

# Generation of transgenic rabbit model of retinitis pigmentosa

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-01-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Kondo, Mineo メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24517/00060342">https://doi.org/10.24517/00060342</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



【研究紹介】

世界で初めての網膜色素変性ウサギの作製  
Generation of transgenic rabbit model of retinitis pigmentosa

三重大学大学院医学系研究科 臨床医学系講座 眼科学  
近藤 峰 生

1. はじめに

網膜色素変性 (retinitis pigmentosa, RP) は、網膜の発生・構造・機能にかかわる遺伝子異常により進行性に網膜機能が低下し、最終的には重度の視機能障害に至りうる難病である。眼内栄養因子注入、遺伝子治療、再生治療、人工視覚などの新しい治療法が試みられているが、現在も有効な治療法は確立されていない。

RPのような難病に対する新規治療法の開発には、動物モデルは欠かせない。RPの動物モデルとして、これまでマウスやラットのような小動物が用いられていたが、近年ではイヌ、ネコ、ブタなどの中型-大型の動物も使用されるようになってきた。中型-大型の動物は眼球の大きさがヒトに近いため、手術操作を必要とする治療実験に向いているからである。欧米では、20年以上も前からRPの中型-大型動物モデルの作製や系統維持のプロジェクトが積極的に進められてきた。欧米におけるレーバー先天盲の遺伝子治療の予備実験も、遺伝子変異を有するイヌのモデルを使用している<sup>1)</sup>。しかし、日本ではラットより大きいRPの動物モデルがなかった。そこで我々は2004年から、中型動物として世界で広く使用されている実験動物であるウサギに遺伝子変異を導入してトランスジェニック (Tg) ウサギを作製し、RPモデルウサギを作製するプロジェクトを開始した。

2. Tgウサギの作製法

まずウサギのbacterial artificial chromosome (BAC) 遺伝子ライブラリーから、ロドプシン遺伝子の全長を含むBACクローンを同定し、このBACを相同組み替え技術により、ロドプシン遺伝子の347番目のプロリン (CCG) がロイシン (CTG) となる変異を導入した (図1)。しかし実際に行ってみると、最初の2年間に200羽近く生まれた仔ウサギは全て正常ウサギばかり、という苦しい時期を経験した。その後、ウサギの遺伝子改変の専門の先生方と共同研究し、BACの純度を高める努力を繰り返した。その結果、3年後にやっと80羽生まれた中の12羽が変異遺伝子陽性であることがわかった<sup>2)</sup>。網膜電図 (ERG) でこれらのウサギの網膜変性の速度を調べた結果、#7のTgウサギの網膜変性が最も重度で変性速度も速かった。そこで、以後の研究は主にこの#7のラインのTgウサギを用いて行った (図2A)。

3. Tgウサギの特徴と組織学的検査の結果

Tgウサギの眼底は野生型ウサギと比べて特に目立った違いはみられなかった。これについては、我々が白色のNZWウサギを用いたために眼底に色素沈着が現れなかつ

たのではないかと推定された。しかし、網膜の組織切片を光学顕微鏡所見を調べてみると、生後6週以降ではTgウサギの外顆粒層の核数は徐々に減少し、生後48週ではわずかに1層の外顆粒層が残るのみであった<sup>2)</sup>。一方でこの時期においても網膜内層の構造は比較的良好に保たれており、我々の作製したTgウサギはRP患者と同様に進行性の視細胞変性をおこなっていることが確認された。さらに、免疫組織学的検査により、我々の作製したTgウサギの視細胞変性が杆体優位であることも証明された。

電子顕微鏡で網膜を観察すると、Tgウサギの網膜では視細胞間が多量の沈着物で占められていた。拡大率を上げて観察すると、Tgウサギでは視細胞の内節から直径50-300 nmの小胞 (vesicle) が多量に発生しており、これが視細胞間を満たして沈着物を形成していることがわかった。ロドプシンのC末端付近はロドプシンの細胞内の輸送に関与していることから、ロドプシンC末端付近の変異を有する異常なロドプシン蛋白は外節に輸送されずに蓄積し、その結果内節から放出されて多量のvesicleが蓄積されて変性を起こしていると推定された<sup>2)</sup>。

