

博士論文

Prominin-1 遺伝子変異マウスを用いた
網膜色素変性症発症機序の解明

重定 直弥

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス領域（発生医科学研究室）
（笹井 紀明 准教授）

令和 5 年 9 月 13 日提出

目次

略語	4
序論	5
(1) 網膜色素変性症の病態と治療法開発の現状	
(2) 網膜組織と網膜色素変性症	
(3) Prominin-1 と網膜色素変性症の関連	
(4) 本研究の目的	
材料と方法	9
(1) 実験動物	
(2) マウスの遺伝子型の同定	
(3) マウスへの光刺激	
(4) 単一細胞遺伝子発現解析 (Single-cell RNA sequencing)	
(5) 投与液の調製	
(6) 硝子体内投与	
(7) 染色・観察	
(8) 定量 RT-PCR	
(9) NADH/NAD ⁺ 測定	
(10) 網膜電図 (ERG) 測定	
(11) 統計解析	
結果	15
(1) 生後 11 日齢の <i>Prom1</i> KO マウス網膜は光刺激に感受性を示す	
(2) Single-cell RNA sequencing によって、光刺激を受けた <i>Prom1</i> KO 網膜にて発現量が変化する遺伝子および細胞種を同定した	
(3) <i>Prom1</i> KO マウスの視細胞内節において IGF シグナルの減弱が認められる	
(4) AAV_IGF1 の硝子体内投与により、視細胞の細胞死が抑制される	
(5) <i>Prom1</i> KO 網膜において、エンドセリン受容体阻害剤と AAV_IGF1 を共導入することにより、強い網膜保護作用を示す	
考察	21
(1) Single-cell RNA sequencing により、光依存的に応答する細胞と発現量が変化する遺伝子が新たに同定できた	
(2) 網膜において IGF シグナルは視細胞保護に有用である	
(3) 網膜において IGF1 はエンドセリンシグナル阻害と独立して働き、網膜保護	

効果を示す

(4) 網膜色素変性症治療法としての有用性

謝辞・・ 27

参考文献・・ 28

図・・ 35

表・・ 68

略語

AAV : Adeno-associated virus
ATP : Adenosine tri-phosphate
Bcl3 : B-cell/CLL lymphoma-3
cGMP : Cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate
DMSO : Dimethyl sulfoxide
Edn2 : Endothelin-2
ERG : Electroretinogram
Egr-1 : Early growth response protein-1
FDA : Food and drug administration
GFAP : Glial fibrillary acidic protein
GFP : Green fluorescent protein
HEK293 : Human embryonic kidney cells 293
IGF1 : Insulin-like growth factor1
iPS : Induced pluripotent stem
KO : Knock-out
mTOR : Mammalian/mechanistic target of rapamycin
NAD⁺ : Nicotinamide adenine dinucleotide
Pde6b : Phosphodiesterase 6B
PKM 1/2 : Pyruvate kinase M1/2
Prom1 : Prominin-1
pS6^{235/236} : Phospho-S6 ribosomal protein (Ser235/236)
pS6^{240/244} : Phospho-S6 ribosomal protein (Ser240/244)
QOL : Quality of life
RP : Retinitis pigmentosa
RPE : Retinal pigment epithelium
RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction
scRNA-seq : Single-cell RNA sequencing
t-SNE : t-Distributed stochastic neighbor embedding
TUNEL : TdT mediated dUTP nick end labeling
UMI : Unique molecular identifier
WT : Wild-type

序論

(1) 網膜色素変性症の病態と治療法開発の現状

網膜色素変性症は網膜組織中の視細胞および網膜色素上皮細胞の広範な変性により、視機能が低下する遺伝性の眼疾患である (Liu et al., 2022)。多くの症例において出生直後には明確な症状を認めないが、一般に 10 代ごろから徐々に夜盲 (夜に目が見えづらくなる) や視野狭窄 (視野が狭くなる) などの視覚障害が見られ、40 代以降には後期症状として社会的失明状態 (矯正視力が 0.1 以下) に陥る (図 1)。人間は日常生活を送る上で必要な情報の 80%以上を視覚から獲得しており、視覚情報の欠如は罹患者の生活の質 (Quality of life : QOL) を大きく損なうことにつながる (Hamel et al., 2006)。網膜色素変性症の発症頻度は約 4,000 人に 1 人 (Hartong et al., 2006) であり、緑内障に次いで本邦における視覚障害原因の第 2 位 (図 2) (Morizane et al., 2019) である。網膜色素変性症の治療法としては、これまでに再生医療、遺伝子治療、人工網膜使用など様々な方法が研究されているものの、その多くは未だ開発段階であり、確立された治療法は存在しない。したがって、網膜色素変性症は厚生労働省の指定難病の 1 つになっている (<https://www.nanbyou.or.jp/entry/196>)。

治療方法の確立が困難な要因としては、発症原因となる遺伝子が 90 種類以上報告されており (Verbakel et al., 2018)、かつこれらがコードするタンパク質は膜タンパク質、核内因子、代謝関連因子など多岐にわたるため (Ferrari et al., 2011)、標的遺伝子が絞りづらいことや病態進行には 2 種類の視細胞 (桿体細胞と錐体細胞) を含む多くの細胞種が関与しており (Milam et al., 1995)、詳細な病態理解が難しいことが挙げられる。また、網膜色素変性症の遺伝形式は常染色体劣性遺伝型が最も多く全体の約 35%を占めるが、家族性の遺伝を明確に認める症例は約半数であり、残りの半数は原因遺伝子や遺伝背景が特定できない孤発例であることも治療法開発を困難とする要因の 1 つである (Hayakawa et al., 1993; Hayakawa et al., 1997)。

(2) 網膜組織と網膜色素変性症

眼球は外側から強膜、脈絡膜、網膜の 3 層構造から成る球状器官である (図 3A)。網膜は眼球壁の最内側に存在し、眼球内面の 2/3 を覆う約 100~400 μm の薄い膜状組織であり、9 層の透明な感覚網膜 (内側から内境界膜、神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層、外網状層、外顆粒層、外境界膜、視細胞層) と最外層の不透明な 1 層の網膜色素上皮細胞層から構成される (図 3B) (Hoon et al., 2014)。内顆粒層には水平細胞、アマクリン細胞、双極細胞などの神経細胞の核、外顆粒層には桿体細胞と錐体細胞の 2 種類の視細胞の核が含まれるほか、網膜表層に位置する神経節細胞、網膜を貫くように存在するミュラー細胞、網膜を基底膜として支える網膜色素上皮細胞などが網膜を構成する細胞として知られている (図 3C) (Grigoryan et al.,

2022)。

なかでも視力の維持に重要な役割を果たす細胞が外界から入射した光シグナルを最初に神経情報へと変換する視細胞である。視細胞には光の明暗を感じる桿体細胞と、色覚を感じる錐体細胞が存在し、それぞれ Rhodopsin (桿体細胞) と long, middle, short-Opsin (l-, m-, s-Opsin; 錐体細胞) の G タンパク質共役受容体はその役割を分担している。光シグナルはこれらの膜タンパク質によって電気信号に変換された後、水平細胞、アマクリン細胞、双極細胞を介して神経節細胞へとリレーされ、大脳視覚野へと投射される。

また、視細胞は細長い細胞構造を有し、軸索のほか、核、内節 (ミトコンドリアを多く含む)、外節 (ディスクと呼ばれる膜構造を多く含む) から構成されており、外節部はさらにその外側の網膜色素上皮細胞と隣接する (図 4)。外節構造は日々代謝されており、ディスクが内節・外節境界で形成される一方、老弊したディスクが外節から切り離され、網膜色素上皮細胞にファゴサイトーシスにより取り込まれ、分解される。

網膜色素変性症の初期病態では桿体細胞において異常を生じる例が多く、初期症状として夜盲症が認められるのは、桿体細胞が機能不全に陥り、光感知が困難になるためである。また網膜色素上皮細胞が機能不全に陥ることも知られており、これらの例では視細胞から切り離されたディスクが網膜色素上皮細胞にて正常に処理できなくなり、結果的に網膜色素上皮細胞下にドルーゼンと呼ばれる老廃物が蓄積される。このように網膜色素変性症は、光を感知する最初の細胞である視細胞または網膜色素上皮細胞に異常が生じ、外界からの光受容が不能になる疾患である (図 5) (Ikelle et al., 2020)。

(3) Prominin-1 と網膜色素変性症との関連

Prominin-1 (Prom1; CD133) は 5 回膜貫通型の膜タンパク質であり (図 6) (Corbeil et al., 2000; Miraglia et al., 1997; Yin et al., 1997)、組織レベルでは網膜、腎臓、精巣に高い発現が認められている (Fargeas et al., 2004; Zhu et al., 2009)。Prom1 は他のタンパク質との相同性が低く、詳細な Prom1 の機能については解明されていないものの、先行研究において Prom1 を *in vitro* にて強制発現させると細胞に突起構造が多数認められたことから、Prom1 が細胞の膜構造や形態形成に関与すること、およびカルボキシル末端を欠損した Prom1 の変異タンパク質の遺伝子導入検討により Prom1 の 5 回目の膜貫通ドメインの直下に位置するアミノ酸が本活性に必要であることが明らかにされている (Hori et al., 2019)。また、網膜組織では視細胞および網膜色素上皮細胞において発現が見られ (Maw et al., 2004; Bhattacharya et al., 2017; Kobayashi, et al., 2021)、なかでも桿体細胞の内節・外節間の膜突出部分に多く局在していることから、Prom1 は網膜組織において視細胞外節の突出膜およびディスク形成に関与すると考えられる (Maw et al., 2004; Zacchigna et al., 2009)。

ヒト臨床においては、これまでに家族性の網膜色素変性症患者のゲノム解析により *Prom1* 遺伝子変異が認められているため、*Prom1* は網膜色素変性症の原因遺伝子の 1 つ (Retinitis Pigmentosa41 : RP41) として認識されている (Cehajic-Kapetanovic et al., 2019)。また *Prom1* 遺伝子変異の多くはコーディング領域内に認められ、結果として *Prom1* タンパク質のカルボキシル末端が欠損する例が多いことが明らかとなっている (Permanyer et al., 2010)。

Prom1 の遺伝子変異マウス (ノックアウト (KO) マウス) はヒトの網膜色素変性症の病態を模倣するモデルである。これまでに *Prom1* KO マウスでは、本来視細胞外節に局在する Rhodopsin および Opsin が正常に外節に貯留されず、視細胞内節および外顆粒層に滞留していることが報告されている (Zacchigna et al., 2009; Dellett et al., 2015)。また、*Prom1* KO マウスの網膜組織構造を透過型電子顕微鏡を用いて観察したところ、視細胞外節の形態に乱れが生じていることが明らかにされており (Dellett et al., 2015)、*Prom1* KO 網膜では視細胞外節の機能・構造を維持できなくなるにより網膜障害が誘導されることが示唆される。一方で *Prom1* KO マウスでは網膜の発生には異常をきたさず (Nishide et al., 2009)、開眼と同時に視細胞死に伴う外顆粒層の脱落やグリア細胞の異常な活性化 (グリオシス) などの組織学的な変化および網膜の機能障害が認められることが報告されている (Dellett et al., 2015; Kobayashi et al., 2021)。さらに、*Prom1* KO マウスを光の当たらない常暗下で飼育した場合、通常の明暗サイクル下で飼育した *Prom1* KO マウスと比較して網膜障害の進行が緩和されることから、*Prom1* KO マウスの網膜障害発症には光刺激が関与していることが示唆されている (Dellett et al., 2015)。

(4) 本研究の目的

Prom1 KO マウスにて認められる網膜障害は光刺激によって進行が誘発されることから、本マウスは網膜色素変性症の病態初期に共通して生じる一次的な変化を研究するにあたり最適な動物モデルである。したがって、*Prom1* KO マウスを用いた網膜障害発症機序解析は網膜色素変性症の原因遺伝子に依存しない疾患進行の分子メカニズム解明に迫るものであり、汎用性の高い網膜色素変性症治療法の開発につながることを期待された。また、これまでに *Prom1* KO マウスにおける網膜障害が発生する端緒にてエンドセリンが分泌されることが明らかとなっており、エンドセリン受容体アンタゴニストの全身投与によってグリオシスの改善および視細胞の細胞死抑制効果が認められたことから (Kobayashi et al., 2021)、エンドセリンシグナルの阻害は網膜色素変性症の初期症状に対する治療として有用である可能性が示唆されている。一方で網膜障害が発症・進行する際の他のシグナルに関しては不明であり、より効率的な薬効発現にはさらなる病態の理解が必要不可欠であると考えられた。

そこで本研究では、網膜色素変性症の発症・進展のメカニズム解明を目的に、開眼前の *Prom1* KO マウスに光刺激を強制的に与え網膜障害を人工的に誘導した後、網

膜組織から細胞を単離し、単一細胞遺伝子発現解析 (Single-cell RNA sequencing; scRNA-seq) を実施した。網膜色素変性症モデルを用いた scRNA-seq としては近年 rd10 マウス (桿体細胞中の cGMP 特異的な分解酵素の構成サブユニット Phosphodiesterase 6 β をコードする遺伝子 *Phosphodiesterase 6B (Pde6b)* の変異を有するモデル動物) を用いた障害進行期における遺伝子発現解析などが報告されており (Karademir et al., 2022)、網膜疾患の病態解明において本手法が有用であることが示唆される。本研究では特に網膜障害の発症初期に着目し、scRNA-seq により各遺伝子の発現変化が網膜組織中のどの細胞種で生じるのかを同定し、治療の標的因子を選定した。さらに、本因子と *Prom1* KO 網膜における障害進行との関連を検討するとともに、眼内投与ツールとしてアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて網膜組織における持続的な遺伝子発現による薬効評価を実施した。そして、一層効果的な治療法の開発を目指し、AAV ベクターによる持続的な遺伝子導入とエンドセリン受容体アンタゴニストの硝子体内投与による局所的なエンドセリンシグナル阻害を組み合わせることにより、さらなる網膜保護効果の顕在化・増強を試みた。

材料と方法

(1) 実験動物

すべての動物実験は、奈良先端科学技術大学院大学の動物福祉および倫理審査委員会と施設内動物管理委員会の承認を受けたガイドラインに従って実施した。*Prom1* KO マウスは、理化学研究所、発生・再生科学総合研究センターで樹立された系統を使用した (Nishide et al., 2009) (CDB0623K, <http://www2.clst.riken.jp/arg/methods.html>)。この変異マウスは *Prom1* 遺伝子座に *LacZ* 遺伝子がノックインされており、C57BL/6 系統にて維持された。また、マウスは本学の SPF 施設および SPF P2A 施設において 12 時間の明暗サイクル下にて飼育した。

(2) マウスの遺伝子型の同定

マウスの個体はイヤープンチを用いて識別した。遺伝子型同定用サンプルはマウスの尾を 2-3 mm 程度切断し、採取した。Genome Lysis Buffer (50 mM Tris/pH 8.0, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% SDS) に尾サンプルに加え、20 µg/mL にて Proteinase K Solution (Wako) を添加した後、Bio Shaker (TAITEC ;M.BR-022UP) を用いて、55°C/500 r/min で攪拌インキュベートした。8 時間以上攪拌インキュベートし、完全に溶解させた後、等量の Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (ニッポンジーン) を加え、10 秒間ボルテックスミキサー (エムエス機器) にて攪拌した後、微量高速冷却遠心機 (トミー工業 : MX-100) を用いて 15 000 rpm にて 2 分間遠心を行った。水層 (上層) 部分を新しい 1.5 mL チューブに移し、等量の Chloroform (ナカライテスク) を加え、10 秒間ボルテックスミキサーにて攪拌した後、15000 rpm にて 2 分間遠心を行った。その後、水層 (上層) 部分を新しい 1.5 mL チューブに移し、DNA 抽出サンプル溶液とした。

PCR 反応液 は EmeraldAmp PCR Master Mix (TaKaRa) 、プライマー3種 (表 1A)、精製水、DNA 抽出サンプル溶液を用いて調製し、PCR 反応を TGRADIENT96 Thermocycler (Biometra) を用いて実施した (表 1B)。

PCR 後のサンプルは 1%アガロースゲルを用いて電気泳動を実施し、250 bp のバンドを野生型、600 bp のバンドを変異型と判断した。

(3) マウスへの光刺激

生後 11 日齢のマウスの眼の眼瞼癒着部分をハサミを用いて強制的に開眼させた。その後、ミドリン P 点眼液 (参天製薬) を光刺激 10 分前から 2-3 分おきに点眼し、散瞳状態にて、LED ライト (HOZAN : L-703) を用いて 15,000 lux (DIGITAL LUX METER : LX-1010B にて測定) の光照射を 3 時間実施した (図 7)。なお、光照射中も 1 時間に 1 度ミドリン P 点眼液を点眼し、散瞳状態を維持させた。実験に使用す

る動物は出産直後から光刺激処置前まで、および光刺激処置後 1 日間もしくは 7 日間、光曝露させないために飼育室内の飼育棚をアルミホイルで覆い、暗所飼育とした。

(4) 単一細胞遺伝子発現解析 (Single-cell RNA sequencing; scRNA-seq)

1. 評価動物の準備

同一の雌マウスから生まれた雄の *Prom1* KO マウス 2 匹のうち、1 匹について 11 日齢時に (3) の手順に従い、光刺激を実施した (KO Light)。光刺激を実施しないマウスは出生後から暗室下にて飼育し (KO Dark)、共に 12 日齢時に安楽殺を行い、scRNA-seq の解析サンプルとした。

2. 網膜細胞の単離・シングルセル懸濁液の調製

眼球摘出後速やかに氷冷した Leibovitz's L-15 Medium (Wako) 中で網膜組織を採取し、Papain Dissociation System (Worthington Biochemical) を用いて、網膜細胞を単離した (Feodorova et al., 2015)。なお、Papain 処置時は 37°C の水浴中 (ASONE : THERMO MAX TM-3) にて 15 分間振盪インキュベートを行った。単離した網膜細胞は 0.04% BSA (Wako) /PBS (Wako) にて懸濁し、セルストレイナー (BD Biosciences) を複数回通すことで、シングルセル懸濁液を調製した。

3. RNA sequencing

細胞懸濁液中の細胞濃度および生存率を 0.4 w/v% トリパンブルー溶液 (Wako) を用いて染色後に Countess 自動セルカウンター (Thermo Fisher Scientific) を用いて計測した。単離した細胞懸濁液を 1.0×10^3 cells/ μ L に調製し、Chromium Next GEM Single Cell 5' Kit v2 (10X Genomics)、次世代シーケンサー (Illumina : NovaSeq 6000) およびシングルセル解析装置 (10X Genomics : Chromium™ Controller) を用いて scRNA-seq 実施した。データは Cell Ranger 6.0.0 (10X Genomics) を用いた解析および Loupe Browser 6 (10X Genomics) を用いた視覚化により評価した。なお、各サンプルの細胞懸濁液は scRNA-seq の実施基準を満たしており (表 2)、得られたデータの検出細胞数は想定した細胞数 (約 1.0×10^4 cells) と概ね合致していることを確認した (表 3)。

4. Low-quality データの除外

得られたデータを 10X Genomics 社の基準に従い、(A) 細胞ごとにラベルされている Unique Molecular Identifier (UMI) が 1000 以下の細胞 (細胞が弱っており、遺伝子増幅においてバイアスがかかっている)、(B) 検出遺伝子コピー数が 256 以下の細胞 (検出遺伝子が少なく、特定の遺伝子のみが増幅されている)、(C) ミトコンドリア由来の遺伝子が検出遺伝子の 10% 以上を占める細胞 (核由来の遺伝子の発現量が正確に定量できていない) を Low-quality として除外し (図 8)、再度クラスタリングを実施した。Low-quality データの除外は (A) → (B) → (C) の順に実施し、(A) 実施

時点で KO Dark では 582 細胞、KO Light では 673 細胞を除外、(B) 実施時点で KO Dark では 586 細胞、KO Light では 695 細胞を除外、(C) 実施時点の Low-quality データ除外完了時には KO Dark では 596 細胞、KO Light では 704 細胞を除外した。最終的な除外細胞の割合は KO Dark、KO Light 共に 5.8% (KO Dark : 596/10311 細胞、KO Light : 704/12091 細胞) であった。

5. アノテーション

網膜組織中の 11 種類の細胞種 (桿体細胞、錐体細胞、アマクリン細胞、双極細胞、血管内皮細胞、水平細胞、網膜色素上皮細胞、ミュラー細胞、ミクログリア、アストロサイト、神経節細胞) に対し、細胞種ごとに複数のマーカー遺伝子を選定し (表 4) (Pauly et al., 2019; Zarkada et al., 2021)、各マーカー遺伝子の発現レベルを可視化することで (図 9)、Low-quality データ除外後の scRNA-seq データのアノテーションを実施した。なお、分類できなかった細胞の割合は KO Dark、KO Light 共に 6.1% (KO Dark : 593/9715 細胞、KO Light : 700/11387 細胞) であった。

(5) 投与液の調製

1. AAV ベクター

ヒト胎児由来腎細胞株 (Human Embryonic Kidney cells 293 : HEK293) に pAAV-EGFP (Addgene #32395) または pAAV-IGF1 を導入し、AAVpro® Purification Kit Midi (TaKaRa) を用いて抽出・濃縮した。なお、AAV ベクターの調製は研究室の鹿田直哉氏に依頼した。

2. エンドセリン受容体阻害剤 (ボセンタン)

クリーンベンチ内にてボセンタン一水和物 (東京化成工業) を DMSO (Wako) を用いて溶解させ、10 mg/mL 溶液を調製した。

3. IGF1 (リコンビナントタンパク)

クリーンベンチ内にて IGF1 (PeproTech) を PBS (Wako) を用いて溶解させ、1 mg/mL 溶液を調製した。

(6) 硝子体内投与

ミドリン P 点眼液を全身麻酔 10 分前から 2-3 分おきに点眼し、十分に散瞳させた後、本学の動物実験施設に調製を依頼した三種混合麻酔薬 (0.75 mg/kg 塩酸メデトミジン (日本全薬工業)、4 mg/kg ミタゾラム (サンド)、5 mg/kg 酒石酸ブトルフェノール (Meiji Seika ファルマ) /生理食塩液 (大塚製薬工場)) を 26G 針 (テルモ) と 1 mL シリンジ (テルモ) を用いてマウス体重 10g あたり 100 μ L を腹腔内投与し、全身麻酔を施した。さらにベノキシール点眼液 0.4% (参天製薬) を 1-2 滴点眼し、眼局所麻酔を行った後、クラビット点眼液 0.5% (参天製薬) を 1-2 滴点眼し、投与部位

