

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 5 月 29 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591939

研究課題名（和文） 動物モデルを用いた加齢黄斑変性の罹患感受性候補遺伝子の同定と遺伝子診断への応用

研究課題名（英文） Identification of candidate genes responsible for an increased susceptibility of age-related macular degeneration using an animal model and its application to gene diagnosis.

研究代表者

大石 健太郎 (OHISHI KENTARO)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・助教

研究者番号：80345826

研究成果の概要（和文）： ラットに強い光を照射すると、視細胞と色素上皮細胞のアポトーシスを伴う網膜変性が起こる（ラット網膜光障害実験モデル）。これは、加齢黄斑変性（AMD）の動物実験モデルとして用いられている。本研究では、同モデルにおける網膜光障害の感受性の程度がラットの系統に依存することに着目し、網膜光障害の感受性を支配する原因遺伝子のマッピングを進めてきた。本研究期間では、この遺伝子が存在する染色体領域をラット 5 番染色体上の 0.99 Mb にまで狭めた。今後、この原因遺伝子を同定し、AMD の発症機序追究に利用する。

研究成果の概要（英文）： To elucidate the mechanism underlying the molecular pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD), we employed a rat experimental model of retinal photic injury induced by bright, white light exposure. Since the injury susceptibility depends on the rat strain, we started to identify a gene responsible for the susceptibility. In this study, we narrowed down the gene-containing region to 0.99 Mb on rat chromosome 5. It is thought that the 0.99 Mb region contains a key gene which also affects the pathogenesis of AMD. In future, we will identify the responsible gene, and eventually to harness it for an etiology of AMD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23年度	1,100,000	330,000	1,430,000
24年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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： 網膜光障害・連続戻し交配・モリス水迷路・多型解析・加齢黄斑変性

1. 研究開始当初の背景

加齢とともに発症率が増加する中途失明の原因疾患である加齢黄斑変性（AMD）は、我

が国においても急激に患者が増加している。本疾患は、視細胞や色素上皮細胞の変性・消失に伴う「地図状萎縮」を来す『萎縮型』と、

黄斑部の脈絡膜新生血管の形成が起きる『滲出型』に分かれ、ともに視機能に重篤な障害を来す。

本疾患は、遺伝要因と環境要因の両方が関与する多因子疾患であり、眼科領域における生活習慣病とも言える。遺伝要因に関しては、幾つもの遺伝子 (*ABCR*, *FBLN5*, *CFH*, 他) が報告されているが、それらのタンパク質と AMD の発症機序との関係については未だ不明な点が多く、また、全ての AMD 患者の病態を説明できる訳ではない。

本疾患の環境要因のひとつに、「長年にわたる太陽光曝露」がある。ラットやマウスに蛍光灯照射をすると、視細胞と色素上皮細胞においてアポトーシスが起り、萎縮型 AMD に類似した網膜変性を生じる（「網膜光障害実験モデル」）。この網膜光障害は、ラットやマウスの系統により、その重篤度が大きく異なる。すなわち、動物の遺伝的背景の違いにより、網膜光障害の起き易さ（感受性の程度）に違いがある。

これまで、我々は、ラットの網膜光障害感受性の違いを解析し、WKY 系統が感受性であることに対して、LEW 系統が耐性であることを見出し、それらの系統を用いた遺伝学的アプローチ（連続戻し交配）を利用して、網膜光障害感受性を支配する責任遺伝子の探索を行ってきた。その結果、ラットにおける網膜光障害の感受性発現は、メンデル遺伝様式に則り、常染色体性であり、感受性が耐性に対して優性、2 個以上の責任遺伝子が関与することを見出した。候補遺伝子領域を 5 番染色体長腕テロメア付近、19 番染色体中央の 2 箇所に絞り込み、それらの領域を網膜光障害感受性 (Retinal Photic Injury susceptibility) に因んで、"Rpi1"および"Rpi2"と命名した。

2. 研究の目的

ラット網膜光障害実験モデルにおける障害感受性がラットの系統に依存することに着目し、その遺伝的差異である責任遺伝子を同定することである。そして、その遺伝子の作用機序を推測し、網膜変性機序との関わりについて検討する。また、ヒトのホモログ遺伝子をクローニングし、AMD の易罹患性の遺伝子診断に応用することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) **交配実験** 本研究期間における連続戻し交配第 4 世代 (BC4) 個体と LEW ラット (劣性) との戻し交配による BC5 ラット作製から開始し、BC10 作製まで行った。各 BC ラットは、成熟後、光照射 ((2) 参照) し、その 4.5 日後にモリス水迷路による視力障害試験 ((3) 参照) を実施し、視力障害が重度である (感受性である) と判断した個体を用いて、次の世代の BC 個体作製に利用した。

