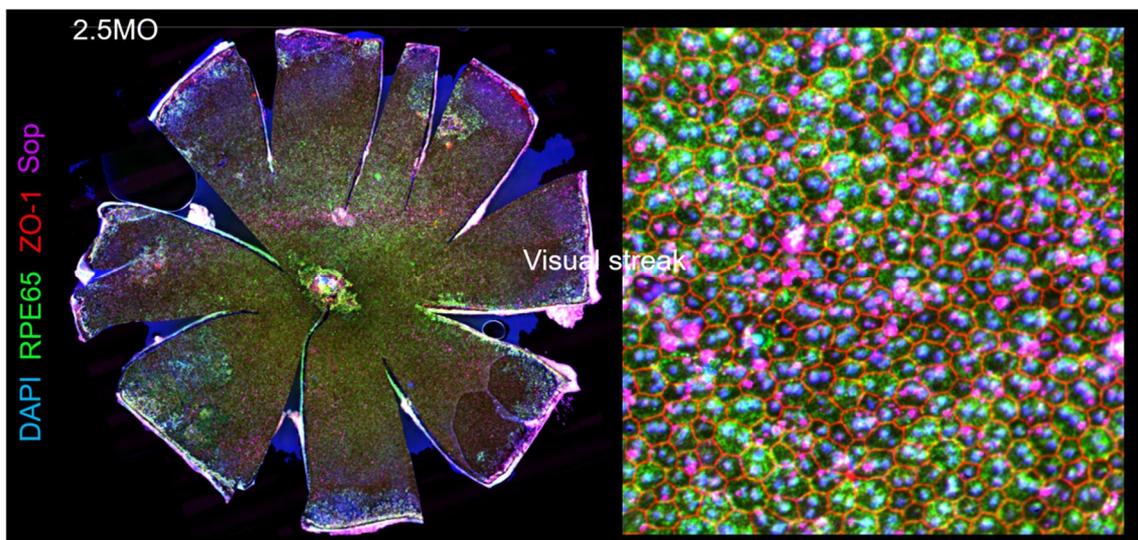
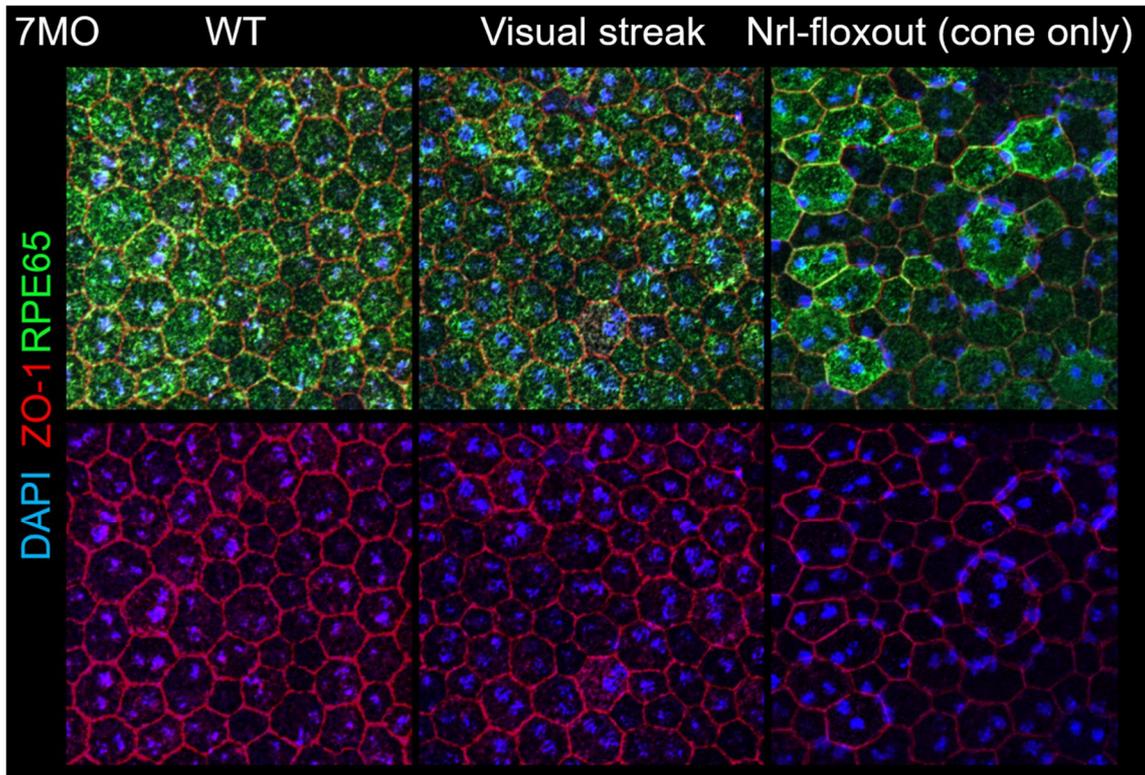