周辺の抗菌処置を実施した。麻酔が十分に作用していることを確認後、ガスタイトシリンジ（ハミルトン）と 35G 針（斎藤医療器械）を用いて強膜部から鋭角に針を侵入させ、目視にて眼内を確認しながら硝子体内に 1 μ L/eye にて投与した（図 10）。投与後は投与部位を軽くピンセットで圧迫した後、タリビッド眼軟膏 0.3%（参天製薬）を塗布し、本学の動物実験施設に調製を依頼したメデトミジン拮抗薬（0.75 mg/kg 塩酸アチバメゾール（日本全薬工業）/生理食塩液）を 26G 針と 1 mL シリンジを用いてマウス体重 10g あたり 100 μ L を腹腔内投与した後、覚醒まで 37°C に保温したプレート上に静置した。なお投与に際し、ヒアレイン点眼液 0.1%（参天製薬）を適宜点眼し、眼表面の乾燥を防止した。

(7) 染色・観察

1. 組織固定・凍結切片作製

眼球摘出後速やかに 4% Paraformaldehyde (Wako) に浸漬し、4°C で 30 分間回転インキュベートした。その後角膜および水晶体を摘出し、再度 4% Paraformaldehyde に浸漬後、4°C で 1 時間回転インキュベートした。固定後のサンプルは 15% Sucrose (Wako) 溶液に浸漬し、4°C で一晩回転インキュベートした。採取したサンプルは O.C.T.コンパウンド（サクラファインテック）で満たした Tissue-Tek® Cryomold® 1 号（サクラファインテック）に埋め込み、ドライアイスを用いて凍結ブロックを作製した。切片は凍結ブロックを Tissue-Tek® Polar® Cryostat/Microtome（サクラ精機）を用いて厚さ 10-12 μ m 間隔で切り出し、作製した。

2. 抗体染色

凍結切片スライドを PBS に浸漬させ室温にて 5 分間振盪インキュベートを行う操作を 2 回繰り返すことで、O.C.T.コンパウンドを除去した。次に 1% BSA/PBST (PBS/0.1% TritonX-100 (ナカライテスク) /1% BSA) を添加し、室温にて 90 分間静置しブロッキングを行った。その後一次抗体（表 5A、一次抗体/1% BSA/PBST/10% NaN_3 ）を添加し、4 °C で一晩インキュベートを行った。反応後 0.1% PBST (PBS/10% TritonX-100) に浸漬させ、室温にて 5 分間振盪インキュベートを行う操作を 3 回繰り返すことで切片スライドを洗浄した。次に、二次抗体（表 5B、二次抗体/1% BSA/PBST/10% NaN_3 /0.1% DAPI（ナカライテスク））を添加し、遮光下・室温にて 2 時間静置した。再び 0.1% PBST を用いて室温にて 5 分間振盪インキュベートを行い、本操作を 2 回繰り返すことで切片スライドを洗浄した後、Microscopy Glycerol (Roche) を添加し、カバーガラスを被せて封入した。なお IGF1 および pAKT を染色する際には、染色前に Citric Acid Based Antigen Unmasking Solution (Vector Laboratories) を用いて、切片スライドの賦活化処理（105°C、15 分）を実施した。

3. TUNEL assay

凍結切片スライドを PBS に浸漬させ室温にて 5 分間振盪インキュベートを行う操作

を2回繰り返すことで、O.C.T.コンパウンドを除去した。次に抗原の賦活化のため0.1 Mクエン酸 (Wako) を添加し、2分間室温で静置した後、PBSを用いて室温にて5分間振盪インキュベートを行い、本操作を2回繰り返すことで切片スライドを洗浄した。その後、Apop Tag Reaction buffer (Merck)、TdT reaction buffer (Roche) 、1 mM CoCl₂ (Roche) およびTerminal Transferase recombinant (Roche) を添加し、37°Cで1時間静置した。PBSを用いて室温にて5分間振盪インキュベートを行い、本操作を2回繰り返すことで切片スライドを洗浄した後、 α Digoxin Cy3/PBS/1% BSA/ 0.1% DAPIを添加し遮光下・室温にて2時間静置した。再び0.1% PBSTを用いて室温にて5分間振盪インキュベートを行い、本操作を2回繰り返すことで切片スライドを洗浄した後、Microscopy Glycerolを添加し、カバーガラスを被せて封入した。

4. 観察

共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss : LSM-980) を用いて、観察・写真撮影を行った。

(8) 定量 RT-PCR

眼球摘出後速やかに PBS 中にて網膜組織を採取し、RLT Lysis Buffer に溶解させた後、NucleoSpin RNA (MACHEREY-NAGEL) を用いて RNA 抽出を実施した。得られた RNA サンプルから PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio) を用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型とし、KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS) と各プライマー (表 6A) を用いて、CFX Connect™ Real-Time System (BIO-RAD) にて PCR 反応を実施した (表 6B)。

(9) NADH/NAD⁺ 測定

CycLex NAD⁺/NADH Colorimetric Assay Kit (MBL) を用いて、網膜組織中の NAD⁺および NADH を測定した。なお測定はプロトコルに従いサンプルを調製した後、450 nm の吸光度測定を iMark microplate reader (Bio-Rad) を用いて実施した。また、各サンプルのタンパク濃度をプロテインアッセイ CBB 溶液 (ナカライテスク) を用いて、595 nm の吸光度を測定することで定量し、各サンプルのタンパク濃度にて補正を行った。

(10) 網膜電図 (ERG) 測定

ERG 測定前に 1 時間以上暗室にてマウスを飼育し、暗順応を行った。以下の操作は暗室・赤色灯下にて実施した。ミドリン P 点眼液を全身麻酔 10 分前から 2-3 分おきに点眼し、十分に散瞳させた後、本学の動物実験施設に調製を依頼した三種混合麻酔薬を 26G 針と 1 mL シリンジを用いてマウス体重 10g あたり 100 μ L を腹腔内投与し、全身麻酔を施した。ベノキシール点眼液 0.4% を 1-2 滴点眼し、眼局所麻酔を行った後、ノイズキャンセルマットの上にマウスを静置し、マウスの尾と鼻に針型電

極を装着した（図 11A）。その後、電極を眼球表面に接着させ（図 11A'）、ノイズレベルが低いことを確認した上で赤色光を消し、小動物用全視野光刺激装置（メイヨー：RMG No.1）、LED Visual Stimulator（メイヨー：LS-200）および筋電図・誘発電位検査装置（日本光電：MEB-9600 Neuropack S3）を用いて測定を実施した（図 11B、表 7）。測定中はホットプレートによる体温管理およびヒアレイン点眼液 0.1%による眼表面の乾燥防止を行った。その後、本学の動物実験施設に調製を依頼したメドトミジン拮抗薬を 26G 針と 1 mL シリンジを用いてマウス体重 10g あたり 100 μ L を腹腔内投与した後、覚醒まで 37°C に保温したプレート上に静置した。得られたデータは視覚誘発電位検査ソフトウェア（日本光電：QL-973B）を用いて解析し、a 波および b 波振幅を算出した。

(11) 統計解析

2 群間の統計解析では、両側 t 検定を実施した。

結果

(1) 生後 11 日齢の *Prom1* KO マウス網膜は光刺激に感受性を示す

以前の研究により、*Prom1* KO マウスの網膜障害は、マウスが開眼した直後から光刺激によって惹起されることが明らかとなっている (Dellett et al., 2015)。そこで、開眼前の生後 11 日齢のマウスに強制的に光刺激を与えることにより、人工的に網膜障害を誘導することができるのではないかと考えた。以前の報告では、開眼直後の 2 週齢程度まで、*Prom1* KO マウスで網膜障害が進行していないことが報告されているが (Dellett et al., 2015)、本研究では光刺激による影響のみを確実に評価するため、出生直後から光刺激処置まで光に曝露されないよう暗室下にて飼育を行った。

まず、生後 11 日齢の暗所飼育下・光刺激実施前のマウス網膜について、視細胞のマーカーである Rhodopsin および m-Op sin の抗体染色を行ったところ、Control として用いた *Prom1* ヘテロマウスでは視細胞外節に染色を認め、*Prom1* KO マウスにおいても Control と比較して遜色なく視細胞外節に発現が見られたことから (図 12)、*Prom1* KO マウスの網膜成熟には異常がなく、開眼前の網膜においてすでに正常な網膜組織構造が形成されていることが確認された。次に、光刺激による影響を評価するため、Control マウスおよび *Prom1* KO マウスをそれぞれ光刺激処置前に強制的に開眼させ、光刺激を行った後、1 日暗室下で飼育を継続し、その後速やかに眼球を摘出して網膜組織中における *Endothelin-2* (*Edn2*) および *B-cell/CLL lymphoma-3* (*Bcl3*) の mRNA 発現量を定量 RT-PCR により測定した。なお、*Edn2* および *Bcl3* は過去の Wild-type (WT) と *Prom1* KO マウスの網膜組織全体を用いた RNA sequencing の比較データより、*Prom1* KO マウスを通常飼育した際、網膜障害初期において顕著に発現増加を認める遺伝子として同定されている (Kobayashi et al., 2021)。その結果、Control 群では *Edn2*、*Bcl3* 共に光刺激による mRNA 発現量の変化は認められなかった (図 13)。また、光刺激処置を実施していない *Prom1* KO マウスについても、*Edn2* および *Bcl3* の mRNA 発現量に Control 群との差異は確認されなかった (図 13)。一方で、*Prom1* KO マウスに光刺激を与えた群では、光刺激処置を実施していない Control 群と比較し、*Edn2* では約 5 倍、*Bcl3* では約 11 倍の有意な発現量の増加が認められた (図 13)。よって、*Prom1* KO マウスの視細胞は生後 11 日目においてすでに光刺激に対し、十分な反応性を有することが明らかになった。

また、同様の光刺激を実施後、1 週間暗室にて飼育を続けた Control および *Prom1* KO マウスの網膜組織を用いて、Glial fibrillary acidic protein (GFAP) の抗体染色を実施したところ、Control マウスでは GFAP 染色像が神経節細胞層のみに局限しているのに対し、*Prom1* KO マウス網膜では神経節細胞層から外顆粒層にかけて広範なグリアの異常な活性化 (グリオース) が認められた (図 14)。*Prom1* KO マウスの網膜障害の表現型としてグリオースが生じることもこれまでに報告されていることから (Kobayashi et al., 2021)、本実験にて見出した光刺激条件により、

Prom1 KO マウスで認められる網膜障害と同様のシグナルを人工的に誘発できることが示唆された。

(2) Single-cell RNA sequencing によって、光刺激を受けた *Prom1* KO 網膜にて発現量が増加する遺伝子および細胞種を同定した

網膜障害の進行には網膜組織中に存在する多様な細胞が関与しており、網膜組織全体の解析では、症状が進行する際に影響を及ぼす細胞種の同定が困難である。そこで Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) を用いた単一細胞ごとの解析が有用であると考え、光刺激を受けない *Prom1* KO マウス (KO Dark) と前項の光刺激処置条件を用いて光刺激を与えた *Prom1* KO マウス (KO Light) を用意し、2 群間の遺伝子発現レベルを scRNA-seq により比較・検討することとした。なお、scRNA-seq に使用したサンプルの一部を用いて定量 RT-PCR により mRNA 発現量を測定したところ、KO Dark と比較して KO Light では *Edn2*、*Bcl3* および *Gfap* の発現増加が認められたことから (図 15)、本評価に用いた KO Light サンプルでは光刺激による網膜障害が想定通り誘導されていることが確認された。得られたデータはマーカー遺伝子の発現レベルに応じて (図 9、表 4)、11 種類の網膜組織中細胞 (桿体細胞、錐体細胞、アマクリン細胞、双極細胞、血管内皮細胞、網膜色素上皮細胞、ミュラー細胞、ミクログリア、アストロサイト、神経節細胞、水平細胞) に分類した (図 16)。

KO Dark と KO Light の各クラスター分布や細胞種の割合を比較したところ、桿体細胞および錐体細胞をはじめとするほぼ全ての細胞種において、そのクラスター分布に大きな変化は認められなかった (図 17A)。また網膜を構成する細胞種の Population を確認したところ、桿体細胞が KO Dark、KO Light 共に最も多く約 60% を占め、次いで双極細胞、錐体細胞、ミュラー細胞、アマクリン細胞となった (図 17B)。これら上位 5 種の Population 順位は、KO Dark と KO Light 間で同一であったことから (図 17B)、特定の細胞が光刺激によって突然死亡するなどの変化は生じなかったと考えられた。KO Dark と KO Light の遺伝子発現比較 ($p < 0.05$) では、桿体細胞の KO Light 群で発現増加を認めた遺伝子が 145、発現減少を認めた遺伝子が 126 検出されるなど、桿体細胞および錐体細胞にて多くの変動遺伝子が同定されたことから (表 8)、網膜障害初期には視細胞における影響が強く認められた。さらにミュラー細胞やアストロサイトなどのグリア細胞においても多数の変動遺伝子が見出されたことから (表 8)、グリア細胞においても網膜障害初期における影響が生じていることが明らかになった。一方で、水平細胞、神経節細胞、網膜色素上皮細胞などでは有意に変動した遺伝子は存在しなかったことから (表 8)、*Prom1* KO マウスの網膜障害は視細胞およびグリア細胞を端緒に生じ、網膜色素上皮細胞の異常は二次的に起きると想定された。

以前実施した網膜全体を対象にした発現解析 (Kobayashi et al., 2021) と今回の scRNA-seq を比較すると、これまでに光刺激による遺伝子誘導が確認されている

*Edn2*の発現増加が桿体細胞に (図 18A)、*Gfap* の発現増加がミュラー細胞およびアストロサイトに認められたことから (図 18B)、データの再現性が確認されたとともに、本解析では光刺激によって発現変動する網膜障害関連遺伝子を細胞種ごとに分解し、その発現細胞を同定することができた。

(3) *Prom1* KO マウスの視細胞内節において IGF シグナルの減弱が認められる

本研究における scRNA-seq により *Prom1* KO 網膜に光刺激を与えた際に変動する遺伝子を数多く同定することができたが、大部分は細胞内に発現する遺伝子であった。一方で、網膜障害の進行フェーズでは視細胞にて生じる一次変化が細胞間相互作用を介して網膜全体に波及する。そこで、網膜障害発症のメカニズムの 1 つとして分泌性因子に着目し scRNA-seq のデータを解析したところ、KO Light の桿体細胞およびアストロサイトにおいて *Insulin-like growth factor1 (Igf1)* 遺伝子の発現が有意に減少していることが明らかになった (図 19)。先行研究において、IGF1 は網膜を含む神経系において細胞の生存を亢進する因子としての役割が示唆されていることから (Arroba et al., 2018)、本結果より *Igf1* の減少が網膜色素変性症の発症に関与するという作業仮説をたて、さらに検証を深めることとした。

まず、網膜組織における IGF シグナルの活性化部位を同定するために、IGF1 の発現を抗体染色により評価したところ、神経節細胞層、内顆粒層の境界部および視細胞層にて発現が認められた (図 20A)。また、IGF1 シグナル下流の pAKT、Ribosomal protein S6 のリン酸化 (pS6^{235/236} および pS6^{240/244}) について (Biever et al., 2015) 抗体染色により活性化部位を評価したところ、IGF1 の発現箇所と同様の神経節細胞層、内顆粒層の境界部および視細胞層にて染色像が観察されたことから (図 20 B-D)、IGF1 による網膜組織中の IGF シグナル活性化組織は神経節細胞層、内顆粒層の境界部および視細胞層であることが示された。

次に、*Prom1* KO マウス網膜の IGF シグナルの活性化レベルを検討するために、Control と *Prom1* KO マウス網膜の pS6^{240/244} を抗体染色により比較した。その結果、2 週齢のマウスでは Control 群、*Prom1* KO 群共に神経節細胞層および内顆粒層の境界部付近に pS6^{240/244} の染色像が認められた一方で、視細胞層には pS6^{240/244} は観察されなかった (図 21A, D)。その後 Control 群の 3 週齢では視細胞層における pS6^{240/244} が確認されたが (図 21B)、3 週齢の *Prom1* KO 網膜では Control 群と比較し、視細胞層での pS6^{240/244} レベルが弱いことが明らかになった (図 21E)。一方で、*Prom1* KO マウスを暗所下で 3 週齢まで飼育した際には、Control 群と同等レベルの pS6^{240/244} 染色を認めたことから (図 21C, F)、*Prom1* KO マウス網膜では成長に伴う視細胞層の IGF シグナルが光刺激によって抑制されている可能性が考えられた。またこの視細胞層における IGF シグナルの活性化部位を同定するために、視細胞外節のマーカーである Rhodopsin、s-Opin もしくは視細胞内節のマーカーである PKM1/2 と pS6^{240/244} を共染色したところ、pS6^{240/244} は Rhodopsin および s-Opin

とは共局在せず (図 22A, B)、PKM1/2 と共局在したことから (図 22C, D)、視細胞における pS6^{240/244} は視細胞内節のシグナルであることが示された。

さらに IGF1 のリコンビナントタンパク質を視細胞層では pS6^{240/244} が検出されなかった 2 週齢のマウスに硝子体内投与し、IGF シグナルを活性化できるか評価したところ、基剤投与群と比較して IGF1 投与群では視細胞内節部に pS6^{240/244} 染色像が認められ、神経節細胞層および内顆粒層の境界部においてもリン酸化レベルの増強が観察された (図 23)。

以上より、*Prom1* KO における網膜障害初期では桿体細胞およびアストロサイトの *Igf1* 発現が減少しており、*Prom1* KO 網膜では光刺激により視細胞内節の IGF シグナルが抑制されていること、さらにはこのシグナルは外部からの IGF1 の導入により活性化できることが明らかになった。

(4) AAV_IGF1 の硝子体内投与により、視細胞の細胞死が抑制される

IGF1 の硝子体内投与により、網膜組織における IGF シグナルを活性化できることが示されたが、一般的に眼内は代謝が早く、網膜組織を標的とした低分子化合物やリコンビナントタンパク質を持続的に作用させることは難しい。そこで本研究では網膜における持続的な遺伝子発現を目的に、投与ツールとしてアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターに着目した。AAV は宿主内で自己増殖しないため病原性がない上に導入遺伝子が宿主細胞内で持続的に発現するため、安定的な遺伝子導入のシステムとしての利用が期待でき、実際に眼科の臨床現場でも遺伝子治療のツールとして使用されている (Russell et al., 2017)。そこでまず使用する AAV ベクターの眼内における持続性および網膜組織中での導入部位を明らかにするために、GFP をコードした AAV ベクター (AAV_GFP) を調製し、マウスに硝子体内投与を行った。投与 4 週間後における網膜組織中の GFP 発現レベルを抗体染色により評価したところ、GFP 発現は投与部位に近い網膜表層の神経節細胞層に強く認められるものの、網膜深層部においても十分な GFP 染色像が観察された (図 24)。よって今回用いた AAV ベクターの硝子体内投与による遺伝子導入においては、少なくとも投与 4 週間まで遺伝子発現作用が持続し、網膜表層から深層の神経細胞に広く遺伝子導入が可能であることが確認された。次に IGF1 をコードする AAV ベクター (AAV_IGF1) を作成し、同様に硝子体内投与 4 週間後における pS6^{240/244} を抗体染色により検出したところ、これまでに特定した活性化部位に加え、内顆粒層内に異所的なリン酸化を認めたことから (図 25)、AAV ベクターの硝子体内投与による IGF1 の持続的な遺伝子導入と IGF シグナルの活性化が確認された。

そこで IGF1 の網膜保護作用 (Arroba et al., 2011) を検討するため、AAV_IGF1 を 2 週齢のマウスに硝子体内投与し、4 週間後における細胞死を TUNEL 染色により評価した。その結果、AAV_GFP 投与群と比較し、AAV_IGF1 投与群では TUNEL 陽性細胞数が有意に減少し (図 26A-C)、視細胞の核層である外顆粒層の核の数が有意に

増加している (図 26D) ことが明らかになった。また IGF シグナルの活性化は解糖系の活性化につながるということが報告されていることから (Rajala et al., 2020)、IGF1 の細胞死抑制作用機序として解糖系への影響を評価した。なお、解糖系ではグルコースからピルビン酸が合成される過程で NAD^+ が消費され NADH が生成されることから、 NADH/NAD^+ ratio を算出し、解糖系の機能評価指標に用いた。Control マウスおよび *Prom1* KO マウスに AAV_GFP もしくは AAV_IGF1 を硝子体内投与した際の NADH/NAD^+ ratio を測定したところ、Control と比較し AAV_GFP を投与した *Prom1* KO マウス網膜では NADH/NAD^+ ratio が有意に低下しており (図 27)、*Prom1* KO マウスの網膜では解糖系の機能低下が生じていることが明らかとなった。一方で、AAV_IGF1 を投与した *Prom1* KO マウスの網膜では AAV_GFP を投与した *Prom1* KO マウスの網膜と比較し、 NADH/NAD^+ ratio が有意に増加しており (図 27)、AAV_IGF1 の投与によって解糖系機能が回復することが示された。

以上より *Prom1* KO では IGF シグナルの低下による解糖系の阻害が網膜障害発症の一因であり、AAV_IGF1 の硝子体内投与は IGF シグナルの活性化を介した解糖系の亢進により網膜保護作用を示す可能性が示された。