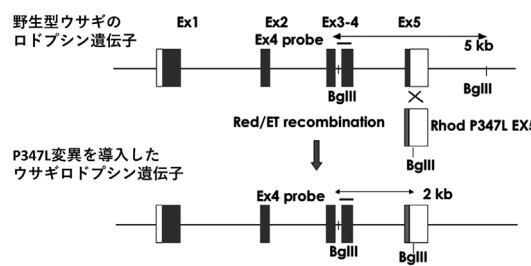


図1. ウサギのロドプシン遺伝子の改変

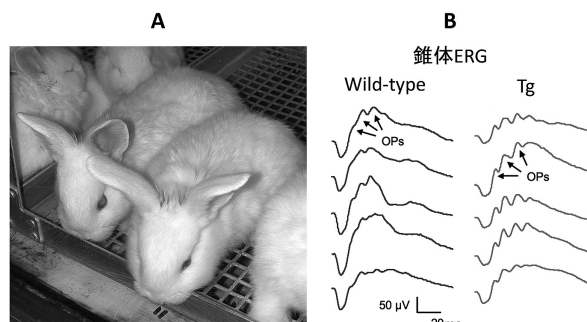


図2. (A) 生まれてきたTgウサギ。  
(B) Tgウサギでは、錐体ERGの律動様小波 (OPs) の振幅が正常ウサギより大きいという興味深い所見が観察された。

#### 4. TgウサギのERGの特徴

続いて我々は、Tgウサギの網膜電図(ERG)を研究した<sup>3)</sup>。野生型ウサギでは週齢に伴うERGの変化はほとんどみられなかった。これに対してTgウサギでは、生後12週の段階で既に杆体系のERG反応は明らかに野生型ウサギのそれよりも小さく、週齢が進むにつれてERGの振幅はさらに低下することがわかった。TgウサギのERGの異常は杆体系ERGでより明らかであり、錐体系ERGの振幅は48週の時点でも比較的保たれていた。

今回我々が作製したTgウサギのERG研究で最も興味深かった点は、若年期における錐体ERGの律動様小波(OPs)の増大であった。ちなみに、ERGの成分の中にOPsという高周波数の成分が存在し、この成分が糖尿病網膜症などの特定の網膜疾患で選択的に減少することを見出したのは金沢大学眼科の米村、河崎らの傑出した業績である。このOPsを生後12週のウサギから記録すると、TgウサギOPsはよく保たれているだけではなく、その振幅は野生型ウサギよりもむしろ大きくなっていることがわかった(図2B)。

実は我々は、実際のRP患者の黄斑部から記録した局所ERGにおいて、OPsが正常より増大している患者がいることを既に報告していた<sup>4)</sup>。視力が良好なRP患者から黄斑部局所ERGを記録した結果、RP患者のOPsは正常者の67%も保存されており、a波(39%)やb波(46%)よりも有意に保存されていることがわかった。また、b波の振幅が正常者の下限以下でありながらOPsの振幅が正常範囲内であったRP患者は10名(26%)もみられた。さらに、OPsの振幅が正常者39名の上限を上回っていた(super-normal) RP患者が1名みられた。このRP患者が正常より大きなOPsを示した機序として、この時点で我々は、網膜外層の機能低下を代償しようとする網膜内層の二次的变化(remodeling)が関与しているのではないかと予想していた。

#### 5. TgウサギERGの薬理学的研究

上述したように、我々はRP患者の黄斑部局所ERGおよびロドプシンTgウサギのERGにおいてOPsが正常よりも大きくなる現象を報告したが、この増大現象の機序については不明のままであった。その後我々は、種々の薬物を眼内に作用させて網膜内のシナプスや細胞を遮断あるいは不活化させてERGを観察した。その結果、網膜内にテトロドトキシンを注入し、網膜内層のスパイク性ニューロンを抑制すると、Tgの増大したOPsが大きく減弱すること、つまりTgウサギの視細胞の変性早期にOPsの振幅が増大する起源として、網膜内層のスパイク性ニューロンの活動が関与していることを発見した<sup>3)</sup>。その後我々は米国の研究者と共同研究を行い、Tgウサギの網膜内において様々な内層ニューロンのリモデリングが起きており、これがOPs増大の原因となっている可能性を報告している<sup>5)</sup>。

