

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592664

研究課題名(和文)加齢黄斑変性感受性遺伝子トランスジェニックマウスを用いた環境リスク因子の解析

研究課題名(英文)Characterization of mouse models for age-related macular degeneration

## 研究代表者

中山 真央(NAKAYAMA, MAO)

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・研究員

研究者番号：20624810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性は複数の遺伝子因子と環境因子によって発症すると考えられる。本研究では日本人の遺伝子として最もオッズ比の高いHTRA1、ARMS2に注目し、マウスの全身でHtrA1およびARMS2、ARMS2(A69S)を強制発現するトランスジェニックマウスを作製し、喫煙による環境的なストレスを加え、病態の重篤度を分析して環境因子の遺伝子に与える影響を検討した。HtrA1高発現によりトランスジェニックマウスの一部に脈絡膜新生血管が有意に誘導され、HTRA1の過剰発現はブルッフ膜の脆弱性を惹起し、滲出型加齢黄斑変性の発症に大きく関係している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genetic and environmental factors are believed to be involved in the onset of age-related macular degeneration (AMD). We generated three mouse lines that overexpressed mouse HtrA1, human ARMS2 and ARMS2(A69S) throughout the entire mouse body. CNV similar to human AMD was observed progression in HtrA1 Tg mouse at 12-month-old. Exposure to mainstream cigarette smoke enhanced the CNV rate in HtrA1 Tg mouse. Our data suggested that HtrA1 overexpression alone is a strong risk factor for wet AMD, which is the predominant form of AMD in the Japanese population.

研究分野：眼分子生物学

キーワード：加齢黄斑変性 感受性遺伝子 HTRA1 ARMS2 トランスジェニックマウス 喫煙

## 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は欧米では成人の失明原因の第1位で珍しくない病気である。日本でも人口の高齢化と生活の欧米化により近年著しく増加しており、失明原因の第4位となっている。特に脈絡膜新生血管に伴う滲出型加齢黄斑変性は日本人には多く見られている。加齢黄斑変性は多因子疾患と考えられており、複数の遺伝子因子と環境因子によって発症すると考えられる。滲出型加齢黄斑変性の全ゲノム関連解析によって、染色体10q26の領域に位置する感受性遺伝子 *HTRA1* とその上流の *ARMS2* (仮想遺伝子) が注目されている。我々は日本人に多くみられる滲出型黄斑変性のみを集め、独自に全ゲノム関連解析を行ったところ、染色体10番 *ARMS2/HTRA1* 遺伝子領域の遺伝子多型が疾患に相関することを明らかにした。しかし、この2つの遺伝子の片方/両方が加齢黄斑変性のリスクを高めるのかまだ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では日本人の遺伝子として最もオッズ比(OR)の高い *HTRA1*、*ARMS2* に注目し、マウスの全身で *Htra1* および *ARMS2*、*ARMS2 (A69S)* を強制発現するトランスジェニックマウスを作製し、喫煙による環境的なストレスを加え、病態の重篤度を分析して環境因子の遺伝因子に与える影響を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) *Htra1*、*ARMS2*、*ARMS2 (A69S)* トランスジェニックマウスの作製  
トランスジェニックマウスは CAG プロモーターにそれぞれマウスの *Htra1* 遺伝子、ヒトの *ARMS2*、*ARMS2 (A69S)* 遺伝子を連結させて全身

で発現するようにデザインされた。ウェスタンブロッティングにより *HTRA1*、*ARMS2* はトランスジェニックマウスの脳と眼においででの発現が確認された。

### (2) HRA + OCT を用いた眼底観察

12ヶ月齢 *Htra1*、*ARMS2*、*ARMS2 (A69S)* トランスジェニックマウスおよび対照群 Wt マウスをケタミン腹腔投与麻酔後、ミドリン P を点眼散瞳した後蛍光眼底造影 (HRA) + 光干渉断層像 (OCT) を用いて、蛍光色素フルオロセイン (FA) とインドシアニンググリーン (IA) 1 : 1 を尾静脈に 20 $\mu$ L 注射し蛍光眼底像を撮影した。さらに光干渉断層像 (OCT) による網膜層と脈絡膜の形態を観察した。

### (3) 網膜の病理学的解析

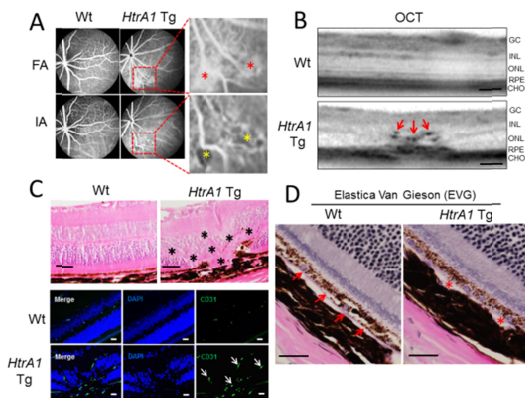
眼底観察で異常が見られたマウスの眼球を摘出してパラフィン切片を作製した。HE 染色、EVG 染色および血管内皮細胞マーカーである CD31 を用いた蛍光免疫染色により網膜の形態を検討した。さらに電子顕微鏡で視細胞および網膜色素上皮細胞の形態を観察した。

