

論文内容の要旨

申請者氏名 重 定 直 弥

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変性により、視機能が低下する遺伝性眼疾患である。本邦における視覚障害原因の第2位であるが、現状有効な治療法は存在しておらず、その開発が急務となっている。

Prominin-1(Prom1)は網膜色素変性症の原因遺伝子の1つであり、Prom1 のノックアウト(KO)マウスではヒト同様に網膜障害が生じることを確認しているが、この視細胞機能低下は光刺激依存的であることが示されている。そこで本研究では、この光刺激に依存して視細胞の変性初期に発現量が増加する遺伝子と細胞を、精度の高いシングルセル遺伝子発現解析 (single-cell RNA sequencing: sc-RNAseq) を行うことにより、同定することにした。

本研究では、生後10日齢のProm1 KOマウスに光刺激を与えた上でsc-RNAseqを行い、光刺激を受けていないProm1 KO網膜と比較することにより、網膜障害初期における単一細胞ごとの遺伝子変動を解析した。その結果、桿体細胞ならびにミュラーグリア細胞群およびアストロサイト群で多数の遺伝子の発現量の変化が認められた。したがって、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ることが示された。

またこの遺伝子発現解析では、光照射条件の桿体細胞群およびアストロサイト群においてInsulin-like Growth Factor1 (IGF1) 遺伝子の発現レベルの低下が認められた。そこで、IGFシグナルの活性化レベルを抗体染色法により評価したところ、Prom1 KOマウスの視細胞層においてたしかに活性化レベルが減弱していることが明らかとなった。このことから、IGFシグナルの低下がProm1 KOマウスにおける網膜障害の原因となる可能性が示唆された。

そこで、アデノ随伴ウイルスベクター (Adeno-associated virus; AAV) の硝子体内投与によってIGF1を網膜に補償的に導入した。その結果、AAV-IGF1投与群では視細胞の細胞死に対して抑制作用が認められ、IGF1が視細胞保護に有用であることが示された。次に、エンドセリン受容体アンタゴニストとAAV-IGF1をProm1 KOマウスに併用投与し、網膜電図を指標とした網膜機能を評価したところ、コントロール群およびエンドセリン受容体アンタゴニスト単独投与群と比較して網膜障害進行に対して有意な抑制作用が確認された。

以上より、Prom1 遺伝子変異を原因とする網膜色素変性症の網膜障害初期には視細胞のIGFシグナルの低下が関与しており、IGF1の遺伝子導入によって視細胞の細胞死抑制およびエンドセリン受容体アンタゴニストとの併用により網膜機能保護作用を発揮することが明らかとなった。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 重 定 直 弥

網膜色素変性症のような難治性眼疾患の治療方法としては、これまでに幹細胞からの網膜細胞分化システムを利用した再生医療が提案されている。この方法は根治療法としての実用化が期待されている一方、未だ開発段階であり、実用化されるまでには相当の時間が必要とされると考えられる。したがって、薬剤または遺伝子導入による症状進行の遅延法、すなわち対症療法が、このような最新の医療を相補する方法として期待されている。

本研究は網膜色素変性症モデルマウス (Prominin-1 (Prom1) ノックアウトマウス) を使用して、表現型が発出する一次的段階を捕捉し、その段階で発現が変動する遺伝子とその細胞を同定することや、その遺伝子・シグナルの発現量・強度を操作することにより、表現型の進行度を軽減することを目的としたものである。

解析においては、Prom1 ノックアウトマウスに対して光照射を与え、それに反応して発現が変動する遺伝子とその細胞を、シングルセルレベルの遺伝子発現解析によって同定した。その結果、これまでに光刺激に反応して惹起することが知られているエンドセリン遺伝子の発現量が光受容細胞でたしかに上昇していることが確認された。それに加え、本研究では、インスリン様増殖因子 IGF1 の発現がアストロサイトと光受容細胞で減少することが明らかになった。実際にノックアウトマウスに対する光刺激により、その下流シグナル系が弱化していることが観察された。一方、アデノ随伴ウイルスを用いて IGF1 の発現を補償すると、細胞死が抑制されることが明らかになった。また、IGF1 の発現量と光受容細胞における解糖系の惹起が関連していた。一方、グリアの異常活性化 (グリオシス) は主にエンドセリンによって引き起こされるものであり、これと IGF シグナルとは独立の経路で働くことが示唆された。実際に、光受容細胞の電気生理学的解析から、エンドセリン阻害剤と IGF の共導入によって網膜機能が改善することが明らかになった。

本研究によって、エンドセリンによる神経炎症の惹起と解糖系の弱化は同時に独立で起きることを示したことは、網膜変性の初期表現型に新規の洞察を与えるもので、特に解糖系が新たなターゲットになりうることを示した点で重要である。また、エンドセリン、IGF とともに細胞外因子であるため、その発現量やシグナル強度の操作は細胞内因子に比べて容易であり、将来的な網膜色素変性症の治療戦略としても高い実現可能性を含んでいる。

以上のように、本論文は網膜変性の一次的表現型を捕捉して、その表現型の補償方法を組織学的、機能的に示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由[凶書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】