

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500394

研究課題名（和文） 眼コロボーマのモデル動物に関する研究

研究課題名（英文） Study on animal model for ocular coloboma

研究代表者

松浦 哲郎 (MATSUURA TETSURO)

摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号：20268494

研究成果の概要（和文）：眼colobomaは虹彩・網膜・脈絡膜等の眼球構成組織を欠損するヒトの先天異常の一つである。RCSラットには小眼球が5%の頻度で出現することが報告されているが、我々は小眼球が眼colobomaを検出する一つの指標であることに注目し、その臨床的变化と眼球内部の異常について精査した。その結果、本系統の小眼球の瞳孔にはすべて下方変異が認められ、その臨床的異常は6時方向の虹彩低形成(虹彩coloboma)に起因していることが明らかとなった。さらに眼球内部ではヒト眼colobomaとよく似た毛様体上皮の異所形成および網膜・脈絡膜欠損が検出され、明らかにRCSラットにヒトの眼colobomaと同一の病変が再現されていることが示され、本系統がヒトの小眼球性の眼colobomaモデルであることが明らかとなった。

眼colobomaでは眼球発生時の眼杯裂縁の基底膜崩壊機構に何らかの傷害があると考えられているが、次に非小眼球性で比較的軽度の眼colobomaモデルであるFLSマウスを用い発生要因の解析研究を進めた。その結果、正常眼球では胎生12日にgelatinを基質とするprotease上昇のピークが眼杯裂縁で認められ、Collagen- α 陽性の眼杯裂縁上皮の基底膜は消失し始めていたのに対し、眼杯裂縁閉鎖不全を示すFLS胎児では眼杯裂縁近傍のprotease活性の一過性の上昇はなく、基底膜崩壊は全く認められなかった。以上から、gelatinaseの上昇がないことがFLSマウスの眼colobomaに寄与しているのではないかと考えられた。

研究成果の概要（英文）：The RCS strain of rats has a low incidence of microphthalmia. Ocular coloboma is sometimes accompanied by corectopia in humans and therefore ectopic pupil may indicate ocular coloboma in experimental animals. We found that inferior ectopic pupil is associated exclusively with small-sized eyes in this strain. The objective of the current study was to evaluate whether inferior ectopic pupil is associated with iridal coloboma and other types of ocular coloboma in RCS rats. Ectopic pupils in RCS rats were found exclusively in an inferior position, where the iris was shortened. Fundic examination revealed severe chorioretinal coloboma in all cases of inferior ectopic pupil. The morphologic characteristics closely resembled those of chorioretinal coloboma in humans. The RCS strain is a suitable model for human ocular coloboma, and inferior ectopic pupil appears to be a strong indicator of ocular coloboma.

FLS mice have been shown to develop a hereditary disorder characterized by localized retinochoroidal defects of the ventral fundus very similar to human typical ocular coloboma without microphthalmia. The objective of this study was to determine when and how the failure of the optic fissure closure occurs, and to clarify the disturbed mechanism of basement membrane disintegration during embryonal stage in FLS mice. The inner and outer layers of the optic cup did not normally fuse at midlenticular levels of the optic fissure in almost 70% of FLS fetuses by GD 15.5, whereas both margins were completely fused in all normal BALB/c fetuses of the same gestational day. The basement membrane persisted after the close contact of both sides of the fissure margins during GD 11.5 and 15.5. Ultrastructurally, the basal lamina was not disintegrated and mesenchymal cells intervened between the two neuroepithelial layers, resulting in complete separation of both fissure margins at GD 13.0. It is highly probable that the disturbed basement membrane disintegration right before optic fissure closure causes mild ocular coloboma without microphthalmia in FLS mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：先天異常 Coloboma 動物モデル 病理

1. 研究開始当初の背景

眼colobomaは虹彩・網膜・脈絡膜等の眼球構成組織を欠損するヒトの先天異常の一つであり、欠損が広範囲にわたる場合には視神経にまで機能傷害がおよび失明に至り、形態的に小眼球を伴う場合もある。また、比較的軽度の眼colobomaでは下方向の虹彩が欠損したために生じる鍵状の瞳孔や、眼球内部での光の反射による視覚障害から本病態が臨床的に検出される。ヒトにおける眼colobomaの発症は10,000人にほぼ一人の割合で発症することが知られており、遺伝的には優性と劣性の遺伝様式が報告されている。我々の研究室では、眼colobomaの一つの指標である小眼球が近交系RCSラットで一定の頻度で認められ、この小眼球に必ず瞳孔偏位が伴っていることが明らか

となっている。一方、現在維持している近交系アルビノFLSマウスでは小眼球は伴わないが、病理組織学的検査では眼colobomaが眼球内部に高頻度に発症することが判明している。従って、これらの2系統の齧歯類はヒト疾患で見られる小眼球性および非小眼球の眼coloboma形質を発現する貴重なモデルであると考えられる。現在、ヒトにおける眼colobomaの治療・予防法はほとんどなく、その意味からも遺伝的・形態的にヒトと相似する実験動物モデルの開発が待たれている。