図 2



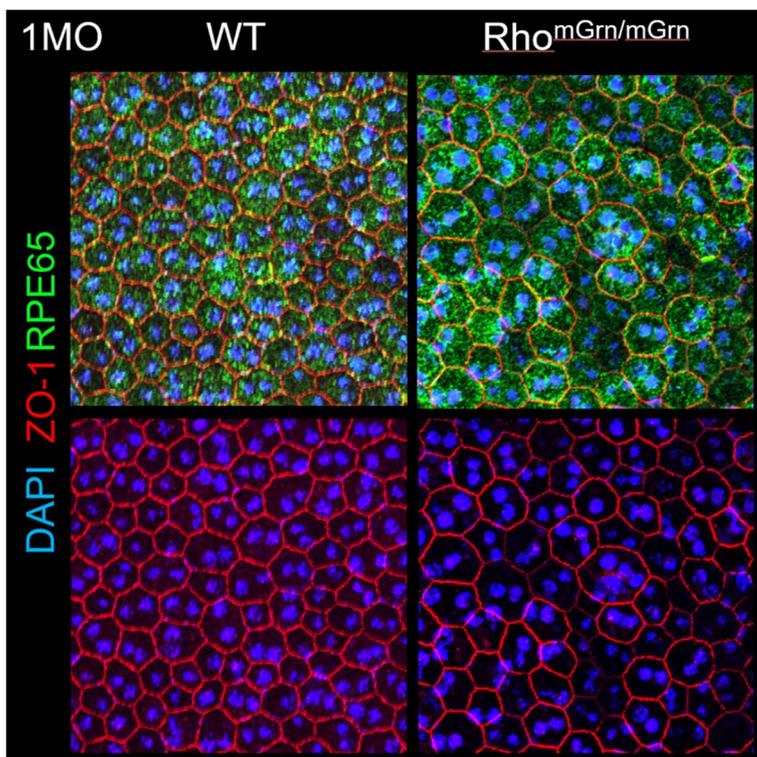
(2) 錐体視細胞優位な環境は RPE にとってストレスの要因となる

錐体視細胞の PRE への影響を比較するため、7 ヶ月齢以降より WT、Visual streak および Nrl floxout (Nrl KO マウスと同等) マウスの PRE のホルマウント染色を実施した。図 3 は 7 ヶ月齢のホルマウント染色の網膜中心からやや背側 (Visual streak 部分) に相当する部分の拡大像を示す。Visual streak マウスでは RPE65 シグナルの若干の減弱を認めるが細胞形態は WT と同等である。一方、Nrl floxout マウスでは RPE ごとの RPE65 発現量の差が大きく、RPE の形態が総じて大きくなっていった。この傾向は萎縮型加齢黄斑変性患者の RPE 病態に類似しており、錐体視細胞に隣接する PRE は周辺部に比べて高いストレス環境下にある事が示唆された。



(3) 錐体オプシンの特性が RPE ストレスに關与する可能性を示した

錐体視細胞は杆体視細胞に比して光に対する感度は低いが応答が早く時間分解能が高い。それぞれの特性は外節部に発現するオプシン(光受容蛋白質)に大きく依存するため、オプシンの生理機能がストレスの遠因になる可能性が考えられた。そこで、マウスロドプシン遺伝子座に緑オプシン遺伝子をノックインして、杆体視細胞に緑錐体オプシンを発現させたマウス網膜を解析した。その結果、図 4 に示すように、1ヶ月齢のマウス RPE において Nrl floxout マウスと同様の RPE65 の不均一な発現パターンと、RPE の縮退を示す所見を得た。この結果は黄斑の機能に重要な錐体オプシンの生理機能が RPE のストレスとなり得る可能性が示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Edo Ayaka, Sugita Sunao, Futatsugi Yoko, Sho Junki, Onishi Akishi, Kiuchi Yoshiaki, Takahashi Masayo	4. 巻 21
2. 論文標題 Capacity of Retinal Ganglion Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells to Suppress T-Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7831 ~ 7831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21217831	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 Matsuyama Take, Tu Hung-Ya, Sun Jianan, Hashiguchi Tomoyo, Akiba Ryutaro, Sho Junki, Fujii Momo, Onishi Akishi, Takahashi Masayo, Mandai Michiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Genetically engineered stem cell-derived retinal grafts for improved retinal reconstruction after transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102866 ~ 102866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102866	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 Nishida Mitsuhiro, Tanaka Yuji, Tanaka Yo, Amaya Satoshi, Tanaka Nobuyuki, Uyama Hirofumi, Masuda Tomohiro, Onishi Akishi, Sho Junki, Yokota Satoshi, Takahashi Masayo, Mandai Michiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Human iPS cell derived RPE strips for secure delivery of graft cells at a target place with minimal surgical invasion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00703-x	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 Sakai Daiki, Hiraoka Masakazu, Matsuzaki Mitsuhiro, Yokota Satoshi, Hirami Yasuhiko, Onishi Akishi, Nakamura Makoto, Takahashi Masayo, Kurimoto Yasuo, Maeda Akiko	4. 巻 67
2. 論文標題 Genotype and phenotype characteristics of RHO-associated retinitis pigmentosa in the Japanese population	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 138 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-023-00975-y	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3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akishi Onishi, So Goto, Yoko Ohigashi, Masayo Takahashi
2. 発表標題 Transgenic mice with visual streak-like morphology; novel rodent models for human retinal diseases
3. 学会等名 ARVO 2020 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大西暁士
2. 発表標題 顕性遺伝型網膜色素変性症に対するゲノム編集治療製剤の開発
3. 学会等名 第42回日本眼薬理学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akishi Onishi
2. 発表標題 The HITI showcase: reasonable and practical gene-editing therapeutics to treat ADRP
3. 学会等名 French-Japan Joint scientific seminar "Vision restoration: emerging therapeutic approaches" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------