#### 6. 視細胞が変性している網膜ではERGの起源が変わる

RPでは視細胞が徐々に変性する。このような状態から記録したERG成分の起源は、正常なウサギ網膜のERG起源と本当に同じであろうかと我々は考えた。そこで、Tgウサギの網膜にAPBやPDAを作用させてON型双極細胞やOFF型双極細胞を遮断した状態でERGを記録して正常ウサギと比較した。その結果、錐体ERGのa波は正

常では錐体視細胞とOFF型双極細胞が主な起源であるが、RPの変性が進行するほど錐体視細胞の割合は小さくなり、変性が進行した段階のTgウサギでは、錐体ERGA波のほとんどがOFF型双極細胞に起源を有することを我々は発見した<sup>6)</sup>。つまり、変性した網膜から記録するERGの細胞起源は、正常のそれと大きく異なる可能性があることを我々は見出したのである。

#### 7. RPの新規治療法への応用

我々の作成したTgウサギは、ヒトとほぼ同じ大きさの眼球を有し、繰り返し手術操作や眼内注射が可能である。また網膜変性の進行速度が比較的遅く、実際の患者の変性過程に非常によく類似している。このような特性を利用し、我々のTgウサギは現在RPに対する様々な新規治療法の開発や臨床試験の予備実験に使用されている。例えば、日本で独自に開発された人工網膜(人工眼)の開発および電気刺激による網膜変性抑制の実験に我々のTgウサギが使用された<sup>7)</sup>。さらに、本邦で新しく開発されたRPに対する治療薬<sup>8)</sup>や神経栄養因子の徐放治療の有効性実験<sup>9)</sup>にも使用された。また、現在海外では常染色体優性遺伝のRPに対する遺伝子治療の実験に我々のウサギが用いられている。

#### 8. おわりに

世界で初めてRPのモデルウサギを作り、それを使用して眼の難病に関する様々な病態生理学的な知見を得ることができた。さらにこのRPウサギは、国内および国外でRPに対する新たな治療法の開発に現在も使用されている。今後もさらに、独創性のある研究成果により眼の難病の治療に向けて努力を重ねていきたいと考えている。

#### 文 献

- 1) Acland GM, Aguirre GD, et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 28: 92-95, 2001.
- 2) Kondo M, Sakai T, et al. Generation of a transgenic rabbit model of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 1371-1377, 2009.
- 3) Sakai T, Kondo M, et al. Supernormal ERG oscillatory potentials in transgenic rabbit with rhodopsin P347L mutation and retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 4402-4409, 2009.
- 4) Ikenoya K, Kondo M, et al. Preservation of macular oscillatory potentials in eyes of patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 3312-3317, 2007.
- 5) Jones BW, Kondo M, et al. Retinal remodeling in the Tg P347L rabbit, a large-eye model of retinal degeneration. *J Comp Neurol* 519: 2713-2733, 2011.
- 6) Hirota R, Kondo M, et al. Photoreceptor and post-photoreceptor contributions to photopic ERG a-wave in rhodopsin P347L transgenic rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53: 1467-1472, 2012.
- 7) Morimoto T, Kanda H, et al. Transcorneal electrical stimulation promotes survival of photoreceptors and improves retinal function in rhodopsin P347L transgenic rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53: 4254-4261, 2012.
- 8) Hasegawa T, Muraoka Y, et al. Neuroprotective efficacies by KUS121, a VCP modulator, on animal models of retinal degeneration. *Sci Rep* 6: 31184, 2016.
- 9) Nagai N, Koyanagi E, et al. Long-Term protection of genetically ablated rabbit retinal degeneration by sustained transscleral unoprostone delivery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57: 6527-6538, 2016