2. 研究の目的

(1) 毒性試験に使用されている実験動物においても眼 coloboma は一定の頻度で検出されるが、臨床的に検出されることはなく、偶発的に眼球の組織検索で本病態を有して

いるか否かが解る。通常、眼 coloboma は本病態とは異なる指標である小眼球から通常検出され、また有色ネズミでは下方の虹彩色素が欠損(虹彩 coloboma)していることから検出される。RCS ラットでは小眼球が一定の頻度で出現し、この小眼球には必ず下方の瞳孔偏位が伴っていることが明らかとなっている。一方、我々が扱っている FLS マウスのように眼球の大きさが正常で虹彩に色のないアルビノでは眼 coloboma を検出することは非常に困難であるが、RCS 同様に FLS 系統では瞳孔位置異常(ectopic pupil)が生じることも確認されている。また手術用顕微鏡と連続組織切片による 3 次元構築により、本 FLS 系統が高率(80%)に眼球内部で coloboma が発生していることが既に明らかになっている。したがって、両 2 系統ではこの前眼房の瞳孔異常と眼底異常(眼 coloboma)に深い関連があることが予想され、瞳孔検査で非観血的に眼 coloboma を検出することが可能になると推定される。

(2) 発生的に、眼 coloboma は眼杯裂の閉鎖不全が要因で生じる先天異常であり、FLS マウス系統に胎生期の異常が存在することは十分予想される。しかしながら、本系統の眼 coloboma の病態の程度は明らかに軽度であり、従来報告されている眼杯裂閉鎖不全の程度も弱いことが予想される。さらに、coloboma 眼の眼杯裂閉鎖不全に関しては上皮接着の際の基底膜崩壊機構の欠失が原因であることが報告されており、本系統においても上皮基底膜における崩壊機構異常が関与している可能性が高い。また、眼球形成時期の様々な遺伝子発現様式の異常も分子生物学的に解明する必要がある。マウスの眼杯裂閉鎖が生じる時期は胎生 11.0 日~12.0 日の間であり、その間に

形態および関連遺伝子の発現異常が検出される可能性は高いと考えられる。

3. 研究の方法

(1)交配試験による RCS ラットおよび FLS マウスの表現型の遺伝と遺伝背景による coloboma 発生の差の検討

RCS ラットと BN ラットおよび FLS マウスと BALB/c ,CBA マウス系統を交配させ F1 および N2 個体を得、表現型の遺伝様式を調べた。眼球についてはすべての個体について眼球内部を手術用顕微鏡・実体顕微鏡を用いて精査後、coloboma の判定と眼球の大きさ(Width×Height×Depth)と虹彩長を実体鏡で形態計測した後に病理組織学的検査を行った。眼 coloboma 個体の表現型を記録し、各系統における眼 coloboma の出現率、coloboma 個体と正常個体の統計的比較を実施した。

(2)FLS マウスにおける胎生裂閉鎖異常の基底膜崩壊機構の検索

眼 coloboma では正常の眼杯裂閉鎖に関与する両側の眼杯裂縁の基底膜の崩壊機構に傷害があることが報告されている。恐らく、眼杯裂閉鎖異常を呈した FLS 胎児ではこの崩壊機構が関与しているものと思われる。作製した連続切片に PAS 染色で基底膜の染色を行った後、基底膜マーカーの抗体を用いて免疫染色を実施した。さらに基底膜に関しては、胎児の眼球をパラホルムグルタルで固定した後、エポキシ樹脂包埋し、透過電子顕微鏡にて眼杯裂縁の基底膜の状態を鏡検し、光顕像の傍証を固めた。

4. 研究成果

(1)まず RCS ラットにおける眼 coloboma

の形態学的特徴に注目し、その成果を発表した。RCS ラットには小眼球が5%の頻度で出現することが報告されている。我々は小眼球が眼 coloboma の一つの指標であることに注目し、その臨床的な変化と眼球内部の異常について精査した。その結果、小眼球の瞳孔にはすべて下方変異が認められ、その臨床的異常は6時方向の虹彩の低形成に起因していることが明らかとなった。さらに眼球内部ではヒトとよく似た毛様体上皮の異所形成、網膜・脈絡膜欠損が検出され、明らかに RCS ラットにヒトの眼 coloboma と同一の病変が再現されていることが示された。

(2)表現型の発現と遺伝

RCS ラットでは形態計測的に明らかに colobom を有する眼球は小眼球であり、劣性遺伝であった。また、FLS マウスの眼球は正常眼球との大きさは統計学的に差はなく、発現する眼 coloboma は劣性遺伝であることが判明した。