(2) **光照射実験** ラットは、朝 7 時から夜 7 時までの明環境である明暗サイクル下にて飼育した。光照射実験は、予め 1 日間の暗順応を行い、その後、夜 12 時より 3 時間、照度 3000 lux の白色蛍光灯の光を頭上より照射した。光照射終了後のラットは、通常光環境下に戻した (朝 7 時まで暗所)。

(3) **視力障害試験** 10~20 週齢のラットは、モリス水迷路実験を学習させた。つまり、ラットを水に放した直後に円形の水槽 (直径 150 cm、高さ 45 cm、水位 30 cm) の中央付近に設置した島にまで短時間で辿り着くように学習させた。

学習が確認できた個体に関して、上述 (2) の通り光照射を行い、その 4.5 日後に、島に辿り着くまでの泳ぎ時間を計測した。また、その様子はビデオ撮影した。泳ぎ時間が長い個体については、泳ぎ行動の様子の確認で問題が無ければ、感受性個体であると判断し、連続戻し交配に供した ((1) 参照)。一部の個体に関しては、2-3 週間後にも水迷路実験し、再度、視力障害を調べた。

(4) **マイクロサテライト (MS) 多型解析** ラットの尻尾からゲノム DNA を抽出・精製し、PCR 用のテンプレートとした。テンプレート DNA は、各種 MS マーカー (PCR プライマー) とともに PCR 反応を行ない、Metaphor™ を用いたアガロースゲル電気泳動を行った。バンドパターンにより、MS マーカー認識部位のタイピングを行った。

(5) **網膜変成長解析** 光照射の数ヶ月後、ラットをエーテル過量吸入により無痛的に屠殺

した後、眼球を摘出し、冷 4%-パラホルムアルデヒド溶液にて浸漬固定した。冷スクロース-PBS 溶液での処理の後、液体窒素下にて OCT コンパウンド中に凍結包埋した。この凍結ブロックから、矢状断かつ乳頭部を含む凍結切片を切り出し、ヘマトキシリン&エオシン染色した。この眼病理標本を用いて、外顆粒層に明白な異常（菲薄化や消失）が認められた領域の網膜変性長と網膜全長を計測し、網膜全長における網膜変性長の割合を網膜変性インデックス (DI, $0 \leq DI \leq 1$) として算出した。また、LEW と WKY ラットを用いて実験的に求めた境界値 “0.47” を感受性型と耐性型の境界とした。

(6) **1塩基多型 (SNPs) 解析** 公共ラット SNPs データベース (URL: <http://snplotyper.mcw.edu/>) 上に存在する系統別の SNPs パターン情報を取得し、*Rpi1* 領域内のハプロタイプパターンと表現型 (感受性) を比較した。また、WKY および LEW 以外の系統についても、我々の光照射条件下における表現型を決定し、ハプロタイプパターンとの関係を考察した。

(7) **AMD の症例収集** 聖隷浜松病院眼科より、AMD 症例と正常対照者の末梢血検体を収集した。本研究の趣旨を詳細に説明し、インフォームドコンセントが得られた場合のみを対象とした。

4. 研究成果

(1) **論理的限局化** 解析対象とした全 BC4 個体は光照射後にモリス水迷路実験により、動物行動学的に視力障害の程度を調べた個体である。これらのゲノムに対して MS 多型解析を行い、さらに、その一部個体に関しては眼病理解析を実施した。

① ***Rpi1* 遺伝子と *Rpi2* 遺伝子の役割** 感受性 BC3 個体である親ラットに由来する 5 番染色体上の *Rpi1* 領域 (9.75 Mb) 全域のゲノム型が WKY 型 (*Rpi1*^{WKY}) もしくは LEW 型 (*Rpi1*^{LEW}) である 41 匹と、*Rpi2* 領域 (8.64 Mb) 全域が WKY 型 (*Rpi2*^{WKY}) もしくは LEW 型 (*Rpi2*^{LEW}) である 50 匹をそれぞれ用いて、*Rpi1* と *Rpi2* 領域の網膜変性に関する役割について検討した。