(5) *Prom1* KO 網膜において、エンドセリン受容体阻害剤と AAV_IGF1 を共導入することにより、強い網膜保護作用を示す

Prom1 KO 網膜において、AAV_IGF1 の硝子体内投与は IGF シグナルの活性化を介した解糖系への作用により、細胞死抑制による網膜保護効果を示すことが明らかになった。一方で、GFAP の抗体染色により網膜障害の 1 つであるグリオーシスに対する効果を検討したところ、*Prom1* KO マウスの AAV_GFP 投与群との比較において *Prom1* KO マウスの AAV_IGF1 投与群ではグリオーシス抑制作用が認められなかった (図 28)。そこで先行研究において、腹腔内投与にて *Prom1* KO マウスにおけるグリオーシスの改善および視細胞の細胞死抑制効果が確認されている (Rattner et al., 2005; Kobayashi et al., 2021) エンドセリン受容体阻害剤に着目した。なお、腹腔内投与では全身性の副作用の懸念があることから、本検討ではエンドセリン受容体阻害剤をマウスの硝子体内に投与し、網膜特異的にエンドセリンシグナルを阻害することで直接的な薬効を評価することとした。また、先行研究で試行されたエンドセリン受容体阻害剤 (BQ-123, BQ-788) は第一世代のものであり、阻害活性の高い別の化合物も多数開発されている。エンドセリン受容体阻害剤は主に肺動脈性肺高血圧症の治療薬として上市されているため、本研究では将来的な臨床応用に鑑み、上市済み製品の中からエンドセリン受容体 A (ETA) と B (ETB) の Dual antagonist であるボセンタン水和物を評価化合物に選定した (表 9)。

まずボセンタンもしくは Control として DMSO を 2 週齢の *Prom1* KO マウスに硝子体内投与し、1 週間後に再度ボセンタンもしくは DMSO を投与後、6 週齢時に眼球を摘出し、GFAP の抗体染色を行った。その結果、DMSO を投与した *Prom1* KO マ

ウスと比較し、ボセンタン投与群ではグリオシスが強力に抑制されていることが明らかになった (図 29)。AAV_IGF1 の硝子体内投与ではグリオシスに対し薬効を示さなかったことから、IGF1 はエンドセリンシグナルと独立して網膜保護作用を有していることが示唆された。

そこで次により強力かつ効果的な網膜障害抑制作用を目指し、IGF シグナルの活性化とエンドセリンシグナル阻害の併用効果の有無を検討した。なお、これまでは組織学的な網膜の評価を実施してきたが、本検討では網膜組織の機能的な薬効を捉えるため、経時的な網膜電図 (Electroretinogram: ERG) 測定を実施した。また、AAV ベクターは 1 度の投与により 4 週間以上の持続的な遺伝子発現が期待されることから、2 週齢のマウスに 1 度だけ投与し、ボセンタンは 2 週齢時と 3 週齢時の 2 度投与するスケジュールにて、3 週齢、5 週齢および 8 週齢時の ERG を評価した (図 30A)。その結果、Control では 3 週齢時から全ての測定ポイントにおいて ERG の 2 つの波形: 光刺激に応答して最初に検出される陰性波 (a 波: 主に桿体細胞および錐体細胞の機能を反映する) および陽性波 (b 波: 双極細胞、ミュラー細胞などの網膜中層の機能を反映) が十分に観察され、網膜が光受容器として機能していることが示唆された (図 30B-D)。一方で *Prom1* KO マウスでは、3 週齢においてすでに a 波、b 波共に Control と比較し有意な振幅減弱が認められ、網膜変性および視機能低下が始まっていることが確認された。さらに *Prom1* KO 網膜では経時的に振幅が減退し、8 週齢時には波形が消失していたため、*Prom1* KO 網膜では 8 週齢時点において失明状態に陥っていることが示された (図 30B-D)。

ボセンタン投与群では AAV_GFP 投与の *Prom1* KO 群と比較し、a 波の各測定タイムポイントと b 波の 8 週齢測定時に有意な保護効果が見られ、エンドセリン受容体阻害剤による網膜機能の改善が確認された (図 30B-D)。さらにボセンタン + AAV_IGF1 の共投与群では、全ての測定ポイントで a 波、b 波共に AAV_GFP 投与の *Prom1* KO 群と比較して有意な網膜保護効果が得られ、かつボセンタン単独投与群と比較した際には、5 週齢および 8 週齢時点の b 波振幅において有意な併用効果を認めた (図 30B-D)。

以上の機能性試験から、エンドセリンシグナル阻害と IGF シグナル惹起の併用により、*Prom1* KO マウスにおける網膜障害を強力に抑制できることが明らかになった。

考察

(1) Single-cell RNA sequencing により、光依存的に応答する細胞と発現量が変化する遺伝子が新たに同定できた

現在までに、網膜色素変性症の発症初期に異常シグナルとして同定されているのはエンドセリンシグナルのみだが、本シグナル以外にも阻害するべきシグナルがある可能性や相補することによって網膜の生存状態が改善できる因子の存在が推測された。しかし網膜変性の初期に変動する遺伝子の変動量は比較的緩やかであると考えられるほか、網膜には数多くの細胞種が存在するため、網膜全体での発現比較解析ではその遺伝子や細胞を同定することは難しい。したがって本研究では、網膜色素変性症モデルマウスを用いて、シングルセルレベルの遺伝子発現比較解析により、光依存的に発現が変化する遺伝子とその細胞種の同定を試みた。

本研究では完全にナイーブな網膜細胞を解析対象にするため、生後 11 日目の網膜を用いた。生後 11 日目のマウスではまだ開眼しておらず、網膜細胞は光刺激を全く経験していないと考えられるが、同時に網膜細胞が十分に成熟しているかという疑問が残る。しかし視細胞マーカーである Rhodopsin および m-Opin が抗体染色により検出できたこと (図 12)、また強制開眼と光刺激による実験では *Edn2* や *Bcl3* のように、変性初期に惹起される遺伝子の上昇が確認できたことから (図 13)、開眼前でも網膜細胞の成熟は進んでいると考えられた。

本研究では得られた scRNA-seq のデータを 11 種類の細胞種に分類したが、細胞種ごとの割合は既報の 6-8 週齢のマウスと大差を認めず (Pauly et al., 2019; Zarkada et al., 2021)、*Prom1* KO マウスの網膜組織は生後 12 日齢時点では成熟マウスと同様の構成であることが示唆された。また、scRNA-seq には光刺激後 1 日暗室飼育を継続した個体を用いているが、*Edn2* をはじめとする網膜障害誘導のシグナルは入っているものの (図 15)、大きく細胞種の構成比が変化するほどの網膜構造に対する表現型は生じていない (図 17)。したがって、この条件では光刺激によって視細胞 (特に桿体細胞) の死滅は起こっておらず、網膜色素変性症病態の比較的初期における遺伝子変動やシグナルを検出できていると考えられた。

本研究における scRNA-seq ではこれまで網膜障害初期に誘導されるとの報告 (Kobayashi et al., 2021) があつた *Edn2* は桿体細胞にて (図 18A)、*Gfap* はミュラーグリア細胞やアストロサイトにて発現が増加していることが明らかになり (図 18B)、細胞種ごとの遺伝子変動を捉えることに成功した。また、本研究では網膜障害発症初期に変動する遺伝子として新たに *Igf1* を見出し (図 19)、*Prom1* KO 網膜においては視細胞内節部における IGF シグナルが光刺激により抑制されていることを明らかにした (図 21, 22)。*Igf1* は以前に当研究室が実施した *Prom1* KO マウスの網膜組織全体を用いた RNA sequencing (Kobayashi et al., 2021) では同定できなかった遺伝子であるが、これは *Igf1* の遺伝子発現レベル低下が確認されたアストロサイ

トの比率が全細胞の 1%であるなど (表 8)、scRNA-seq の強みを活かした解析の成果であると言える。

網膜色素変性症は視細胞および網膜色素上皮細胞の変性に起因して進行する疾患であるが、今回の scRNA-seq では網膜色素上皮細胞のクラスターにて発現変動を認めた遺伝子は存在しなかった (表 8)。したがって光刺激によって誘導される *Prom1* KO マウスの網膜変性は視細胞にて一次的に生じる可能性が示された。これは *Prom1* が網膜組織において特に桿体細胞中の内節・外節間の膜突出部分に多く局在している (Maw et al., 2004; Zacchigna et al., 2009) こととも齟齬のない結果である。

先行研究において、正常網膜と網膜色素変性症網膜の遺伝子発現変化を比較した例が存在する。rd10 マウスを用いた報告 (Karademir et al., 2022) では視細胞において最も発現量が増加する遺伝子として *Early growth response protein-1 (Egr-1)* に着目しており、今回の研究結果とは異なる結果となった。この違いは、rd10 マウスが桿体細胞中の cGMP 特異的な分解酵素の構成サブユニット Phosphodiesterase 6 β をコードする遺伝子 *Phosphodiesterase 6B (Pde6b)* の変異を有するモデル動物であり、解析に供されたマウスの変異遺伝子が異なるという理由のほか、この研究における解析時期は rd10 マウスにおける桿体細胞の障害ピークを迎える 3 週齢期であり、本研究よりもやや遅い時期で行われた解析であることが理由として考えられる。一方で、*Early growth response protein-2 (Egr-2)* については、本研究の scRNA-seq においても有意な発現増加が錐体細胞にて確認されており、*Prom1* 同様に視細胞に関連した遺伝子変異を有するモデルであるが故に網膜変性の病態進行に伴う変化として共通する結果が認められたと考察する。また別の報告として、*Membrane-type frizzled related protein (Mfrp)* の遺伝子変異を有するマウスを用いた検討ではミクログリアに着目した scRNA-seq が実施されているが (Kumari et al., 2022)、本研究ではミクログリアのクラスターにて発現変動した遺伝子は存在していない。これは *Mfrp* が網膜色素上皮細胞に発現しており、視細胞に主に発現する *Prom1* とは網膜障害の発症機序が異なるためであると考えられる。他にもヒトドナーから採取した網膜を用いた scRNA-seq では、*Metastasis - associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1)* の遺伝子発現低下が報告されているが (Lukowski et al., 2019)、これは死後のヒト網膜サンプルを用いた解析であり、死亡後の時間経過との関連が示唆されていることから、網膜障害後期に生じる変化であると考えられ、網膜障害の発症初期に着目した本研究の scRNA-seq ではいずれのクラスターにおいても *MALAT1* 遺伝子の変動は認めなかった。病態進行に伴う遺伝子発現変化については今後、光刺激後に経時的な単一細胞遺伝子発現解析を行うことにより、視細胞で生じた変性がどのように他の細胞に影響を及ぼしていくのかを同定できる可能性が高い。

(2) 網膜において IGF シグナルは視細胞保護に有用である

IGF1 は IGF1 受容体に結合し、PI3K/AKT シグナルの活性化を介して (Jung et

al., 2015)、抗酸化 (Wang et al., 2008) や抗アポトーシス (Page et al., 2000) 作用を發揮することが知られている。網膜においては、これまでに別の網膜色素変性症モデルである rd10 マウスに対し、IGF1 の硝子体内投与が神経保護作用を示す報告 (Arroba et al., 2011) があるなど、網膜組織において IGF1 が神経栄養因子の 1 つとして働き、視細胞および網膜色素上皮細胞の細胞死抑制を介した網膜保護効果を發揮する可能性が考えられている (Arroba et al., 2018)。このような細胞保護効果のある IGF1 が、*Prom1* KO 網膜にてなぜ発現低下するのかは不明であるが、正常マウスでは 2 週齢時には認められなかった視細胞の pS6^{240/244} が 3 週齢時では検出できるようになったことから (図 21A, B)、網膜の成熟・機能維持に必要なシグナルであり、本シグナルの低下は暗室下で飼育した *Prom1* KO マウスでは観察されなかったことから (図 21E)、*Prom1* KO 網膜では視細胞の IGF シグナルが光刺激によって抑制されていると考えられた。さらにこの視細胞の IGF シグナルは視細胞内節に限局していることが示されたことから (図 22)、*Prom1* KO 網膜における解糖系の機能を NADH/NAD⁺ ratio の測定により評価したところ、*Prom1* KO 網膜では解糖系の機能が低下していることおよび AAV_IGF1 を投与した *Prom1* KO マウス網膜では解糖系の機能亢進が認められ (図 27) が明らかになった。IGF シグナルは解糖系を活性化することが知られており (Rajala et al., 2020)、IGF1 受容体の KO マウスでは網膜組織中の解糖系の機能低下が見られるとの報告があることから (Rajala et al., 2022)、*Prom1* KO 網膜では網膜障害初期において光刺激により、桿体細胞およびアストロサイトの *Igf1* 発現が低下し、視細胞内節の IGF シグナルの弱化を通じて、解糖系の機能低下が生じており、AAV_IGF1 は視細胞の IGF シグナルを活性化することで解糖系の亢進を介した視細胞保護作用を發揮している可能性が示された。

また IGF シグナルが細胞非自律的に桿体・錐体細胞両方の保護に必須の働きをすることは種々の研究からも明らかになっている。例えば、*Igf1* KO マウスを用いた検討において、WT と比較した際 *Igf1* KO マウスでは経時的に ERG の振幅が消失し、視機能が低下すること (Rosa et al., 2012) やオートファジー阻害による炎症誘導に関連したグリオーシスの亢進が報告されている (Arroba et al., 2016)。また、桿体細胞特異的な IGF1 受容体の KO マウスを用いた解析から、細胞生存保護シグナルが細胞外部からもたらされることが示唆されている (Rajala et al., 2022)。したがって、IGF シグナルを細胞非自律的に作用させることが、視細胞全体の生存を維持する上で重要であるとも言える。

一方で、*Igf1* の遺伝子改変過剰発現マウスにおいては、加齢とともにグリオーシスが誘導されるとの報告 (Villacampa et al., 2013) やグリオーシスを伴うヒト網膜症病変において IGF1 受容体の発現が増加するとの報告がある (Haurigot et al., 2013)。前者については、IGF1 は正常網膜に対しては解糖系におけるピルビン酸合成反応を触媒する PKM の発現上昇を促進し、ATP 産生を亢進することで細胞の生存に寄与するものの、IGF シグナルが過剰に活性化し続けることは早期に細胞を疲弊させ、加齢時には細胞障害性を示すためと考えられた。また、後者については網膜障害が比較的

進行した状態での評価であり、本研究にて明らかにした視細胞の IGF シグナルが低下する網膜障害発症初期とは状況が異なるため、障害後期においては IGF シグナルを阻害することが網膜保護に有効である可能性も示唆される。

以上より、IGF1 の網膜保護作用は受け手の細胞の状態に依存して発揮される可能性があり、少なくとも正常眼と比較し、IGF シグナルが不足する環境下・病態期においては *Igf1* の遺伝子発現レベルを上昇させる戦略が病態進行を遅らせる上で有用であると考えられた。

(3) 網膜において IGF1 はエンドセリンシグナル阻害と独立して働き、網膜保護効果を示す

エンドセリンシグナルは光依存的に網膜が変性する初期段階において亢進し、グリア細胞の異常活性化を引き起こすことが明らかになっている (Rattner et al., 2005; Kobayashi et al., 2021)。また、ヒトの糖尿病由来の病変網膜においてエンドセリンシグナルが活性化されている例が報告されている (Salvatore and Vingolo, 2010)。したがって、エンドセリンシグナルの活性化は視細胞の変性時に人獣共通に認められる現象である。

エンドセリンによって活性化されるグリア細胞は神経細胞を物理的に保護したり、生物種によっては分化転換によって視神経細胞に変化して視神経細胞の生存維持や量的回復を企図したりする一方 (Raymond et al., 2006; Vecino et al., 2016)、その異常活性化は網膜組織の空間的な障害になり、長期的にはグリオシス (神経膠症) の状態に陥って網膜疾患状態が憎悪されるのみである (Hippert et al., 2015)。またエンドセリンシグナルはグリア細胞の活性化を引き起こす一方、血管内皮を収縮させるという副作用的な働きを持つために、網膜血管狭窄の状態となり、結果として網膜細胞への栄養供給が不良や視神経細胞死が引き起こされる (Rattner et al., 2013; Kobayashi et al., 2021)。したがって、エンドセリンシグナルを阻害することは網膜色素変性症の進行を抑制するために必須の戦略である。

本研究に用いたボセンタン水和物は 2 種類のエンドセリン受容体のうち ETA と ETB の両受容体に作用する化合物であるが、網膜組織では ETA が血管内皮細胞、ETB が血管内皮細胞とグリア細胞に多く発現している。本研究ではボセンタンの硝子体内投与により強力なグリオシス抑制効果が認められたため (図 29)、少なくとも ETB に対しては強い阻害作用を示した可能性が示された。また、全身投与では血液網膜関門により標的細胞まで化合物を送達させることが難しいが、硝子体内投与では直接眼内に化合物が届けられるため、全身投与時よりも薬効が増強すると考えられた。

エンドセリン受容体阻害剤としては、第一世代の BQ-123/BQ-788 に始まり、ボセンタン、アンブリセンタン、マシテンタンが開発されており (表 9)、BQ-123/788 以外は上市され、肺高血圧症の降圧剤として使用されている。エンドセリンは血管収縮

作用を持つペプチドであり、心臓収縮、排卵などに重要な役割を果たす。したがってその阻害剤の全身投与は多くの副作用を引き起こすと考えられることから、硝子体内投与は網膜に対して特異的かつ全身性の副作用の少ない理にかなった投与方法であると言える。

本研究では、AAV_IGF1 の硝子体内投与により細胞死抑制効果が認められたものの、グリオシスの抑制効果を示さなかったこと (図 28)、さらにはエンドセリン受容体阻害と IGF シグナル惹起の併用時にエンドセリン受容体阻害単独時と比較して薬効の増強が認められたことから (図 30)、IGF1 の網膜保護効果はエンドセリンシグナルとは独立した経路を介して働くことが示唆された。IGF1 の網膜保護作用については、IGF シグナル下流の mTOR の活性化を介した解糖系の亢進が 1 つの作用メカニズムと考えられるほか、IGF シグナル下流の AKT の活性化は網膜色素上皮細胞のファゴサイトーシス機能への関与が報告されており (Bulloj et al., 2013)、視細胞外節に対する貪食作用の改善によって網膜保護作用を発揮している可能性が考えられる。一方で、エンドセリンシグナルは炎症ストレスとしてグリア細胞をはじめとする網膜細胞に作用し (Rattner et al., 2005)、炎症を伴う細胞死を誘導することが想定され、今後はエンドセリンシグナル阻害と IGF シグナルの活性化がどのように分担して視細胞変性に対し回復効果を示すのか、さらなる解析が必要である。

(4) 網膜色素変性症治療法としての有用性

本研究により、エンドセリンシグナル阻害と IGF シグナル惹起の併用が網膜色素変性症の新規治療法となると提案できる。実際には、網膜色素変性症の原因遺伝子は多数存在するため、この方法を一般的な治療法として確立するためには、他の遺伝子変異においても同様の疾患進行(エンドセリンの発現上昇と *Igf1* 遺伝子発現の抑制)が起きることを確認する必要がある。特に IGF1 に関しては、病態初期の細胞保護効果は確認できているが、疾患後期にはむしろ生存に対して逆効果を示す可能性があることから、投与時期や投与量についての詳細な検討が必要である。一方で、*Prom1* KO マウスは光刺激によって網膜障害が誘発される動物モデルであることから、IGF シグナルの病態発症への関与は網膜色素変性症の病態初期に共通して生じる一次的な変化の 1 つである可能性が考えられる。そのため本研究成果は今後原因遺伝子に依存しない、汎用性の高い網膜色素変性症治療法開発の一助となることが期待される。

また本研究では AAV ベクターを投与ツールとして用いた硝子体内投与を試行した。AAV ベクターは *RPE65* 遺伝子を標的とした網膜ジストロフィー患者の治療法として (Wang et al., 2020) 2017 年に FDA に承認されており、2023 年 6 月には日本においても製造販売承認を取得するなどヒト臨床における実績を有することから (Clinical Study; NCT04516369)、実用的な投与ツールであると言える。IGF1 についても、他の遺伝子変異における網膜色素変性症の疾患進行が同様の傾向を辿るのであれば、本法での導入を検討することが可能である。

網膜色素変性症の新規治療法として現在、iPS細胞を用いて作成された網膜シートの移植療法等も検討されているが、本研究で試行した方法は疾患の初期段階に介入することにより、疾患の進行を抑制または遅延させるものであり、移植療法のような疾患後期に施行する根治療法とは相補的な方法と位置付けられる。したがって、今後双方の研究が発展していくことが、より盤石な治療体制の確立へとつながると期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域 発生医科学研究室 笹井 紀明准教授に心より感謝申し上げます。また、円滑な研究の遂行にあたりご指導や助言を賜りました篠塚 琢磨助教、様々な場面で本研究をサポートいただきました Agnes Ong Lee Chen 氏、吉原 えりか氏、谷島 憲親氏、鹿田 直哉氏ならびに発生医科学研究室の皆様へ深く御礼申し上げます。

本研究に際し、終始ご懇切なるご高関を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域 遺伝子発現制御研究室 別所 康全教授、RNA 分子医科学研究室 岡村 勝友教授に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際しご協力をいただきました大阪大学微生物病研究所 遺伝情報実験センター ゲノム解析室 奥崎 大介特任准教授、元岡 大祐助教、国立循環器病センター 白井 学室長、北海道大学遺伝子病制御研究所 近藤 亨教授に深く御礼申し上げます。

本研究に携わる機会を与えていただきました参天製薬株式会社 伊藤 毅 代表取締役社長兼 CEO、山田 和人 Head of Pharmaceuticals and Pharmacology Department、廣瀬 威夫 Representative Head of OIC and Head of Innovation Strategy、加藤 雅智 Head of Pharmacology、山口 泰人 Leader、柴垣 圭一 Research Scientist ならびに同僚の皆様へ深く御礼申し上げます。

研究活動の犠牲となり、研究の進行を助けていただいた実験動物に哀悼の意を表すると共に心より感謝いたします。

最後になりましたが、研究生活を支えてくれた家族と友人たちに深く感謝申し上げます。

参考文献

- Arroba, AI., Alvarez-Lindo, N., Rooijen, NV., Rosa, EJ., (2011). Microglia-mediated IGF-I neuroprotection in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science* 52, 9124-9130.
- Arroba, AI., Campos-Caro, A., Aguilar-Diosdado, M., Valverde, AM., (2018). IGF-1, Inflammation and Retinal Degeneration: A Close Network. *Frontiers in Aging Neuroscience* 10:203.
- Arroba AI, Rodríguez-de la Rosa L, Murillo-Cuesta S, Vaquero-Villanueva L, Hurlé JM, Varela-Nieto I, Valverde ÁM. (2016). Autophagy resolves early retinal inflammation in Igf1-deficient mice. *Disease Models and Mechanisms*. 1;9(9):965-74.
- Bhattacharya, S., Yin, J., Winborn, C.S., Zhang, Q., Yue J., Chaum, E., (2017). Prominin-1 Is a Novel Regulator of Autophagy in the Human Retinal Pigment Epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 58, 2366-2387.
- Biever A, Valjent E, Puighermanal E. (2015) Ribosomal Protein S6 Phosphorylation in the Nervous System: From Regulation to Function. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 16;8:75
- Bulloj A, Duan W, Finnemann SC. (2013) PI 3-kinase independent role for AKT in F-actin regulation during outer segment phagocytosis by RPE cells. *Experimental Eye Research*. 113:9-18.
- Cehajic-Kapetanovic, J., Birtel, J., McClements, ME., Shanks, ME., Clouston, P., Downes, SM., Issa, PC., MacLaren, RE.,(2019) Clinical and Molecular Characterization of PROM1-Related Retinal Degeneration. *JAMA Network open*. 2(6).
- Corbeil, D., Roper, K., Hellwig, A., Tavian, M., Miraglia, S., Watt, S.M., Simmons, P.J., Peault, B., Buck, D.W., Huttner, W.B., (2000). The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *The Journal of biological chemistry* 275, 5512-5520.