### (4) 喫煙による *Htra1*、*ARMS2* トランスジェニックマウスへの影響

眼底観察で網膜異常を認められなかった 12ヶ月齢の *Htra1*、*ARMS2* トランスジェニックマウスおよび対照群 Wt マウスは星薬科大学で喫煙暴露実験を行った。タバコ製品ナチュラルアメリカンスピリットを用いて M.I.P.S 社のタバコ主流煙発生装置を利用して 1日 30分、週 5日、12週間を続く喫煙暴露させた。同時にコントロール群としてのマウスに室内空気を吸入暴露させた。3ヶ月後マウスを回収し、眼底観察および病理学的解析を行った。

#### 4. 研究成果

全身発現した *Htra1* トランスジェニックマウスのうち約 18.2%の個体で今まで報告されていない放射状の脈絡膜新生血管が観察された。(図 A.B.C.) また、*Htra1* トランスジェニックマウスではブルッフ膜の断裂および消失も観察された。(図 D.) 一方、*ARMS2*、*ARMS2 (A69S)* トランスジェニックマウスでは網膜の異常は認められなかった。



*Htra1* 高発現によりトランスジェニックマウスの一部に脈絡膜新生血管が有意に誘導され、HTRA1 タンパク質の過剰発現はブルッフ膜の脆弱性を惹起し、関連遺伝子として滲出型加齢黄斑変性との強い相関が示唆された。喫煙によって *Htra1* トランスジェニックマウスだけでなく对照群の Wt マウスにおいても新生血管が観察された。また、*Htra1* トランスジェニックマウスで喫煙暴露されたものの中に、組成不明の網膜下沈着物、網膜色素上皮細胞変性などが認められ、喫煙は遺伝因子と相互作用し加齢黄斑変性の発症リスクを高めていると考えられる。一方、*ARMS2* を全身で強制発現させても CNV が誘導されなく、さらに喫煙暴露後も網膜の異常が観察されなかったことから、*ARMS2* の局在は CNV の形成に対する保護であることが考えられる。加齢黄斑変性に関係する遺伝子の発見は疾患の早期診断につ

ながり、また加齢性の疾患であることから、リスク遺伝子の機能解析によって、有効な予防法による発症の遅延が可能になる。本研究では日本人加齢黄斑変性患者で多く見られる新生血管を伴う網膜疾患モデルマウスの確立を目的とし、今後 HTRA1 抑制に向けた新しい治療薬や治療法の開発につながる検討が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Nakayama M, Iejima D, Akahori M, Kamei J, Goto A, Iwata T. Overexpression of Htra1 and exposure to mainstream cigarette smoke leads to choroidal neovascularization and subretinal deposits in aged mice. *IOVS*. 2014;55:6514-6523 査読有 DOI : 10.1167/iovs.14-14453

[学会発表] (計 9 件)

Iejima D, Nakayama M, Noda T, Mizota A, Iwata T. Human HTRA1 expression is enhanced by indel mutation in the HTRA1 regulatory element region. Association for Research in Vision and Ophthalmology. May3-7, 2015. Denver, Colorado, USA.

家島 大輔、中山 真央、川村 雄一、野田 徹、岩田 岳 滲出型加齢黄斑変性の感受性遺伝子領域 *ARMS2*/*HTRA1* の転写機能解析 第 19 回眼科分子生物学研究会 2015 年 2 月 28 日-3 月 1 日 岐阜県岐阜市湊町 10 番地十八楼

Iejima D, Nakayama M, Itabashi T, Kawamura Y, Akahori M, Noda T, Iwata T. Characterization of HTRA1 Promoter in Patients with Exudative Age-Related

Macular Degeneration. Asia Association for Research in Vision and Ophthalmology. February16-19, 2015. Yokohama, Japan.

Nakayama M, Iejima D, Itabashi T, Kawamura Y, Akahori M, Noda T, Iwata T. Characterization of HTRA1 promoter in patients with exudative age-related macular degeneration and induction of choroidal neovascularization by overexpression of HtrA1 in aged mice. XXIth International Society for Eye Research. July20-24,2014. San Francisco, CA, USA.

Nakayama M, Iejima D, Itabashi T, Kawamura Y, Akahori M, Noda T, Iwata T. Characterization of HTRA1 promoter in patients with exudative age-related macular degeneration and induction of choroidal neovascularization by overexpression of HtrA1 in aged mice. XVIth International Symposium on Retinal Degeneration. July13-18, 2014. Pacific Grove, CA, USA.

中山 真央、家島 大輔、赤堀 正和、亀井 淳三、岩田 岳 加齢黄斑変性感受性遺伝子 HtrA1 のトランスジェニックマウスの病態と習慣因子（喫煙）の影響 Retinal Research Meeting. 2013年11月30日 東京 JP タワー

Nakayama M, Iejima D, Akahori M, Kamei J, Iwata T. Overexpression of HtrA1 and Smoking Evokes Choroidal Neovascularization and Retinal Deposit in Aged Mice. Association for Research in Vision and Ophthalmology. May5-9, 2013. Seattle, WA, USA.

中山 真央、家島 大輔、赤堀 正和、亀

井 淳三、岩田 岳 加齢黄斑変性感受性遺伝子 HtrA1 のトランスジェニックマウスの病態と習慣因子（喫煙）の影響 東京医療センター若手研究者発表会 2012年11月2日 東京医療センター

中山 真央、亀井 淳三、溝田 淳、岩田 岳 加齢黄斑変性感受性遺伝子 HtrA1 のトランスジェニックマウスモデルを用いた習慣危険因子（喫煙）の影響 喫煙科学研究財団平成23年度助成研究発表会 2012年7月18日 東京

## 6 . 研究組織

研究代表者：中山 真央（NAKAYAMA MAO）

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 研究員

研究者番号：20624810