各個体の網膜光障害の程度を病理計測により DI 値として数値化し、ゲノム型との関係を調べた (図 1)。網膜変性の程度に関して、*Rpi1* が WKY 型の場合、感受性個体が大半を占めた一方、LEW 型の場合には逆に耐性が優位であった (図 1A)。このことから、*Rpi1*^{WKY} が網膜光障害感受性であるための必要十分条件であることが明らかとなった。*Rpi2* に関しては、WKY 型であっても感受性と耐性の個体が共存していた (図 2B) ので、直接的な網膜光障害感受性の決定には関与していないことが明らかとなった。このことから、*Rpi2*^{WKY} は *Rpi1*^{WKY} と共存する場合に限り、泳ぎの所要時間を長くする何らかの作用に関与していることが考えられた。この結果から、*Rpi1* 領域の

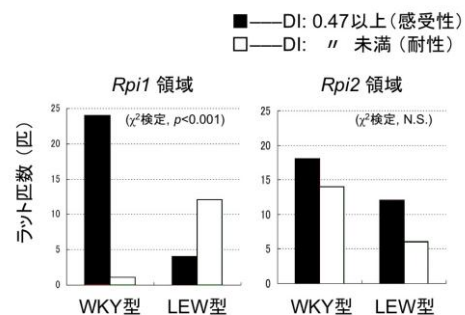


図1. *Rpi1*, *Rpi2* 領域のゲノム型と網膜変性みに研究対象を絞ることにした。

② **論理的限局化** *Rpi1* 領域 (9.75 Mb) のゲノム型が WKY 型と LEW 型の混在型である 20 匹の BC4 個体を用いて、網膜変性を指標とした *Rpi1* 領域の更なる限局化について検討した。

Rpi1 内のゲノム型を詳細に解析するため、7 種のマーカーを対象に MS 多型解析を行った (図 2)。WKY 型ゲノムの存在位置により 6 グループに分け、グループ間での平均 DI 値を比較した。*Rpi1* 領域のセントロメア側が LEW 型でテロメア側が WKY 型であるグループで

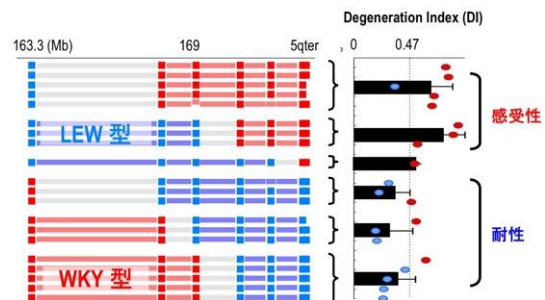


図2. *Rpi1*領域のゲノム型と網膜変性の関係

は、網膜変性が大きかった。一方、セントロメア側が WKY 型であるグループは網膜変性が小さかった。この結果より、*Rpil* 領域を 3.93 Mb にまで論理的に限局化できた。

(2) **物理的限局化** 光照射後のモリス水迷路実験による視力障害試験の結果をもとに感受性個体を選別して戻し交配するサイクルを BC8 まで実施した (図 3)。この BC1 から BC8 までの 1 ラインについて、MS 多型解析した結果、WKY 型を含む染色体数は世代の経過に伴って減少し、BC7 では *Rpil* 領域が存在する 5 番染色体のみとなっていた (図 3A)。さらに、BC8 では、*Rpil* 領域のみが残存しており、その領域長は、(1) で論理的に限局化した 3.93 Mb と同等の領域にまで限局化していた (図 3B)。

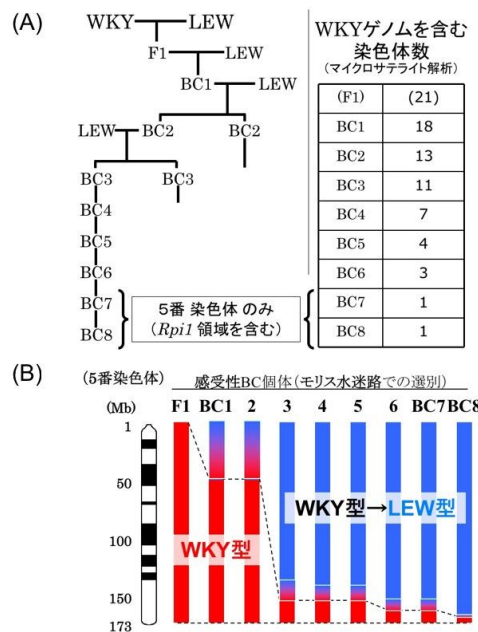


図3. 1ラインのBC個体のWKYゲノム領域の変遷

(3) **ハプロタイプ解析** 先の 3.93 Mb の *Rpil* 領域に関して、WKY ラットと LEW ラットの 28 座位の SNPs を公共データベースから取得し、比較検討した。その結果、両系統間では全く異なるハプロタイプパターンを示していた。このため、SNPs パターンの比較による更なる限局化には至らなかった。