(3)眼 coloboma では正常な眼杯裂縁の基底膜崩壊機構に傷害があると考えられているが、この眼杯裂縁の基底膜崩壊機構に焦点をあて研究を進めた。正常マウス胎児について、眼杯裂閉鎖期の基底膜の消失と同時期の基底膜成分を基質とする protease 活性を in situ zymography 法により検索した。その結果、胎生12日に gelatin を基質とする protease 上昇のピークが存在することが判明した。Collagen-IVに対する免疫染色を実施した結果、眼杯裂縁の基底膜は消失を開始していた。一方、眼杯裂閉鎖不全を示す FLS 胎児では眼杯裂縁近傍における prorease 活性の一過性の上昇は認められず、眼杯裂縁の基底膜は明らかに残存していた。以上から、FLS マウスでは眼杯裂縁

において gelatinase 上昇が抑制されていることが眼 coloboma を誘発する一つの要因ではないかと考えられた。

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3件)

① Matsuura, T., Tsuji, N., Kodama, Y. Narama, I., Ozaki, K. Iridal coloboma induces dyscoria during miosis in FLS mice. *Vet Ophthalmol*, 査読有, 16(3), 2013, in press

② Tsuji, N., Kita, K. Ozaki, K., Narama, I. Matsuura, T. Organogenesis of mild ocular coloboma in FLS mice: failure of basement membrane disintegration at optic fissure margins. *Exp Eye Res*, 査読有, 94, 2012, 174-178, doi:10.1016/j.exer.2011.12.004

③ N Tsuji, K Ozaki, I Narama, T Matsuura Inferior Ectopic Pupil and Typical Ocular Coloboma in RCS Rats. *Comparative Medicine*, 査読有, 61(4), 2011, 378-384

[学会発表] (計11件)

① T MATSUURA, N TSUJI, K OZAKI, I NARAMA, Basement Membrane Disintegration and Relevant Gelatinase Activity Increase at Optic Fissure Margin During Normal Ocular Development in BALB/c Mice. 40th European Teratology Society, 2012年9月3日 Linz, Austria

② 久保このみ、辻菜穂、尾崎清和、松浦哲郎、RCS ラットの眼 coloboma と硝子体中の動脈遺残の関連性について、第52回先天異常学会2012年7月6日、東京女子医科大学

③ 松浦哲郎、辻菜穂、野口昌宏、吉木淳、尾崎清和、眼杯裂縁の基底膜崩壊機構とマクロファージ集簇の関連性、第52回先天異常学会、2012年7月6日、東京女子医科大学

④ 辻菜穂、尾崎清和、奈良間功、松浦哲郎、マウス眼 coloboma の発生機序：眼杯裂縁の基底膜崩壊機構とマクロファージ集簇の関連性について、第28回毒性病理学会、2012年2月3日、東京一橋記念講堂

⑤ N Tsuji, K Ozaki, I Narama, T Matsuura, PAHTOGENESIS OF FAILED CLOSURE OF OPTIC FISSURE IN FLS MICE WITH OCULAR COLOBOMA : ZYMO-

GRAPHIC ANALYSIS OF
COLLAGENASE, 29th European Society
of Veterinary Pathology, 2011年9月8日,
Uppsala, Sweden

⑥ T MATSUURA, N TSUJI, K OZAKI,
I NARAMA, Inferior Ectopic Pupil and
Typical Ocular Coloboma in RCS Rats, 39th
European Teratology Society, 2011年9月
5日, Gent, Belgium

⑦ 辻菜穂、松本茜、尾崎清和、奈良間功、
松浦哲郎、FLSマウスの眼coloboma発生機序
：in situ zymographyによるゼラチナーゼ活
性、第51回先天異常学会 2011年7月23日、
東京砂防会館

⑧ 辻菜穂、喜多勝俊、尾崎清和、奈良間功、
松浦哲郎、FLSマウスの眼colobomaにおける
眼杯裂閉鎖不全は眼杯裂縁の基底膜崩壊機
構の破綻に起因する、第58回実験動物学会、
2011年5月27日、ワーホール船堀

⑨ 辻菜穂、松浦哲郎、尾崎清和、奈良間功
FLSマウスの眼colobomaにおける眼杯裂閉鎖
不全の発生機序正常胎児眼杯裂縁における
コラゲナーゼ活性のin situ zymographyに
よる検討、第27回日本毒性病理学会、2011年
1月27日、大阪国際交流センター

⑩ 辻菜穂、松浦哲郎、尾崎清和、奈良間功
RCSラットの眼Colobomaに併発した硝子体中
の動脈遺残の特徴について、第50回日本先天
異常学会、2010年7月8日、淡路夢舞台

⑪ 辻菜穂、松浦哲郎、尾崎清和、奈良間功、
RCSラットの外観的に異なる2型の眼球異常
について、第57回日本実験動物学会、2010年
5月12日、京都テルサ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 哲郎 (MATSUURA TETSURO)
摂南大学・薬学部・准教授
研究者番号：20268494

(2) 研究分担者

吉木 淳 (YOSHIKI ATSUSHI)
独立法人理化学研究所・実験動物開発室・
室長
研究者番号：40212310
尾崎 清和 (OZAKI KIYOKAZU)
摂南大学・薬学部・講師
研究者番号：40268496