- Dellett, M., Sasai, N., Nishide, K., Becker, S., Papadaki, V., Limb, G.A., Moore, A.T., Kondo, T., Ohnuma, S., (2015). Genetic background and light dependent progression of photoreceptor cell degeneration in Prominin 1 knockout mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 56, 164-176.
- Fargeas, C.A., Joester, A., Missol Kolka, E., Hellwig, A., Huttner, W.B., Corbeil, D., (2004). Identification of novel Prominin 1/CD133 splice variants with alternative C termini and their expression in epididymis and testis. *Journal of cell science* 117, 4301-4311.
- Feodorova, Y., Koch, M., Bultman, S., Michalakis, S., Solovei, I., (2015). Quick and reliable method for retina dissociation and separation of rod photoreceptor perikarya from adult mice. *MethodsX* 2, 39-46.
- Ferrari, S., Iorio, ED., Barbaro, V., Ponzin, D., Sorrentino, FS., Parmeggiani, F., (2011). Retinitis Pigmentosa: Genes and Disease Mechanisms. *Current Genomics* 12(4), 238-249.
- Grigoryan EN. (2022) Self-Organization of the Retina during Eye Development, Retinal Regeneration In Vivo, and in Retinal 3D Organoids In Vitro. *Biomedicines*. 20:10(6):1458.
- Hamel C., (2006) Retinitis pigmentosa. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 1:40.
- Hartong, D. T., Berson, E. L., Dryja, T. P. (2006) Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368, 1795–1809.
- Haurigot V, Villacampa P, Ribera A, Llombart C, Bosch A, Nacher V, Ramos D, Ayuso E, Segovia JC, Bueren JA, Ruberte J, Bosch F. (2009). Increased intraocular insulin-like growth factor-I triggers blood-retinal barrier breakdown. *The Journal of biological chemistry*. 21;284(34):22961-9.
- Hayakawa M, Fujiki K, Kanai A, Matsumura M, Honda Y, Sakaue H, Tamai M, Sakuma T, Tokoro T, Yura T, Kubota N, Kawano S, Matsui M, Yuzawa M, Oguchi Y, Akeo K, Adachi E, Kimura T, Miyake Y, Horiguchi M, Wakabayashi K, Ishizaka N, Koizumi K, Uyama M, Ohba N. (1997) Multicenter genetic study of retinitis pigmentosa in Japan: I. Genetic heterogeneity in typical retinitis pigmentosa. *Japanese Journal of Ophthalmology*.41(1):1-6.

- Hayakawa M, Matsumura M, Ohba N, Matsui M, Fujiki K, Kanai A, Tamai M, Shiono T, Tokoro T, Akazawa Y, (1993) A multicenter study of typical retinitis pigmentosa in Japan. *Japanese Journal of Ophthalmology*.;37(2):156-64.
- Hippert C, Graca AB, Barber AC, West EL, Smith AJ, Ali RR, Pearson RA. (2015) Müller glia activation in response to inherited retinal degeneration is highly varied and disease-specific. *PLoS One*. 20;10(3):e0120415.
- Hoon, M., Okawa, H., Santana, LD., Wong, R OL., (2014). Functional architecture of the retina: development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research* 42, 44-84.
- Hori A, Nishide K, Yasukuni Y, Haga K, Kakuta W, Ishikawa Y, Hayes MJ, Ohnuma SI, Kiyonari H, Kimura K, Kondo T, Sasai N. (2019) Prominin-1 Modulates Rho/ROCK-Mediated Membrane Morphology and Calcium-Dependent Intracellular Chloride Flux. *Scientific Reports*. 4;9(1):15911.
- Ikelle L, Al-Ubaidi MR, Naash MI. (2020) Pluripotent Stem Cells for the Treatment of Retinal Degeneration: Current Strategies and Future Directions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 14;8:743.
- Jung, HJ., Suh, Y., (2015) Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. *Frontiers in genetics* 5:472.
- Karademir, D., Todorova, V., Ebner, L JA., Samardzija, M., Grimm, C., (2022). Single-cell RNA sequencing of the retina in a model of retinitis pigmentosa reveals early responses to degeneration in rods and cones. *BMC biology* 20(1):86.
- Kumari A, Ayala-Ramirez R, Zenteno JC, Huffman K, Sasik R, Ayyagari R, Borooah S. (2022). Single cell RNA sequencing confirms retinal microglia activation associated with early onset retinal degeneration. *Scientific Reports* 10;12(1):15273.
- Kobayashi, Y., Watanabe, S., Shirai, M., Yamashiro, C., Ogata, T., Higashijima, F., Yoshimoto, T., Hayano, T., Asai, Y., Sasai, N., Kimura, K., (2021). Light-dependent induction of Edn2 expression and attenuation of retinal pathology by endothelin receptor antagonists in Prominin 1 deficient mice. *Disease Models and Mechanisms* 14, 048962.

- Liu, W., Liu, S., Li, P., Yao, K., (2022). Retinitis Pigmentosa: Progress in Molecular Pathology and Biotherapeutical Strategies. *International Journal of Molecular Sciences* 23(9), 4883.
- Lukowski SW, Lo CY, Sharov AA, Nguyen Q, Fang L, Hung SS, Zhu L, Zhang T, Grünert U, Nguyen T, Senabouth A, Jabbari JS, Welby E, Sowden JC, Waugh HS, Mackey A, Pollock G, Lamb TD, Wang PY, Hewitt AW, Gillies MC, Powell JE, Wong RC. (2019). A single-cell transcriptome atlas of the adult human retina. *The EMBO Journal*. 16;38(18):e100811.
- Maw, M.A., Corbeil, D., Koch, J., Hellwig, A., Wilson Wheeler, J.C., Bridges, R.J., Kumaramanickavel, G., John, S., Nancarrow, D., Roper, K., Weigmann, A., Huttner, W.B., Denton, M.J., (2000). A frameshift mutation in prominin (mouse) like 1 causes human retinal degeneration. *Human molecular genetics* 9, 27-34.
- Milam, AH., Li, ZY., Fariss, RN., (1998) Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Progress in Retinal and Eye Research* 37(22), 8227-8232.
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K., Buck, D.W., (1997). A novel five transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90, 5013-5021.
- Morizane, Y., Morimoto, N., Fujiwara, A., Kawasaki, R., Yamashita, H., Ogura, Y., Shiraga, F., (2019). Incidence and causes of visual impairment in Japan: the first nation-wide complete enumeration survey of newly certified visually impaired individuals. *Japanese Journal of Ophthalmology* 63, 26-33.
- Nishide, K., Nakatani, Y., Kiyonari, H., Kondo, T., (2009). Glioblastoma formation from cell population depleted of Prominin1 expressing cells. *PloS one* 4, e6869.
- Pauly, D., Agarwal, D., Dana, N., Schäfer, N., Biber, J., Wunderlich, KA., Jabri, Y., Straub, T., Zhang, NR., Gautam, AK., Weber, B HF., Hauck, SM., Kim, M., Aurcio, CA., Stambolian, D., Li, M., Grosche, A., (2019). Cell-Type-Specific Complement Expression in the Healthy and Diseased Retina. *Cell Reports* 29(9), 2835-2848.
- Page, C., Lin, HJ., Jin, Y., Castle VP., Nunez, G., Huang, M., Lin, J., (2000).

Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer research* 1A, 407-416.

Permanyer, J., Navarro, R., Friedman, J., Pomares, E., Castro Navarro, J., Marfany, G., Swaroop, A., Gonzalez Duarte, R., (2010). Autosomal recessive retinitis pigmentosa with early macular affectation caused by premature truncation in PROM1. *Investigative ophthalmology & visual science* 51, 2656-2663.

Rajala, A., Teel, K., Bhat, MA., Batushansky, A., Griffin, TM., Purcell, L., Rajala, R VS., (2022). Insulin-like growth factor 1 receptor mediates photoreceptor neuroprotection. *Cell death and Diseases* 13(7):613.

Rajala RVS. (2020) Aerobic Glycolysis in the Retina: Functional Roles of Pyruvate Kinase Isoforms. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 30;8:266

Rattner, A., Nathans, J., (2005). The genomic response to retinal disease and injury: evidence for endothelin signaling from photoreceptors to glia. *Journal of neuroscience* 25(18), 4540-4549.

Rattner, A., Yu, H., Williams, J., Smallwood, PM., Nathans, J. (2013). Endothelin-2 signaling in the neural retina promotes the endothelial tip cell state and inhibits angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(40): E3830-9.

Raymond PA, Barthel LK, Bernardos RL, Perkowski JJ. (2006) Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Developmental Biology*. 26;6:36.

Rosa, LR., Fernandez-Sanchez, L., Germain, F., Murillo-Cuesta, S., Varela-Nieto, I., Villa, P., Cuenca N., (2012). Age-related functional and structural retinal modifications in the Igf1^{-/-} null mouse. *Neurobiology of Disease* 46(2), 476-485.

Russell, S., Bennett, J., Wellman, JA., Chung, DC., Yu, ZF., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., Cross, D., Marshall, KA., Walshire, J., Kehoe, TL., Reichert, H., Davis, M., Raffini, L., George, LA., Hudson, FP., Dingfield, L., Zhu, X., Haller, LA., Sohn, EH., Mahajan, VB., Pfeifer, W., Weckmann, M., Johnson, C., Gewaily, D., Drack, A., Stone, E., Wachtel, K.,

- Simonelli, F., Leroy, BP., Wright, JF., High, KA., Maguire, AM., (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 390(10097), 849-860.
- Salvatore, S., Vingolo, EM. (2010) Endothelin-1 role in human eye: A review. *Journal of Ophthalmology* 354645.
- Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. (2016) Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*. 51:1-40.
- Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJF, den Hollander AI, Collin RWJ, Klaver CCW, Hoyng CB, Roepman R, Klevering BJ. (2018) Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Progress in Retinal and Eye Research*.:66:157-186.
- Villacampa, P., Ribera, A., Motas, S., Ramírez, L., García, M., Villa, P., Haurigot, V., Bosch, F., (2013). Insulin-like growth factor I (IGF-I)-induced chronic gliosis and retinal stress lead to neurodegeneration in a mouse model of retinopathy. *Journal of Biological Chemistry* 288(24), 17631-17642.
- Wang, L., Chen, Y., Sternberg, P., Cai, J., (2008). Essential roles of the PI3 kinase/Akt pathway in regulating Nrf2-dependent antioxidant functions in the RPE. *Investigative ophthalmology & visual science* 49, 1671- 1678.
- Wang, X., Yu, C., Tzekov, RT., Zhu, Y., Li, W. (2020). The effect of human gene therapy for RPE65-associated Leber's congenital amaurosis on visual function: a systematic review and meta-analysis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 15(1):49.
- Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., Buck, D.W., (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002-5012.
- Zacchigna, S., Oh, H., Wilsch Brauninger , M., Missol Kolka, E., Jaszai, J., Jansen, S., Tanimoto, N., Tonagel, F., Seeliger, M., Huttner, W.B., Corbeil, D., Dewerchin, M., Vinckier, S., Moons, L., Carmeliet, P., (2009). Loss of the cholesterol-binding protein prominin 1/CD133 causes disk dysmorpho genesis

and photoreceptor degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 2297-2308.

Zarkada, G., Howard, JP., Xiao, X., Park, H., Bizou, M., Leclerc, S., Künzel, SE., Boisseau, B., Li, J., Cagnone, G., Joyal, JS., Andelfinger, G., Eichmann, A., Dubrac, A., (2021). Specialized endothelial tip cells guide neuroretina vascularization and blood-retina-barrier formation. *Developmental cell* 56(15), 2237-2251.

Zhu, L., Gibson, P., Currle, D.S., Tong, Y., Richardson, R.J., Bayazitov, I.T., Poppleton, H., Zakharenko, S., Ellison, D.W., Gilbertson, R.J., (2009). Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 457, 603-607.

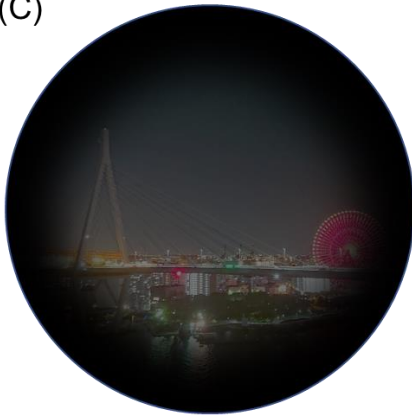
(A)



(B)



(C)



(D)

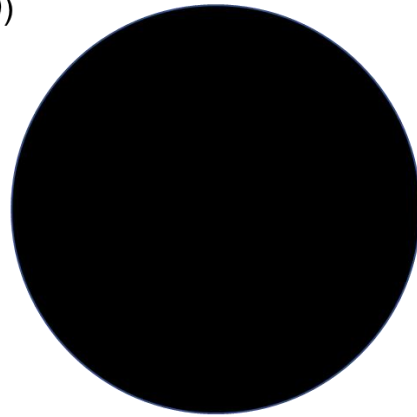


図 1：網膜色素変性症患者の視野イメージ
(A) 正常 (B) 夜盲 (C) 視野狭窄 (D) 失明状態の視野イメージを示す。

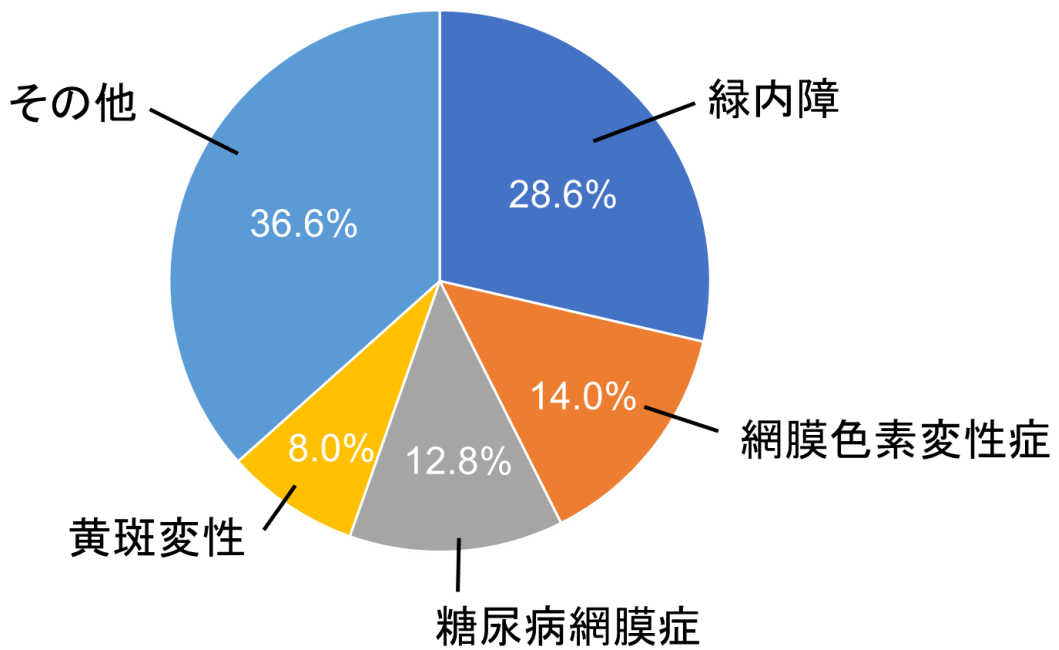


図2 日本人における視覚障害の原因疾患 (Morizane et al., 2019 を基に作図)
 2015年の日本人の視覚障害原因疾患は1位から順に緑内障、網膜色素変性症、糖尿病網膜症、黄斑変性であり、2位に位置づけられる網膜色素変性症は日本人の全視覚障害原因の14%を占める。

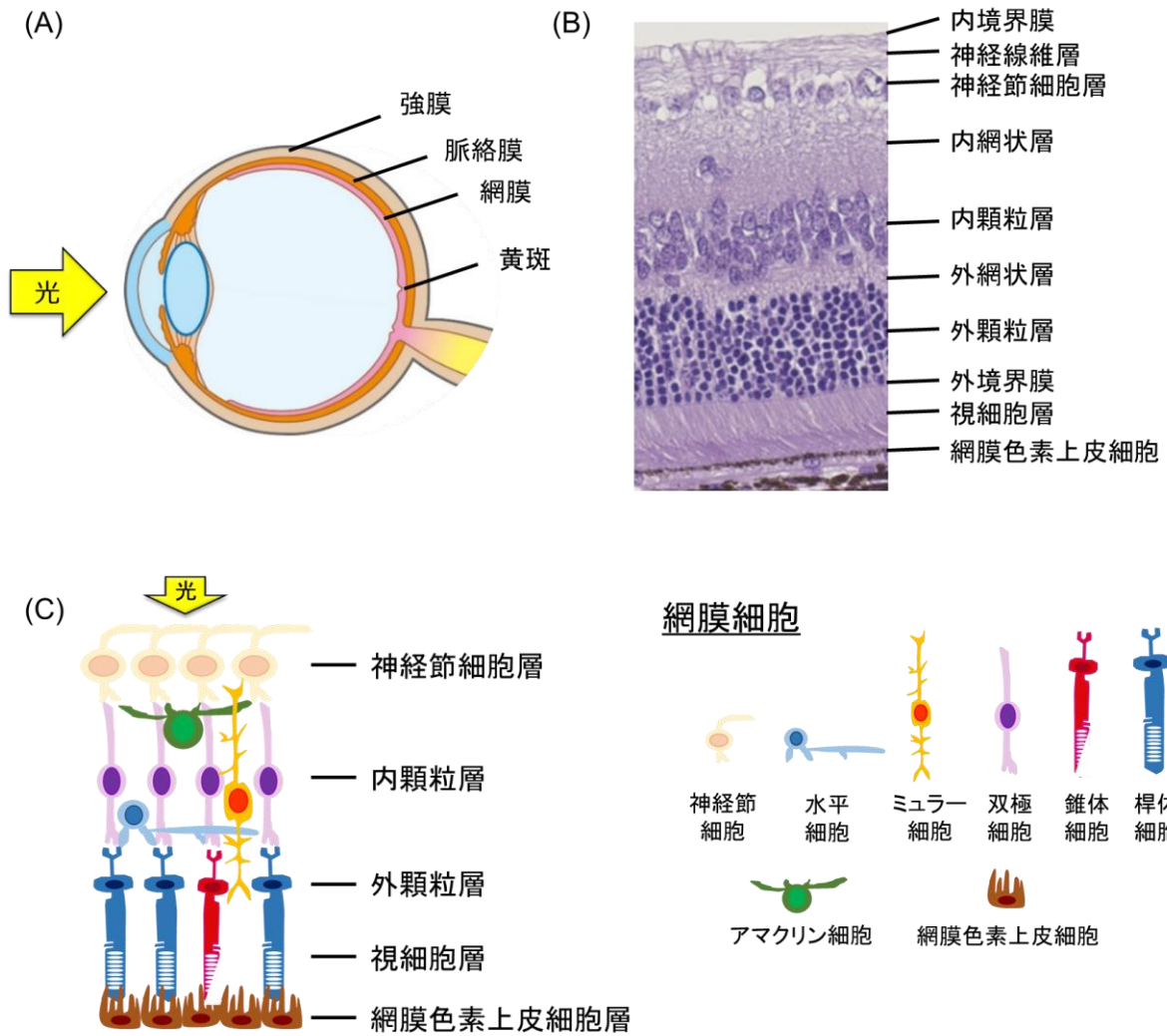


図 3：眼球および網膜構造

(A) 眼球は球状の組織であり、外側から強膜、脈絡膜、網膜の 3 層構造を取る。眼球内に入射した光は網膜中の黄斑部に集まり、像を結ぶ。(B) 網膜は内側から内境界膜、神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層、外網状層、外顆粒層、外境界膜、視細胞層、網膜色素上皮細胞の 10 層から構成される。(C) 代表的な網膜組織中の細胞を示す。内顆粒層には水平細胞、ミュラー細胞、双極細胞、アマクリン細胞などの核が含まれ、外顆粒層には桿体細胞および錐体細胞の核が含まれる。

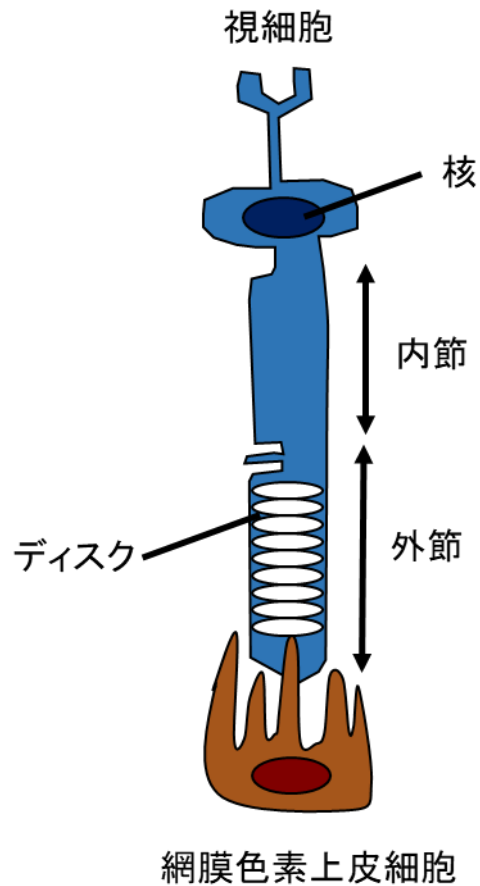


図 4：視細胞の構造

視細胞は細長い細胞構造を有し、核、内節（ミトコンドリアを多く含む）、外節（ディスクと呼ばれる膜構造を多く含む）から構成される。外節部は網膜色素上皮細胞と隣接し、ファゴサイトーシスによって取り込まれ代謝・分解される。