そこで、第 3 の系統として F344 ラットを加えて比較することにした。我々の光照射条件では、F344 は WKY と同様に感受性を示した。また、F344 のハプロタイプパターンには、連

続 18 座位の SNPs パターン (2.94 Mb 相当) が LEW 系統で全く同じであることが示されたため、*Rpil* 領域からこの 2.94 Mb 領域を除外できることが示唆された。このため、3.93 Mb の *Rpil* 領域は、2.94 Mb を除外することで、0.64 Mb と 0.35 Mb の 2 領域に分断、0.99 Mb にまで限局化された。これらの 2 領域については、*Rpila* および *Rpilb* と再命名した。

(4) **AMD の症例収集** 461 人分 (2011 年度 : 285 人分、2012 年度 : 176 人分) の血液検体を収集した。

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)

[学会発表] (計 11 件)

1. 大石健太郎、細野克博、堀田喜裕、平光忠久、藪島伸生 : ラット網膜光障害感受性の遺伝学的解析: 加齢黄斑変性の発症機序解明に向けて. 第 114 回日本眼科学会総会 (名古屋, 2010.4.15-18)
2. 大石健太郎、細野克博、堀田喜裕、平光忠久、藪島伸生 : マイクロサテライト多型解析によるラット網膜光障害感受性の遺伝学的解析. 第 21 回眼科酸化ストレス研究会 (東京, 2010.7.31)
3. 大石健太郎 : ラット網膜光障害感受性の責任遺伝子探索. 生命科学科創立 20 周年記念講演会 (米子, 2010.10.16)
4. 大石健太郎、細野克博、堀田喜裕、平光忠久、藪島伸生 : ラット網膜光障害感受性の責任遺伝子探索: 連続戻し交配による領域の限局化. 第 33 回日本分子生物学会年会 (神戸, 2010.12.10)
5. 大石健太郎 : ラット網膜光障害の感受性遺伝子検索のための遺伝学的アプローチ: 網膜変性疾患の発症機序解明に向けて. 第 1 回聖隷眼科勉強会 (浜松, 2011.1.8)
6. 大石健太郎、細野克博、尾花明、堀田喜裕、平光忠久、藪島伸生 : ラット網膜光障害の行動学的解析法の妥当性の検証: 病理組織観察結果との相関解析. 第 115 回日本眼科学会総会 (東京, 2011.5.12-15)

7. Ohishi, K., Hosono, K., Obana, A., Hotta, Y., Hiramitsu, T., Minoshima, T.: Genetic Analysis of Rat Strain-dependent Difference in the Susceptibility to Retinal Photic Injury and Mapping Possible Susceptibility Loci. *4th International Conference on Health and Longevity Sciences (ICHALS)* (Shizuoka, 2011.10.21)
8. 大石健太郎、細野克博、尾花明、堀田喜裕、平光忠久、蓑島伸生: ラット網膜光障害感受性の責任遺伝子領域の限局化. 第 116 回日本眼科学会総会 (東京, 2012.4.5-8)
9. 大石健太郎、細野克博、尾花明、堀田喜裕、平光忠久、蓑島伸生: ラット網膜光障害感受性の遺伝解析: 加齢黄斑変性の易罹患性の原因遺伝子の同定に向けて. 第 23 回眼科酸化ストレス研究会 (神戸, 2012.7.28)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 健太郎 (OHISHI KENTARO)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス
研究センター・助教

研究者番号: 80345826

(2) 研究分担者

細野 克博 (HOSONO KATSUHIRO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60402260

尾花 明 (OBANA AKIRA)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス
研究センター・客員教授

研究者番号: 40194625

堀田 喜裕 (HOTTA YOSHIHIRO)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90173608

蓑島 伸生 (MINOSHIMA SHINSEI)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス
研究センター・教授

研究者番号: 90181966

(3) 連携研究者

なし