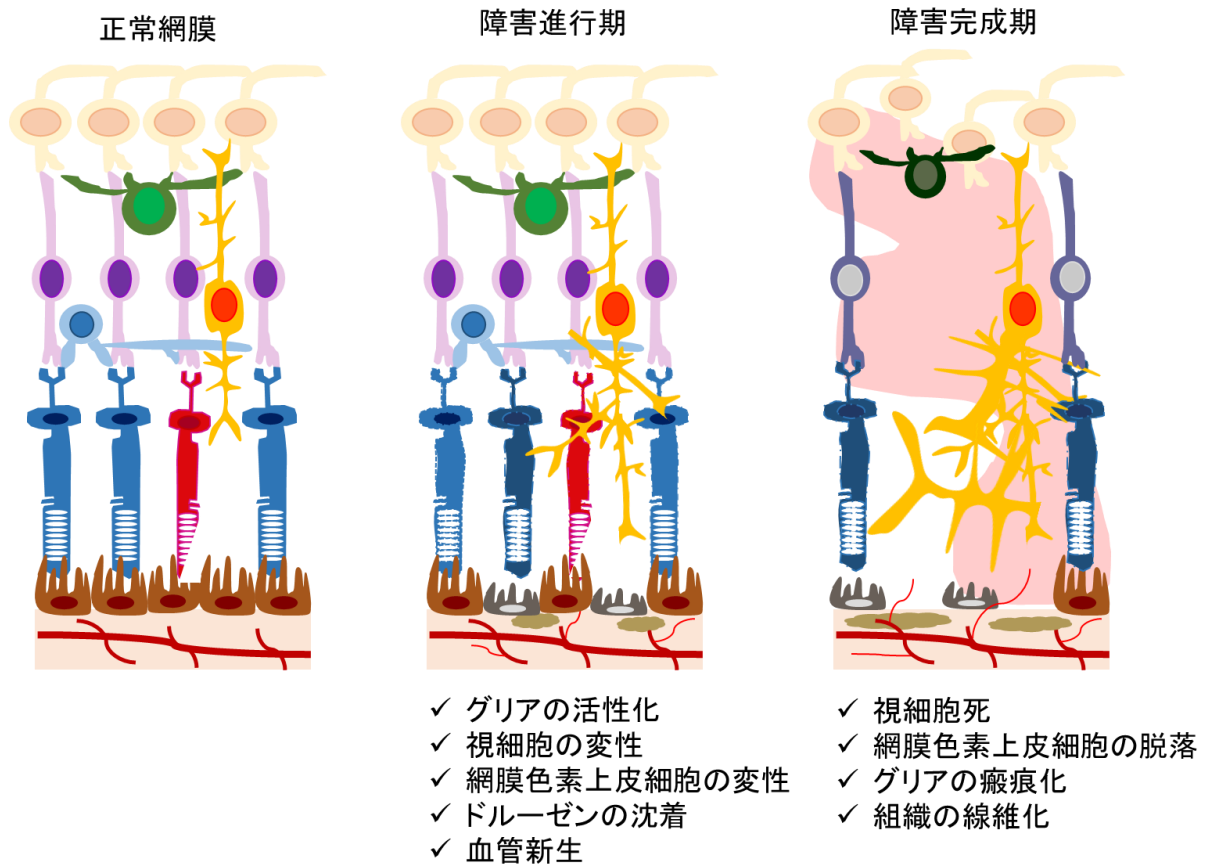


図 5：網膜色素変性症の病態進行概略図

網膜色素変性症の病態進行の様子を示す。障害進行期では視細胞や網膜色素上皮細胞の変性、これらに伴うグリア細胞の活性化や網膜色素上皮細胞下へのドルーゼン（老廃物）沈着が生じ炎症を誘導する。障害完了期では細胞死や瘢痕化・線維化などが生じ、網膜が視機能を維持できなくなる。

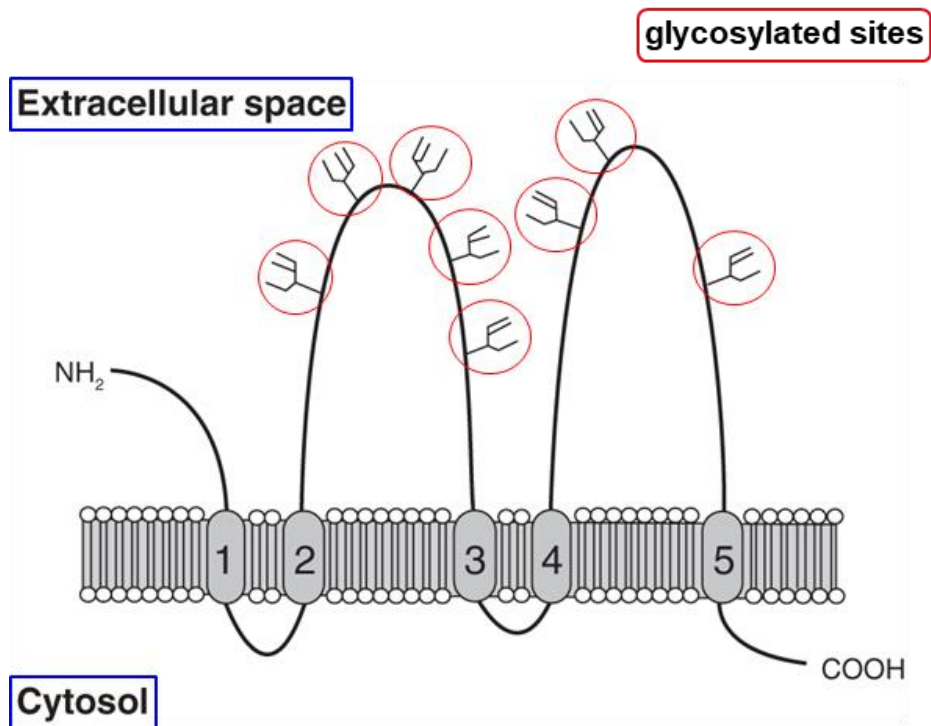


図 6 : Prom1 タンパク質の構造

Prom1 タンパク質は 5 回膜貫通型の膜タンパク質である。細胞外にアミノ末端、細胞内にカルボキシル末端が存在し、細胞外部分に計 8 ヶ所の糖鎖修飾が認められる。



図 7 : マウスへの光刺激の様子

生後 11 日齢のマウスの眼瞼部を切開し、十分散瞳後に LED ライトを用いて光照射を実施する様子を示す。

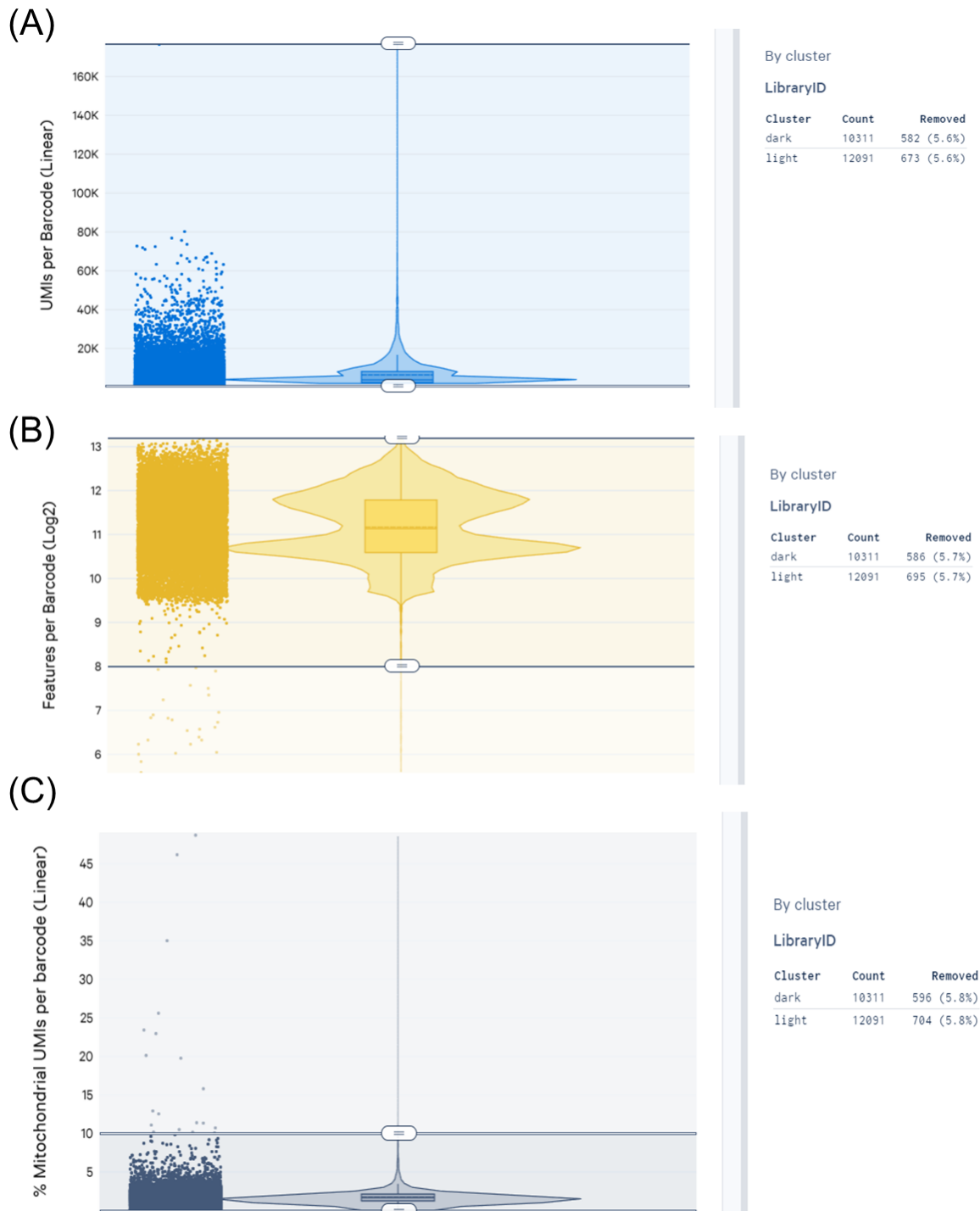
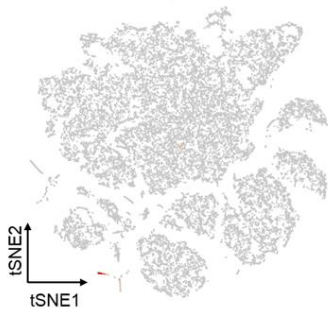


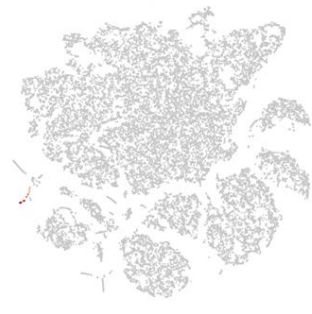
図 8 : Single-cell RNA sequencing データの Quality Check

(A) UMI レベル (B) 遺伝子検出レベル (C) ミトコンドリア由来の遺伝子検出レベルを指標として Quality Check を実施した。UMI が 1000 以下のサンプル、検出遺伝子数が 256 以下のサンプル、ミトコンドリア由来の遺伝子が 10%以上を占めるサンプルについては、Low-quality として除外した。KO Dark では 10,311 細胞のうち 595 細胞 (5.8%)、KO Light では 12,091 細胞のうち 704 細胞 (5.8%) が上記基準により解析データから除外された。

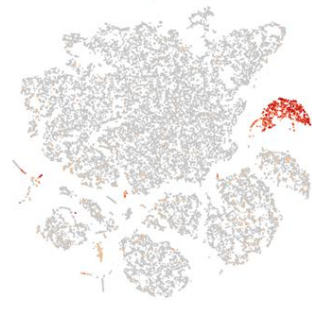
(A) C1qa
(0-9.0)



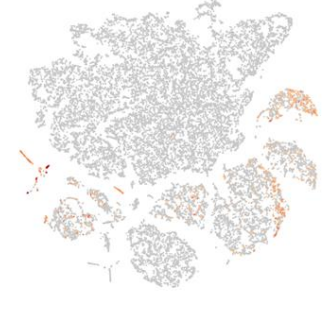
(B) Cldn5
(0-9.0)



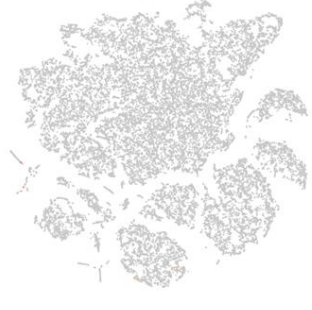
(C) Crym
(0-9.0)



(D) Igfbp5
(0-8.0)



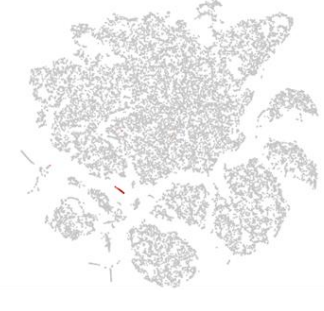
(E) Lhx1
(0-6.0)



(F) Opn1sw
(0-9.0)



(G) RPE65
(0-4.0)



(H) Sncg
(0-9.0)



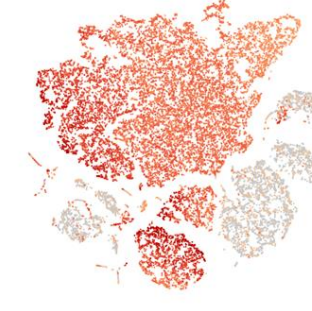
(I) Vsx2
(0-7.0)



(J) Gad1
(0-7.0)



(K) Pdc
(0-8.0)



Log2 Exp

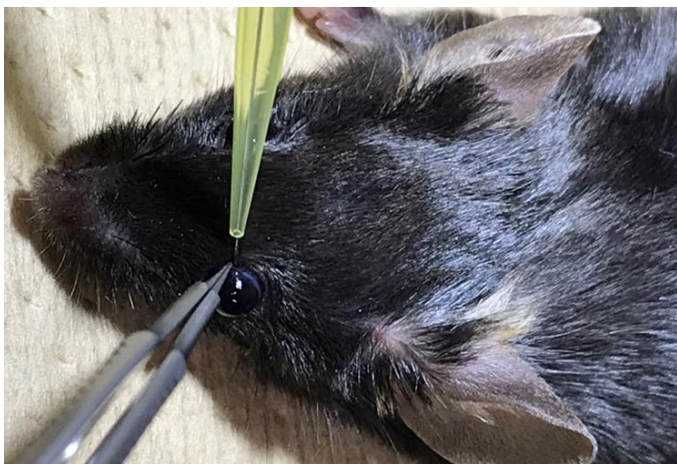


(図の説明は次ページ参照)

図 9 : クラスタ中でのマーカー遺伝子の発現分布

アノテーションに用いた代表的なマーカー遺伝子 (A) C1qa (B) Cldn5 (C) Crym (D) Igfbp5 (E) Lhx1 (F) Opn1sw (G) RPE65 (H) Sncg (I) Vsx2 (J) Gad1 (K) Pdc の発現分布を示す。マーカー遺伝子が示す細胞種名については表 4 を参照。

(A)



(B)

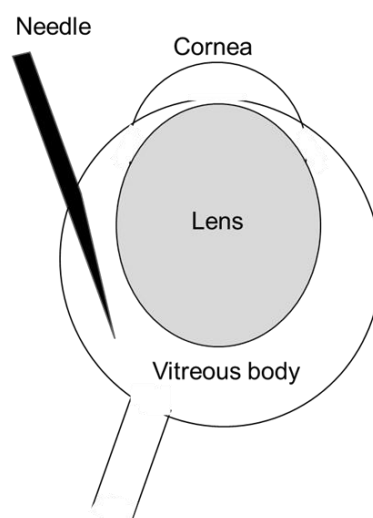
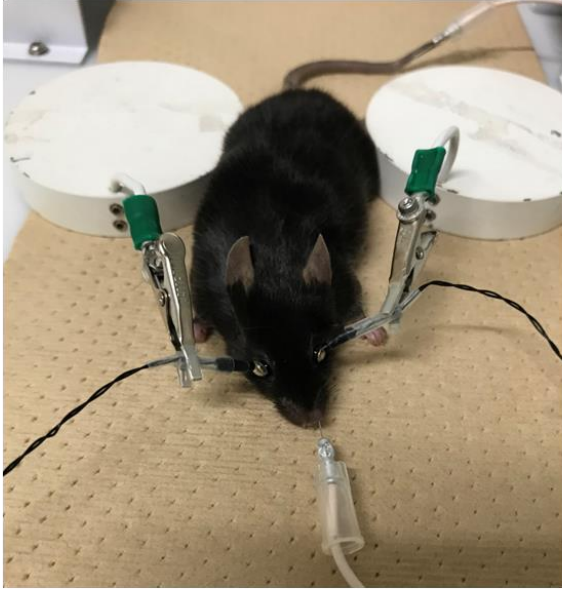


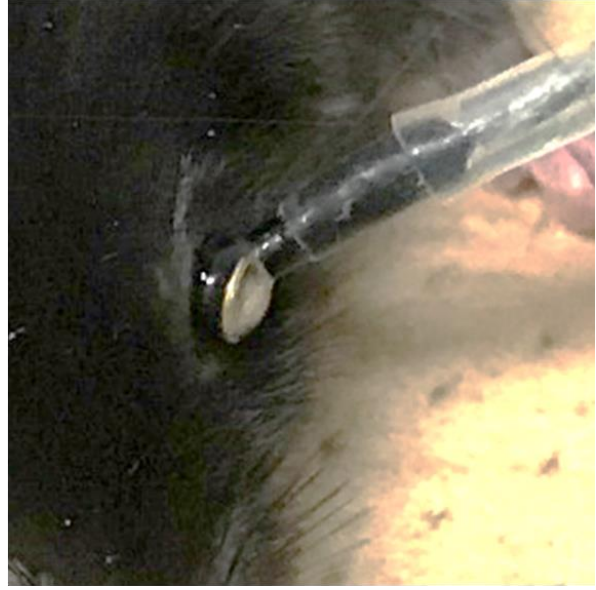
図 10 : マウスへの硝子体内投与

(A) マウスへの硝子体内投与の様子を示す。(B) 硝子体内投与における投与部位を示す。水晶体を避けて強膜部から鋭角に針を侵入させ、硝子体内に投与する。

(A)



(A')



(B)



図 11 : マウスの ERG 測定

(A) マウスの鼻および尾に針電極、(A') 眼球表面にリング型電極を接触させる。(B) 暗室下にて小動物用全視野光刺激装置および LED Visual Stimulator を用いてマウスの眼内に均一に光刺激を行う。

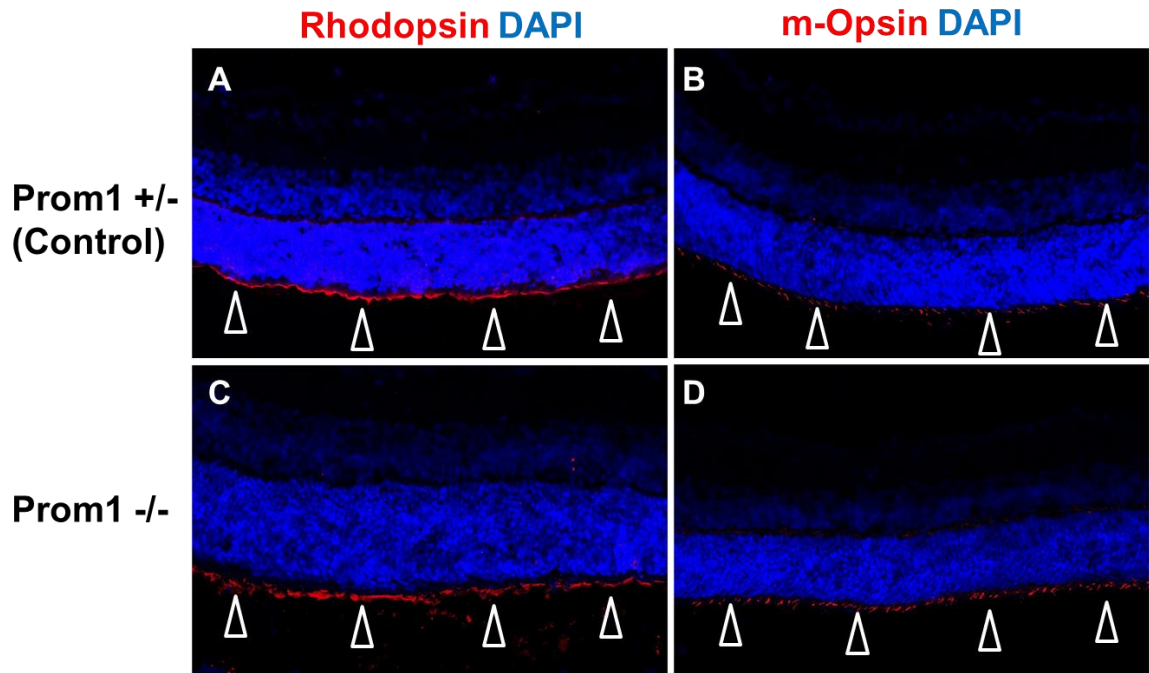


図 12 : 生後 11 日齢のマウス網膜における Rhodopsin および m-Opsin 染色

生後 11 日齢の (A,B) Prom1 +/- および (C,D) Prom1 -/- マウス網膜における (A,C) Rhodopsin (桿体細胞) および (B,D) m-Opsin (錐体細胞) の染色像 (Δ) を示す。いずれの染色においても網膜構造の乱れや著しい視細胞の欠損は認められなかった。

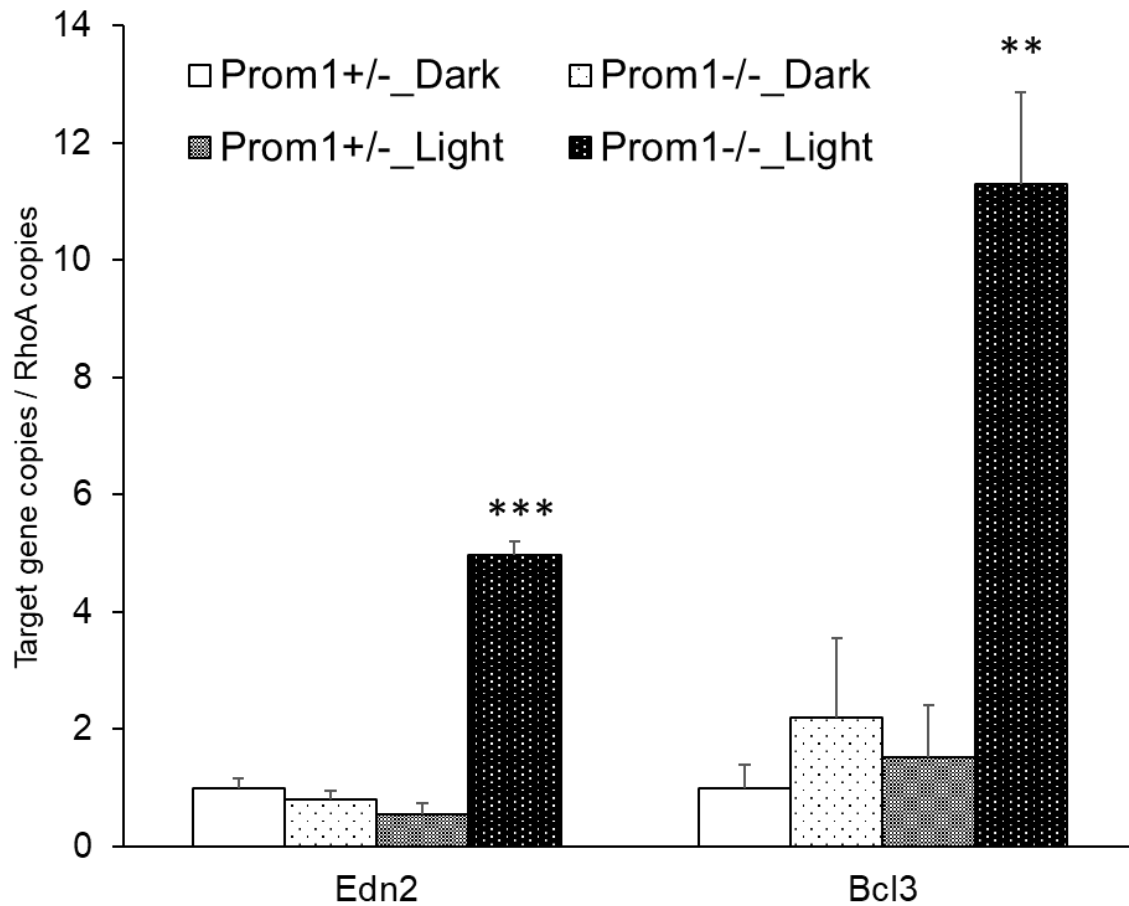


図 13 : 生後 11 日齢のマウスに光刺激後 1 日暗室にて飼育した際の mRNA 発現量 Prom1 +/- および Prom1 -/- マウスにそれぞれ光照射なし (Dark) 、光照射あり (Light) の処置を実施した際の *Edn2* および *Bcl3* の mRNA 発現量を示す。Prom1 +/-_Dark 群と比較し、Prom1 +/-_Light 群では遺伝子発現変化は見られないが、Prom1 -/-_Light 群では *Edn2* および *Bcl3* の有意な発現増加が認められた。MEAN ± SEM, N=4, **p<0.01, ***p<0.001 vs. Prom1 +/-_Dark (t-test)。

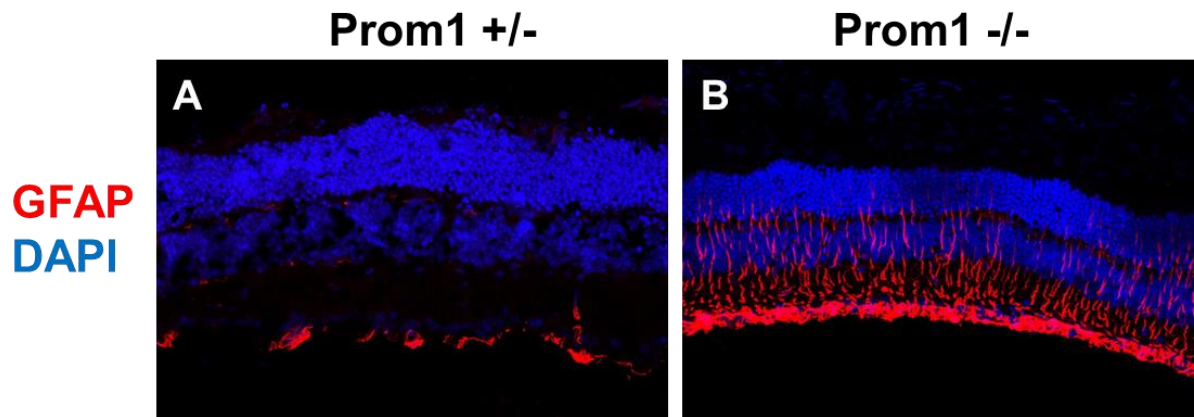


図 14 : 生後 11 日齢のマウスに光刺激後 1 週間暗室にて飼育した際の GFAP 染色 (A) Prom1 +/- および (B) Prom1 -/- マウスに光刺激後、1 週間暗室にて飼育した際の網膜組織中の GFAP 染色像を示す。Prom1 +/- 網膜では GFAP 染色像は神経節細胞層のみに見られるが、Prom1 -/- 網膜では GFAP が外顆粒層まで活性化され、顕著なグリアの活性化 (グリオシス) が認められた。

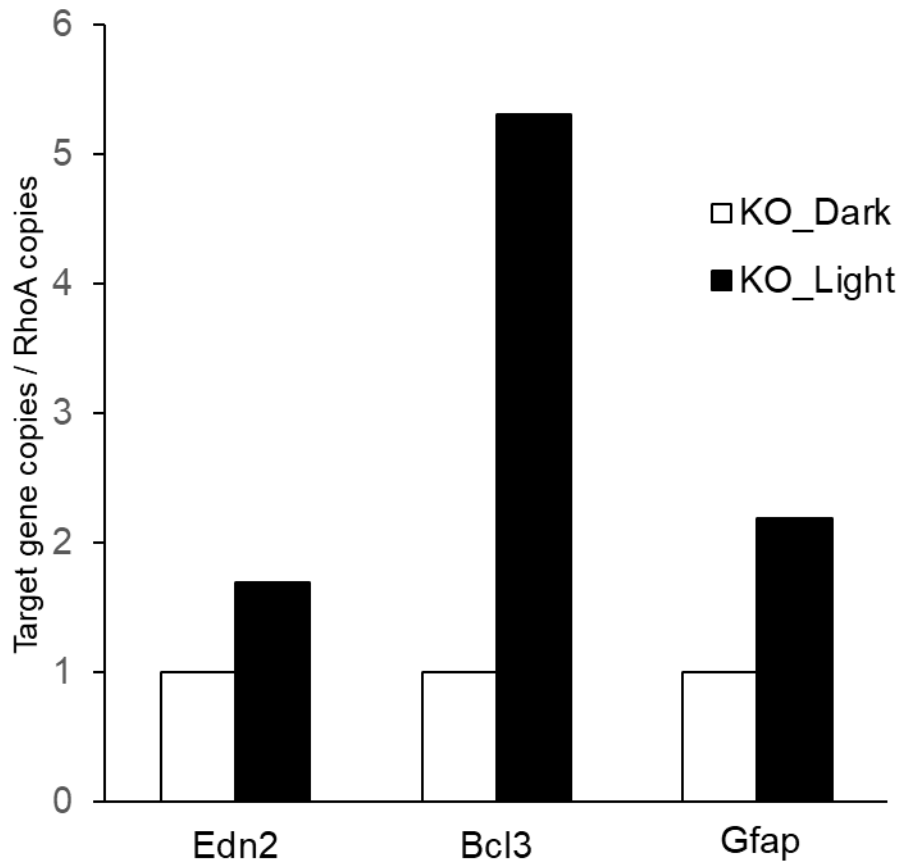
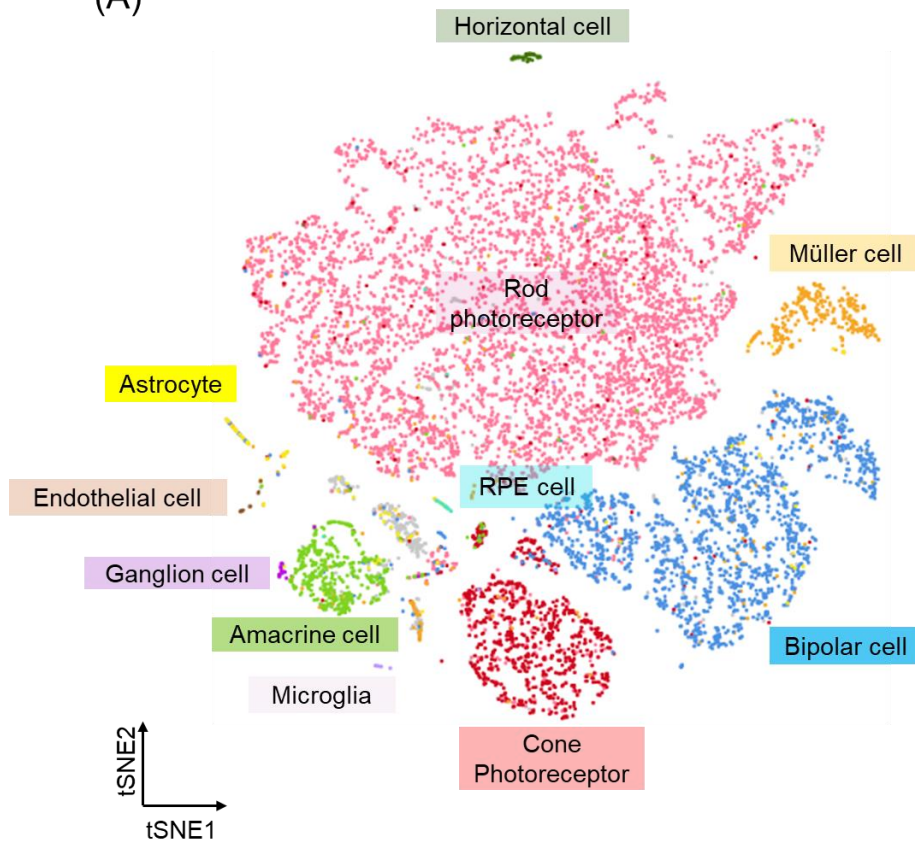
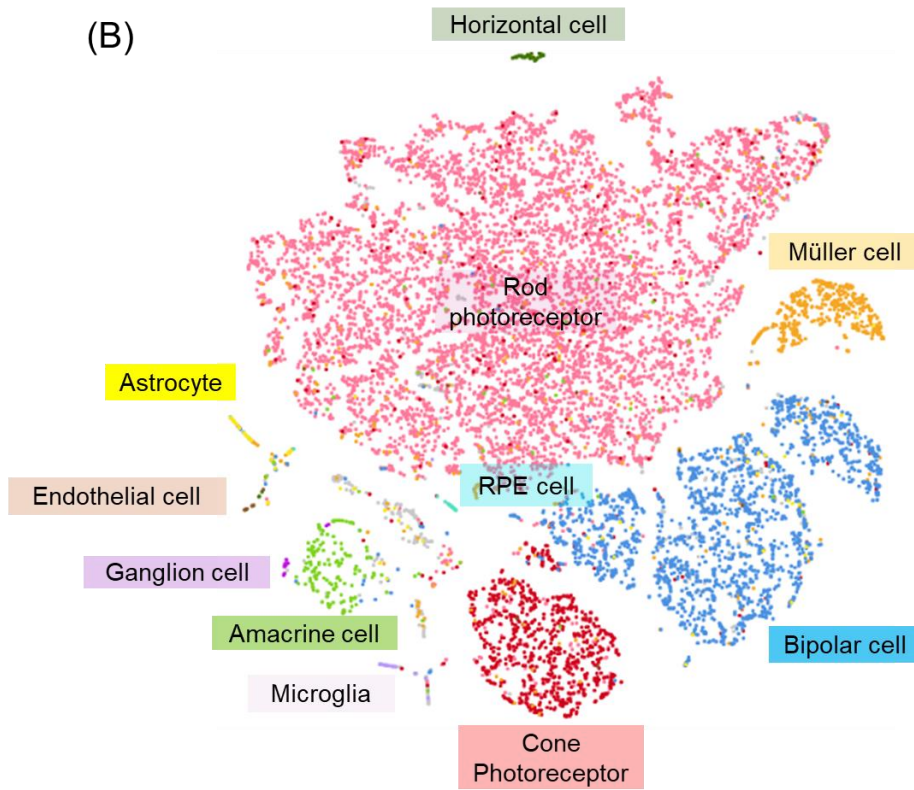


図 15 : Single-cell RNA sequencing に用いたサンプルの mRNA 発現量
 KO Light では KO Dark と比較し、*Edn2*、*Bcl3*、*Gfap* のいずれも mRNA 発現量の増加を確認した。N=1。

(A)



(B)



(図の説明は次ページ参照)

図 16 : アノテーション後のクラスター分類結果

(A) KO Dark (B) KO Light のクラスター分類結果を示す。マーカー遺伝子を用いて網膜組織中の 11 種の細胞（桿体細胞 (Rod photoreceptor)、錐体細胞 (Cone photoreceptor)、アマクリン細胞 (Amacrine cell)、双極細胞 (Bipolar cell)、血管内皮細胞 (Endothelial cell)、網膜色素上皮細胞 (RPE cell)、ミュラー細胞 (Müller cell)、ミクログリア (Microglia)、アストロサイト (Astrocyte)、神経節細胞 (Ganglion cell)、水平細胞 (Horizontal cell)) に分類した。なお、分類できなかった細胞は KO Dark にて 593 細胞 (6.1%)、KO Light にて 700 細胞 (6.1%) であった。

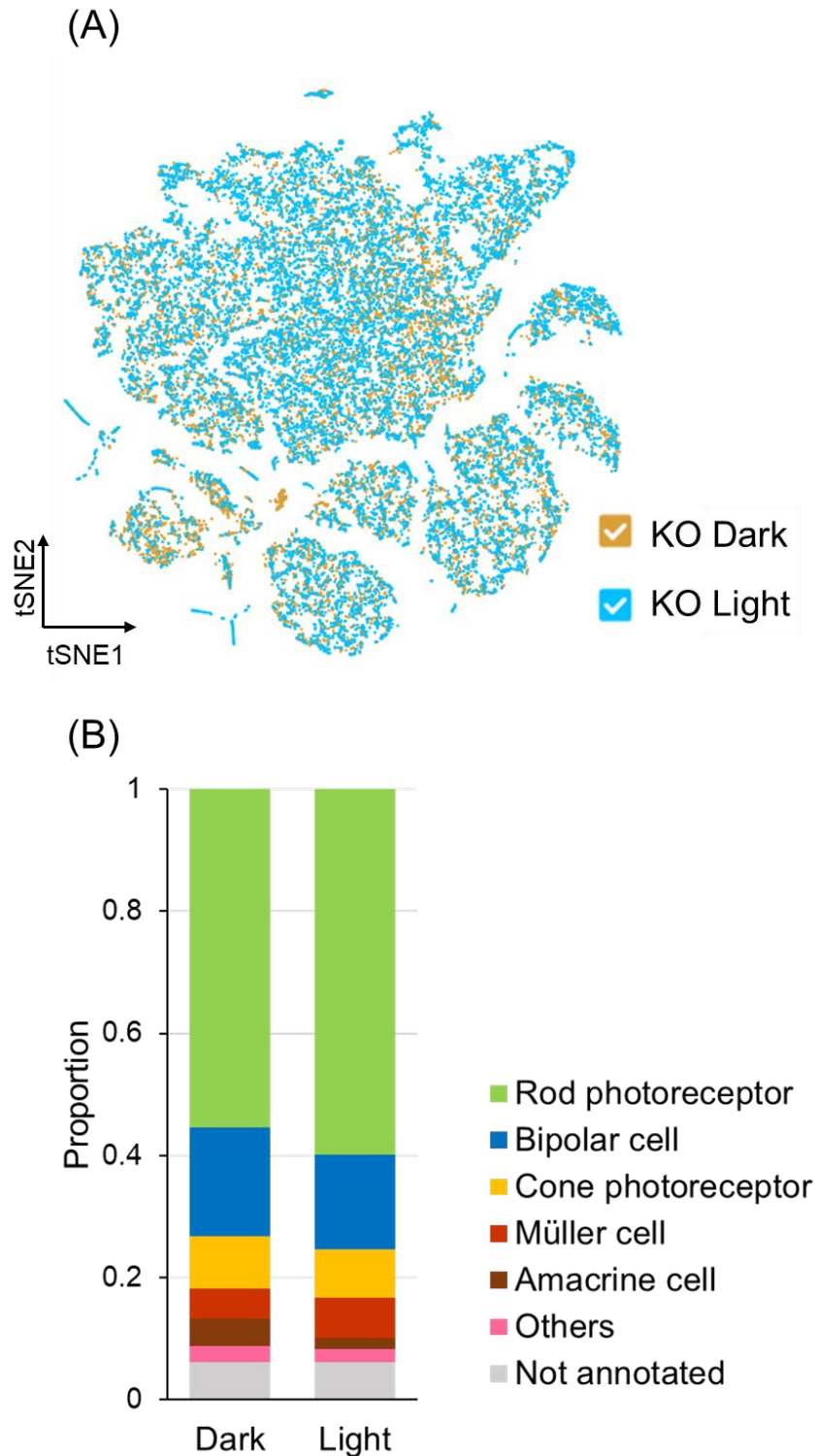


図 17 : KO Dark および KO Light のクラスタリング結果比較

(A) 両サンプルのクラスタリング結果を示す。アノテーション後の KO Dark と KO Light のクラスタリング結果を重ねて比較したところ、各クラスターの分布に大きな変化は認められなかった。(B) KO Dark と KO Light の各クラスターにおける上位 5 種類の Population 比率を示す。共に同一細胞種が同一順位で分布していることが確認された。

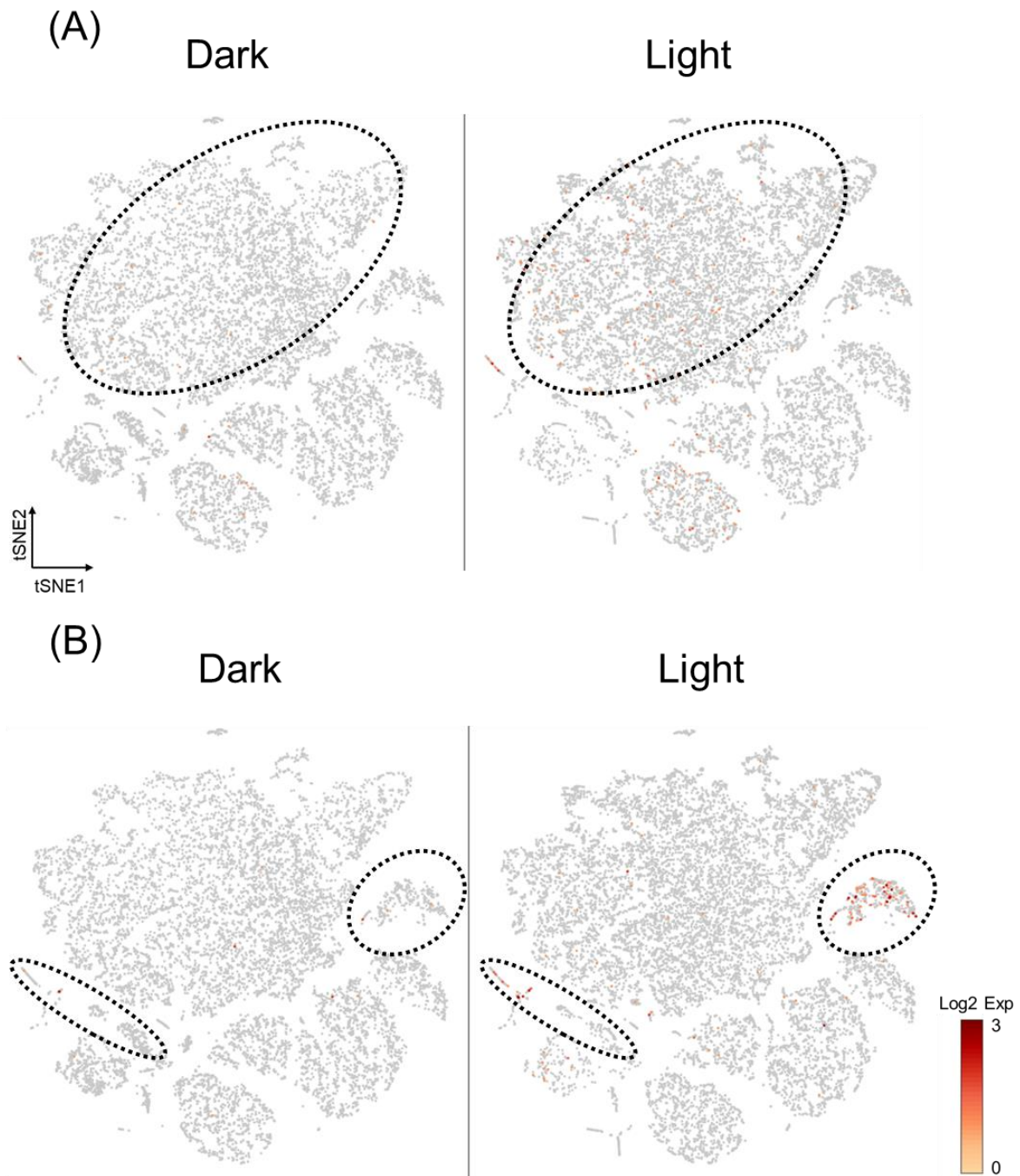


図 18 : KO Dark および KO Light における *Edn2* および *Gfap* の遺伝子発現比較
 (A) *Edn2* (B) *Gfap* の KO Dark および KO Light のクラスターごとの各遺伝子発現レベルを示す。KO Dark と比較し、KO Light では *Edn2* が桿体細胞にて、*Gfap* がミュラー細胞およびアストロサイトにて有意な発現増加を認めた。

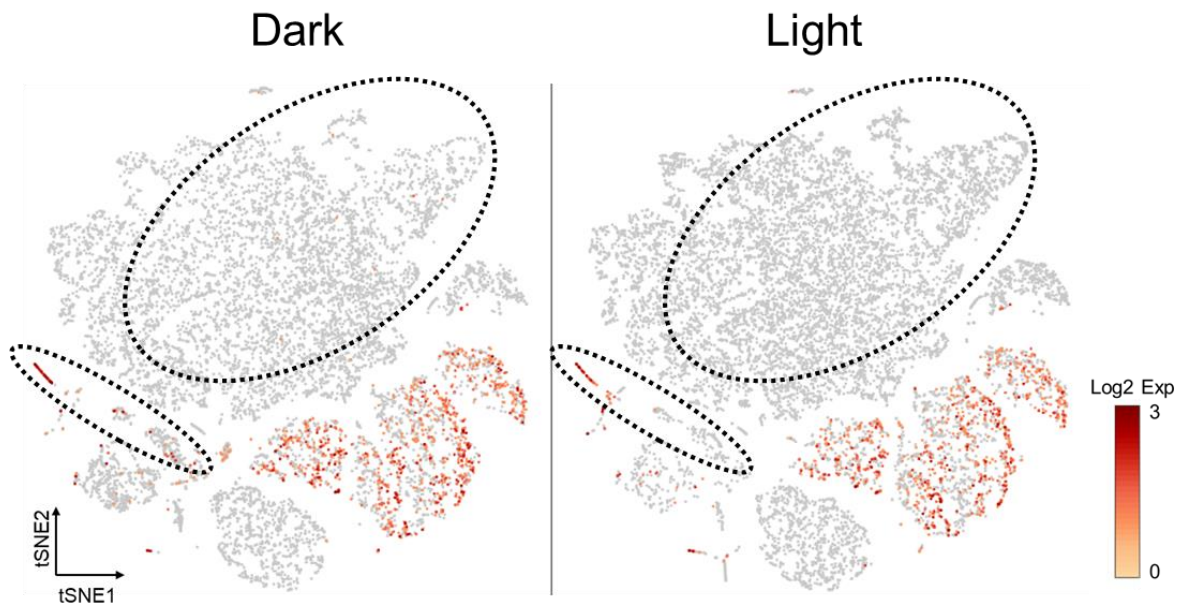


図 19 : KO Dark および KO Light における *Igf1* の遺伝子発現比較
Igf1 の KO Dark および KO Light のクラスターごとの各遺伝子発現レベルを示す。
 KO Dark と比較し、KO Light では桿体細胞およびアストロサイトにて有意な発現
 減少を認めた。

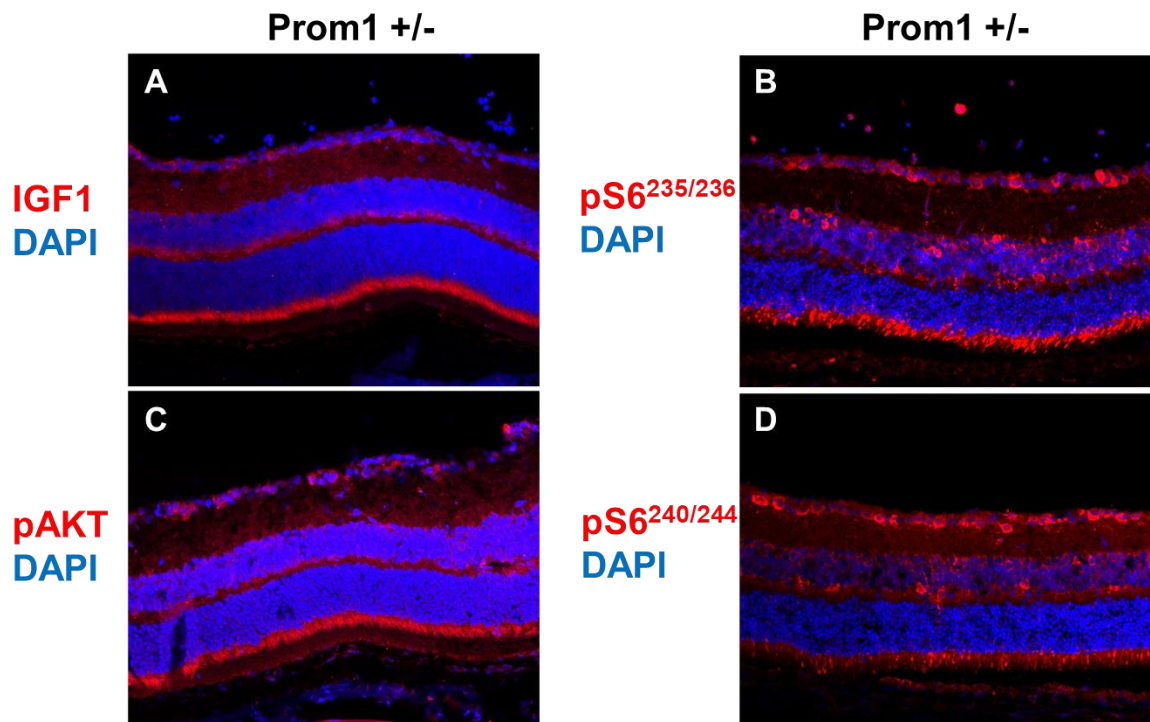


図 20 : マウス網膜における IGF1 および IGF シグナルの染色
 6 週齢の Prom1^{+/-}マウス網膜における (A) IGF1 (B) pAKT (C) pS6^{235/236} (D)
 pS6^{240/244} 染色像を示す。いずれも神経節細胞層、内顆粒層の境界部および視細胞層
 にて発現およびリン酸化シグナルが認められた。

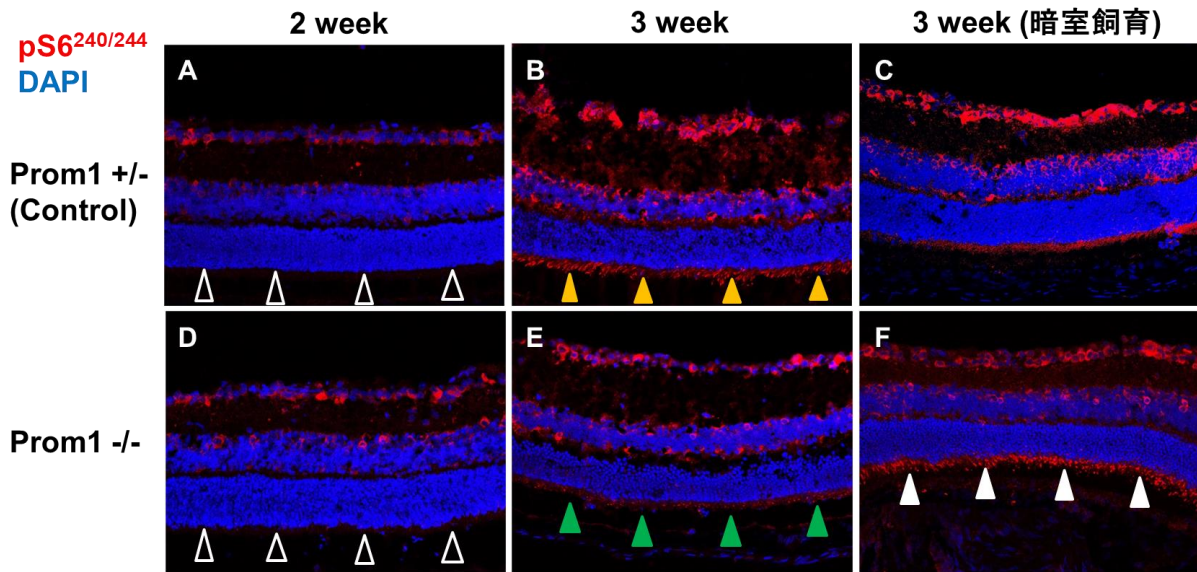


図 21 : 2 週齢、3 週齢および 3 週齢（暗室飼育）の Prom1 +/- および Prom1 -/- マウスにおける網膜組織中の pS6^{240/244} 染色

(A,D) 2 週齢、(B,E) 3 週齢および (C,F) 3 週齢（暗室飼育）の (A-C) Prom1 +/- マウスおよび (D-F) Prom1 -/- マウス網膜における pS6^{240/244} 染色像を示す。2 週齢では共に視細胞層の pS6^{240/244} が認められないが (Δ)、Prom1 +/- マウスでは 3 週齢にて視細胞層でも pS6^{240/244} が観察された (▲ : オレンジ)。一方で、Prom1 -/- マウスでは 3 週齢においても視細胞層の pS6^{240/244} が弱いままであった (▲ : 緑)。暗室下で飼育した場合は、Prom1 +/- マウス、Prom1 -/- マウス共に視細胞層の pS6^{240/244} は強く検出された (▲ : 白)。

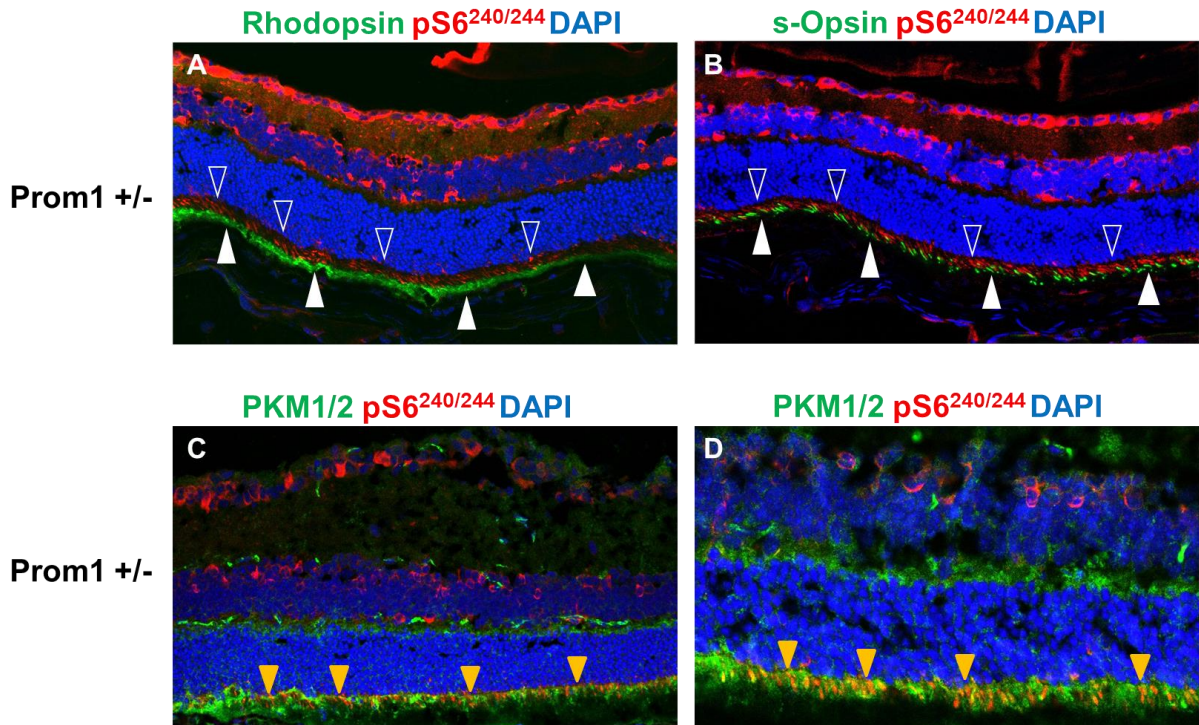


図 22 : 3 週齢の Prom1 +/-マウスにおける網膜組織中の Rhodopsin、s-Opsin もしくは PKM1/2 と pS6^{240/244} の共染色

(A) Rhodopsin および pS6^{240/244} (B) s-Opsin および pS6^{240/244} (C, D; 拡大図) PKM1/2 および pS6^{240/244} の共染色像を示す。Rhodopsin および s-Opsin は視細胞外節を染色するが (▲ : 白)、pS6^{240/244} (△) とは共局在せず、視細胞内節を染色する PKM1/2 と pS6^{240/244} は同部位 (▲ : オレンジ) が染色され、共局在が確認された。

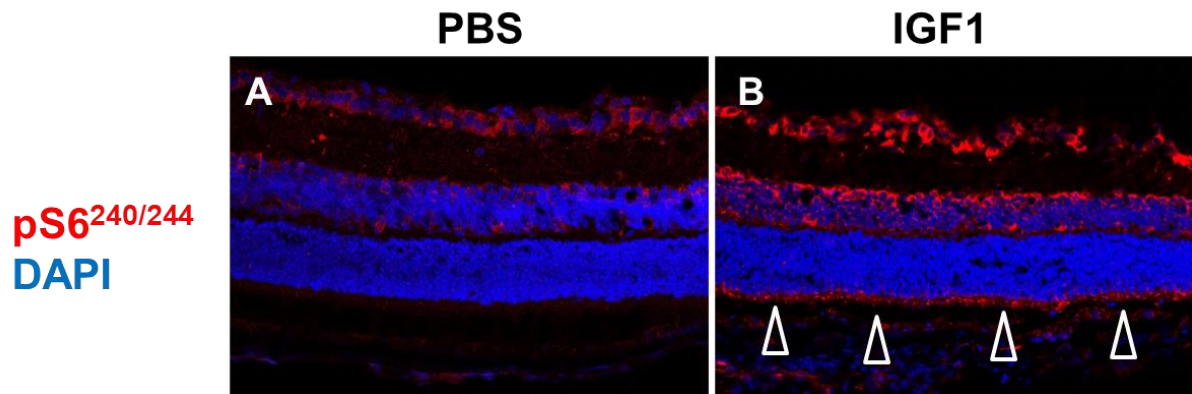


図 23 : 2 週齢の Prom1^{+/-}マウスを用いた IGF1 の硝子体内投与後における網膜組織中の pS6^{240/244} 染色

2 週齢の Prom1^{+/-}マウスに(A) PBS もしくは(B) IGF1 (1 μg/eye) を硝子体内投与し、3 時間後における pS6^{240/244} 染色像を示す。IGF1 投与群では PBS 群と比較し、神経節細胞層、内顆粒層の境界部および視細胞層 (△) においてより強いリン酸化シグナルが認められた。

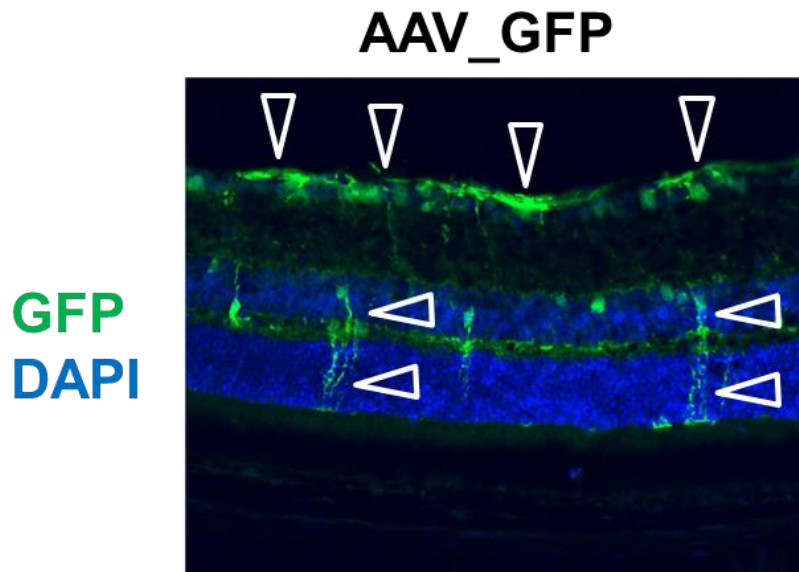


図 24 : AAV_GFP の硝子体内投与 4 週間後における網膜組織中の GFP 染色
2 週齢の Prom1 +/-マウスに AAV_GFP を硝子体内投与した際の 4 週間後における
GFP の抗体染色像を示す。GFP の発現が広く網膜組織内 (△) に認められた。

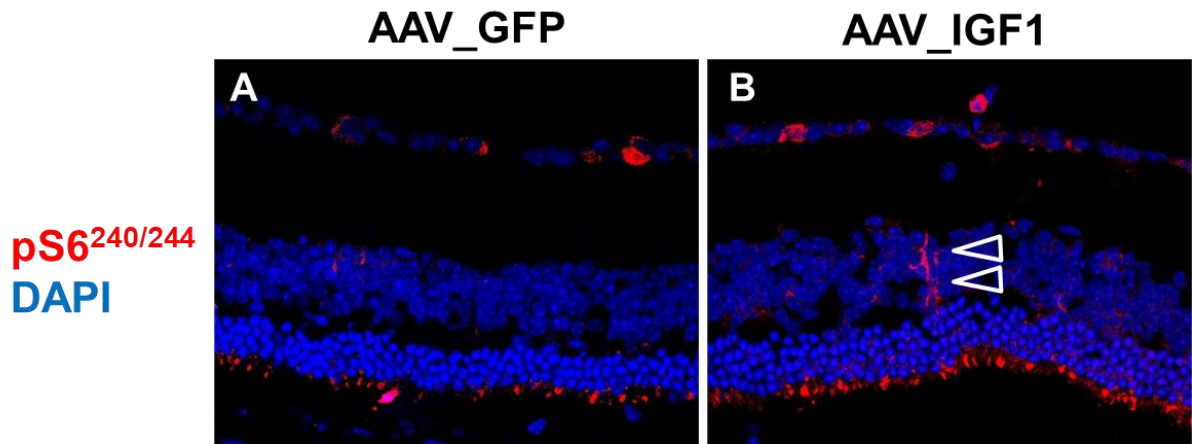


図 25 : AAV の硝子体内投与 4 週間後における網膜組織中の pS6^{240/244} 染色
2 週齢の Prom1 +/-マウスに (A) AAV_GFP もしくは (B) AAV_IGF1 を硝子体内投与した際の 4 週間後における pS6^{240/244} の染色像を示す。AAV_IGF1 投与群では内顆粒層内に pS6^{240/244} 染色 (△) が認められた。

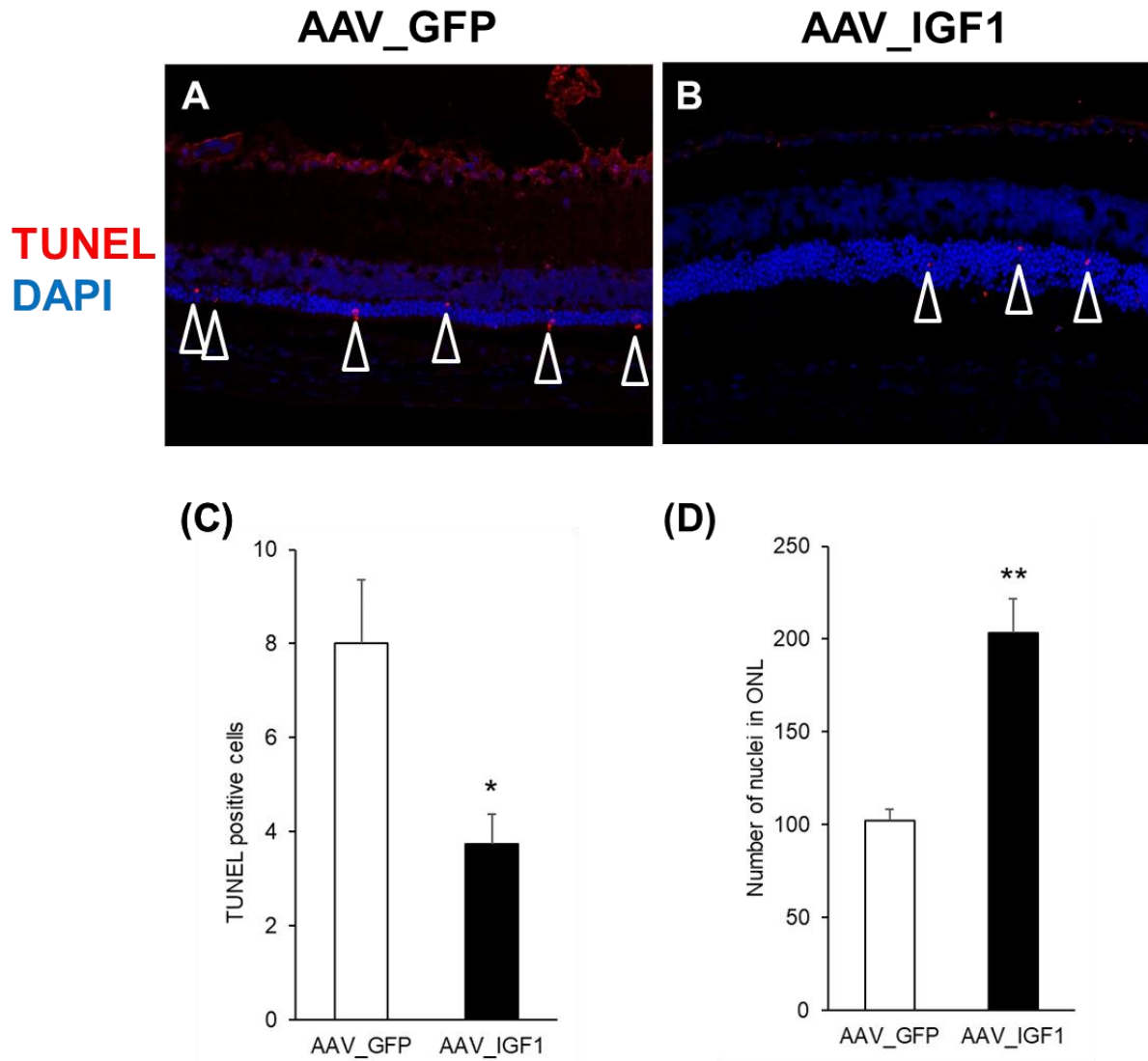


図 26 : AAV の硝子体内投与 4 週間後における網膜組織中の TUNEL 染色
 2 週齢の Prom1^{-/-}マウスに (A) AAV_GFP もしくは (B) AAV_IGF1 を硝子体内投与した際の 4 週間後における TUNEL 染色像を示す。AAV_IGF1 投与群では TUNEL 陽性細胞数 (△) の減少を認めた。(C) TUNEL 陽性細胞数 (D) 外顆粒層の核の数の定量結果を示す。AAV_GFP 投与群と比較し、AAV_IGF1 投与群では、TUNEL 陽性細胞が有意に減少し、視細胞の核である外顆粒層の細胞数が有意に増加していることが確認された。MEAN±SEM, N=4, *p<0.05, **p<0.01 vs. AAV_GFP (t-test)。

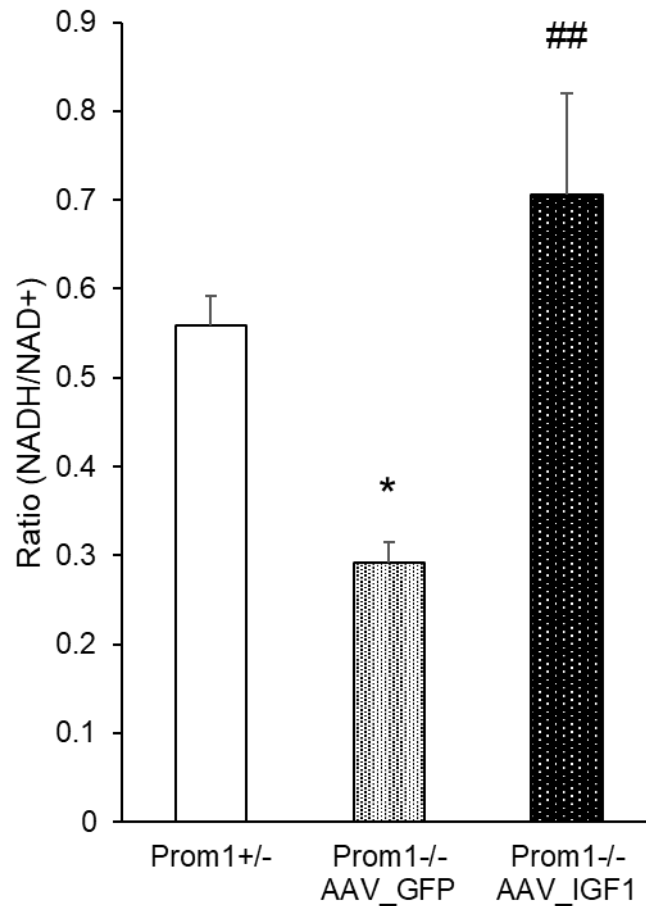


図 27 : AAV の硝子体内投与 4 週間後における網膜組織中の NADH/NAD⁺ ratio
 2 週齢の Prom1^{-/-}マウスに AAV_GFP もしくは AAV_IGF1 を硝子体内投与した際の
 の 4 週間後における網膜組織中の NADH/NAD⁺ ratio を Control である Prom^{+/-}マ
 ウス網膜と比較した際の定量値を示す。Control と比較し AAV_GFP を投与した
 Prom1^{-/-}マウス網膜では NADH/NAD⁺ ratio が有意に低下しており、AAV_IGF1 を
 投与した Prom1^{-/-}マウス群では AAV_GFP を投与した Prom1^{-/-}マウス群と比較し、
 NADH/NAD⁺ ratio が有意に増加していることが確認された。MEAN±SEM, N=6,
 *p<0.05 vs. Prom1^{+/-} (t-test), ##p<0.01 vs. Prom1^{-/-} AAV_GFP (t-test)

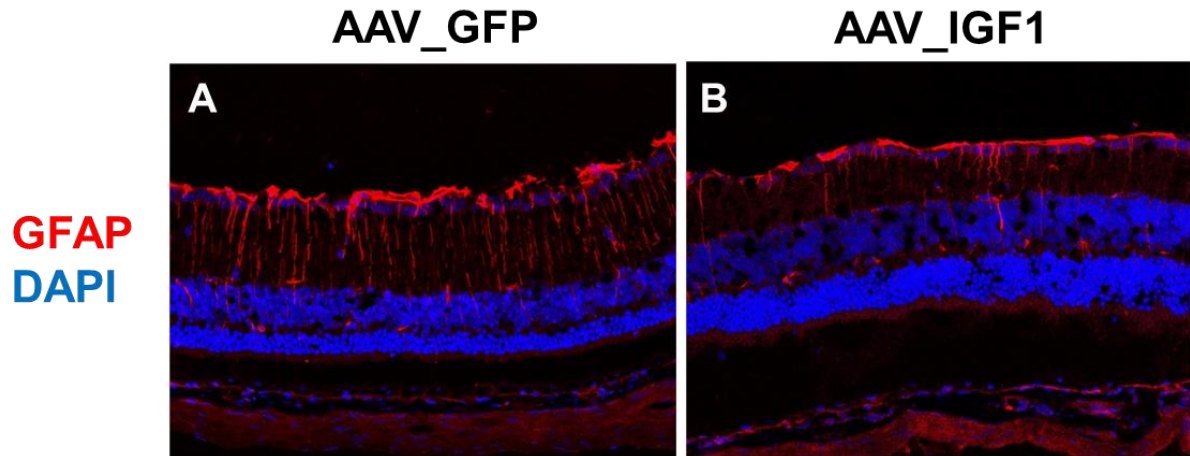


図 28 : AAV の硝子体内投与 4 週間後における網膜組織中の GFAP 染色
 2 週齢の Prom1^{-/-}マウスに (A) AAV_GFP もしくは (B) AAV_IGF1 を硝子体内投与した際の 4 週間後における GFAP 染色像を示す。AAV_GFP 投与群と比較し、AAV-IGF1 投与群ではグリオシス抑制効果を示さなかった。

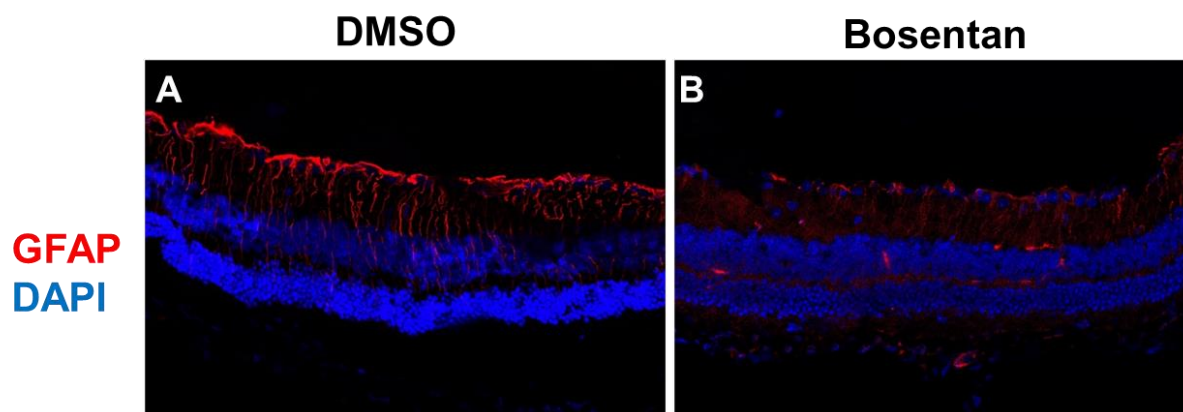
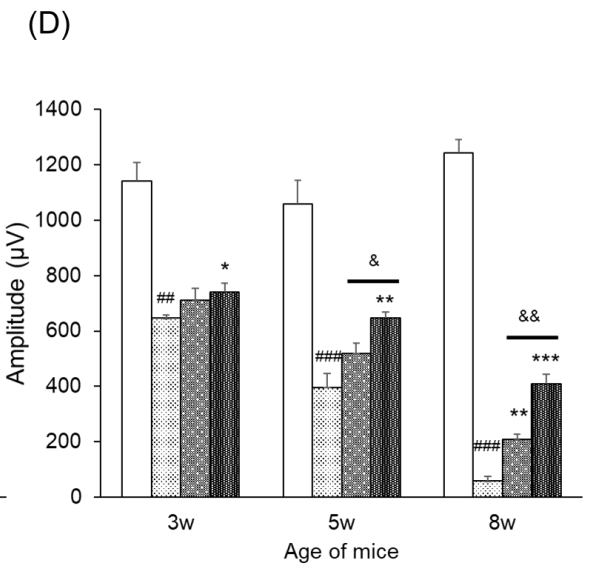
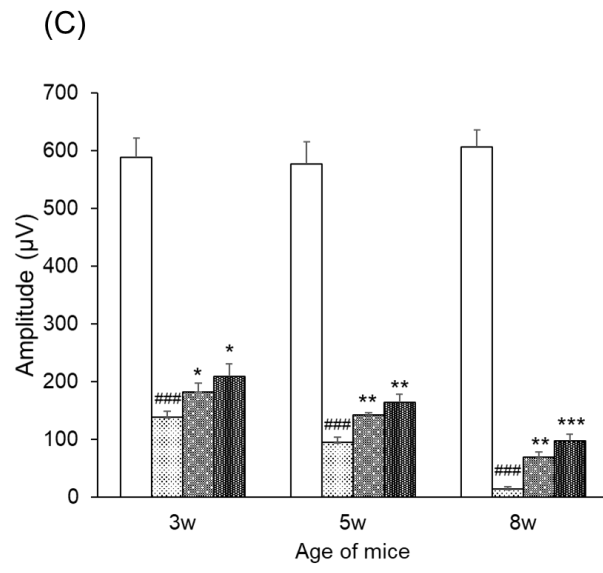
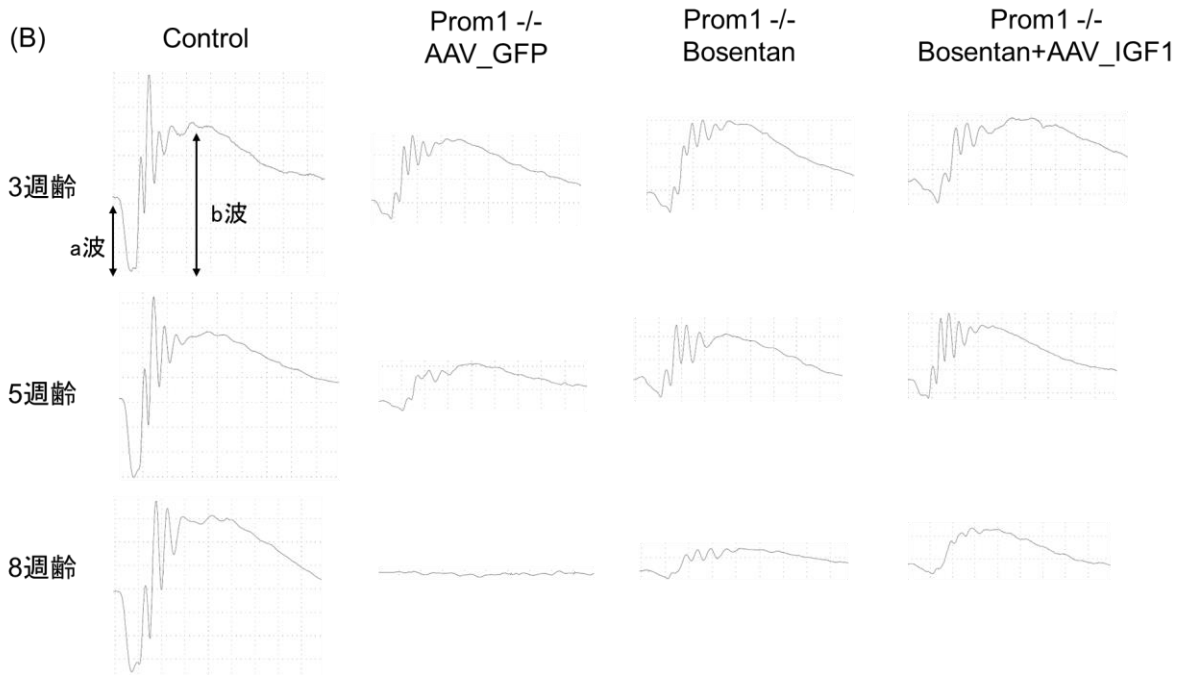
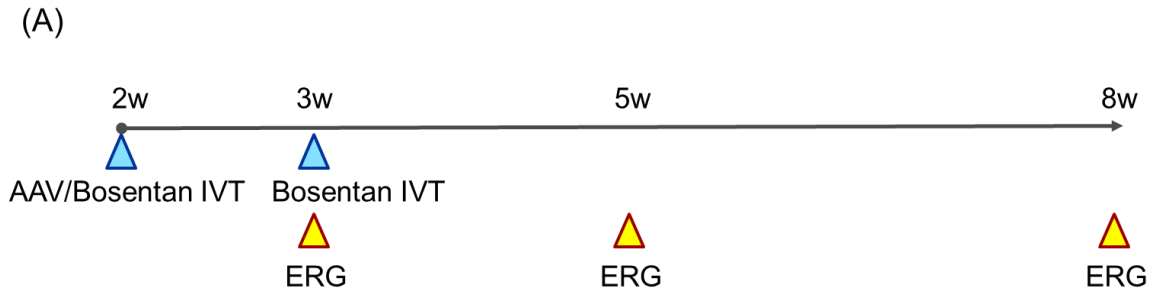


図 29 : Bosentan の硝子体内投与後、6 週齢における網膜組織中の GFAP 染色
 2 週齢の Prom1^{-/-}マウスに (A) DMSO もしくは (B) Bosentan を硝子体内投与
 し、再度 3 週齢時に DMSO もしくは Bosentan を硝子体内投与した際の最終投与か
 ら 3 週間後における GFAP 染色像を示す。Bosentan 投与群では DMSO 投与群と比
 較し、強いグリオシス抑制作用を認めた。



□ Control ■ Prom1 ^{-/-} +Bosentan
 ▨ Prom1 ^{-/-} +AAV_GFP ■ Prom1 ^{-/-} +Bosentan+AAV_IGF1

(図の説明は次ページ参照)

図 30 : AAV および Bosentan 投与後の経時的な ERG 測定データ

(A) ERG 評価時のタイムスケジュールを示す。IVT: Intravitreal injection (B) 各測定の典型波形を示す。(C) a 波 (D) b 波の振幅の定量結果を示す。Control 群では 3 週齢から 8 週齢にかけて振幅の減弱は見られないが、Prom1 ^{-/-} +AAV_GFP 投与群では 3 週齢時点から有意かつ経時的な振幅減少が認められた。Bosentan 投与群では a 波の各測定タイムポイントと b 波の 8 週齢測定時に有意な改善効果が見られるが、Bosentan と AAV_IGF1 の共投与群では全てのタイムポイントで有意な網膜保護効果が得られ、かつ Bosentan 単独投与群と比較し、5 週齢および 8 週齢時点の b 波振幅において有意な併用効果を認めた。MEAN±SEM, N=4, ##p<0.01, ###p<0.001 vs. Control (t-test), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. Prom1 ^{-/-} +AAV_GFP (t-test), &p<0.05, &&p<0.01 vs. Prom1 ^{-/-} +Bosentan (t-test)

表 1 : Prom1 KO マウスのジェノタイピングに用いたプライマー配列および PCR 条件

(A) プライマー配列

PCR primer	Sequence
Prom1_fwd	GCTTGAGAGATCAGGCCAACAAC
Prom1_lacZ_rev	CGCGTAAAAATGCGCTCAGG
Prom1_rev	CTAGAGGGAAGTCATTTCGGCTG

(B) PCR 条件

Step	Temperature(°C)	Time (min)
1	95	5
2-1	94	0.5
2-2	57	1.5
2-3	72	1.5
3	72	5
4	4	∞



 Step2-1~2-3 × 35 cycles

表 2 : Single-cell RNA sequencing に供したサンプルの細胞数および Viability
両処置条件共に scRNA-seq を実施可能な基準(細胞数: 1.0×10^5 cells 以上、Viability:
70%以上) を満たしていることを確認した。

No.	処置条件	細胞数 (cells)	Viability (%)
1	KO Dark	1.23×10^6	82
2	KO Light	1.46×10^6	79

表 3 : Single-cell RNA sequencing の解析結果 (Quality Check 実施前)
いずれのサンプルも想定通りの細胞数 (約 1.0×10^4 cells) を検出した。

	KO Dark	KO Light
Estimated number of cells	10311	12091
Mean reads per cell	31610	30279
Median genes per cell	2358	1928

表 4 : アノテーションに用いた各細胞のマーカー遺伝子

Cell type	Marker gene
Rod photoreceptor	Sag, Rho, Pdc, Gngt1, Rp1
Bipolar cell	Nrxn3, Vsx2
Cone photoreceptor	Opn1sw
Müller cell	Crym
Amacrine cell	Gad1
Astrocyte	Igfbp5
Horizontal Cell	Lhx1, Prox1
Endothelial Cell	Cldn5
Microglia	C1qa
RPE cell	RPE65
Ganglion cell	Sncg, Pou4f1

表 5 : 抗体染色に用いた抗体情報

(A) 一次抗体

Target	Host	Manufacturer	Dilution
Rhodopsin	Mouse	Novus Biologicals	× 1000
m-Opsin	Rabbit	Millipore	× 1000
s-Opsin	Goat	Rockland Immunochemicals	× 1000
PKM1/2	Mouse	R&D systems	× 500
GFAP	Rabbit	Protein Technology	× 1000
GFAP	Mouse	SIGMA	× 1000
GFP	Sheep	AbD Serotec	× 1000
IGF1	Rabbit	Cell Signaling Technology	× 1000
pAKT	Rabbit	Cell Signaling Technology	× 1000
pS6 ^{235/236}	Rabbit	Cell Signaling Technology	× 1000
pS6 ^{240/244}	Rabbit	Cell Signaling Technology	× 1000

(B) 二次抗体

Target	Fluorescence	Manufacturer	Dilution
Anti-Mouse IgG (H+L)	FITC	Jackson ImmunoResearch Laboratories	× 500
Anti-Rabbit IgG (H+L)	FITC	Jackson ImmunoResearch Laboratories	× 500
Anti-Sheep IgG (H+L)	FITC	Jackson ImmunoResearch Laboratories	× 500
Anti-Mouse IgG (H+L)	Cy3	Jackson ImmunoResearch Laboratories	× 500
Anti-Rabbit IgG (H+L)	Cy3	Jackson ImmunoResearch Laboratories	× 500
Anti-Sheep IgG (H+L)	Cy3	Jackson ImmunoResearch Laboratories	× 500

表 6：定量 RT-PCR に用いたプライマー配列および PCR 条件

(A) プライマー配列

PCR primer	Sequence
mEdn2_QPF	GGACATCATCTGGGTGAACA
mEdn2_QPR	CAGAAGGTAGCACAGGCAGA
mBcl3_QPF	TGCTGAACCTGCCTACTCAC
mBcl3_QPR	CAGCGGCTATGTTATTCTGG
mGFAP_QPF	TGGAGGAGGAGATCCAGTTC
mGFAP_QPR	GAGTGCGAATCTCTCTCAGG
mRhoA_QPF	GAATGACGAGCACACGAGAC
mRhoA_QPR	CCATATCTCTCTGCCTTCTTCAGG

(B) PCR 条件

Step	Temperature(°C)	Time (sec)
1	96	180
2-1	96	15
2-2	60	60
3	65	5
4	95	5

↑ ↓ Step2-1~2-2 × 40 cycles

表 7 : ERG 測定条件

項目	設定値
刺激輝度 (Stim)	3162 cd/m ²
刺激時間 (Time)	10 msec
背景光輝度 (Back)	0 cd/m ²
ハイカットフィルタ(HC.F)	500 Hz
ローカットフィルタ (LC.F)	0.5 Hz

表 8 : Single-cell RNA sequencing 解析のアノテーション内訳および細胞種ごとの変動遺伝子数

各群分類できなかつた細胞が約 6%存在したが、これらの細胞は両群間で同割合であった。また変動遺伝子は視細胞である桿体細胞および錐体細胞やミュラー細胞およびアストロサイトなどのグリア細胞で多く認められた。一方で、網膜色素上皮細胞や神経節細胞では有意に変動した遺伝子は存在しなかつた。

Cell type	Number of cells		% of cells		Number of up-regulated genes (p<0.05)	Number of down-regulated genes (p<0.05)
	Dark	Light	Dark	Light		
Rod photoreceptor	5376	6812	55.3	59.8	145	126
Bipolar cell	1733	1780	17.8	15.6	17	9
Cone photoreceptor	835	894	8.6	7.9	31	37
Müller cell	478	757	4.9	6.6	106	433
Amacrine cell	444	193	4.6	1.7	28	4
Astrocyte	118	102	1.2	0.9	308	672
Horizontal Cell	52	48	0.5	0.4	0	0
Endothelial Cell	28	29	0.3	0.3	2	1
Microglia	20	36	0.2	0.3	0	0
RPE cell	19	24	0.2	0.2	0	0
Ganglion cell	19	12	0.2	0.1	0	0
Not annotated	593	700	6.1	6.1	—	—
Total	9715	11387	100.0	100.0	—	—

表 9 : エンドセリン受容体阻害剤 (Ednr antagonist) の一覧

2 種類のエンドセリン受容体 (ETA, ETB) のうち、マシテンタンとボセンタン水和物は ETA と ETB の両受容体阻害剤、アンブリセentan とクラゾセentan ナトリウムは ETA 選択的な阻害剤である。なお、BQ-123 と BQ-788 以外の化合物は、医薬品として上市されている。(*ETA>ETB)

Ednr antagonist	ETA	ETB
BQ-123	✓	—
BQ-788	—	✓
マシテンタン	✓*	✓*
ボセンタン水和物	✓	✓
アンブリセentan	✓	—
クラゾセentan ナトリウム	✓	—