

論文の内容の要旨

論文題目 **Characteristics of Novel Hereditary Retinal Degeneration Mice Derived from ICR Mouse Strain**

(ICR マウスに由来する新規遺伝性網膜変性マウスの特徴)

氏 名 宮本 実

ヒトは外界からの情報の約 80%を視覚から得ていると言われている。そのため、失明あるいは視覚異常は **Quality of Life** の著しい低下を招く。失明あるいは視覚異常につながる原因は多数存在するが、遺伝性網膜疾患も主な原因の一つである。これらの疾患の多くは視細胞の機能および生存に重要な役割を果たしているタンパク質をコードした遺伝子の変異によって誘発される。網膜色素変性症は代表的な遺伝性網膜疾患であり、発症頻度は 4,000 人に 1 人と言われている。初発症状は夜盲であり、加齢と共に進行する網膜変性（視細胞死）によって視野狭窄が起り、最終的に失明に至る。これまでに約 40 の原因遺伝子が報告されているが、未だ原因遺伝子が明らかでない症例が多数存在する。また、現在のところ、遮光眼鏡やビタミン A 内服のような対症療法が中心であり、進行を抑えるための有効な治療法は確立されていない。

ヒトの疾患と類似した病態を示す動物モデルは、その疾患の発症メカニズムの解析および治療法の開発において非常に有益である。遺伝性網膜疾患においても、自然発生性あるいは遺伝子改変動物モデルの研究によって、原因遺伝子の同定、視細胞死のメカニズム解析および遺伝子治療や薬剤の有効性評価で大きな成果が得られている。特に新規な網膜疾患モデル動物の発見は、未だ原因遺伝子が明らかでない遺伝性網膜疾患患者の病因解明につながる可能性があり、その意義は大きい。

網膜は外界からの光刺激を神経信号に変換し、脳へと伝達する役割を担っている。光受容に特化した視細胞が、光伝達カスケードと呼ばれる一連の生体化学反応によって光刺激を電気シグナルに変換している。脊椎動物の視細胞には杆体と錐体が存在し、杆体は1光子に反応するほど高感度で主に暗所視を司るが色識別機能がなく、錐体は感度において杆体に劣るが色識別機能を有しており、主に明所視を司る。

申請者は、医学・薬学研究において汎用されている ICR マウスのコロニー中に、杆体および錐体の両機能を評価するフラッシュ網膜電図検査によって、著しい網膜機能低下を示すにもかかわらず眼底観察において異常が認められない雄個体を発見した。これを正常な雌性 ICR マウスと交配して得られた F₁ マウスの網膜機能はいずれも正常であったが、F₁ マウス同士の交配で得られた雌雄の F₂ マウスには初代雄マウスと同様に高度の網膜機能低下を示す個体とより軽度の網膜機能低下を示す個体が認められた。高度あるいはより軽度の網膜機能低下を示した F₂ マウス同士を交配して得られた雌雄の F₃ マウスの全個体で親マウスと同様の網膜機能低下を認めた。その後、兄妹交配を繰り返して2種類の自然発生性遺伝性網膜機能不全を示すマウス系統すなわち、高度の網膜機能低下を示す ICR-derived Retinal Dysfunction (IRD) 1 マウスおよびより軽度の網膜機能低下を示す IRD2 マウスを確立できた。

申請者は、本研究において、IRD1 および IRD2 マウスの網膜異常の特徴を精査し、その原因となる遺伝子変異を明らかにした。

最初に第1章で、IRD1 および IRD2 マウスの網膜機能不全の特徴を調べた。1ヵ月齢の両系統マウスの暗順応および明順応網膜電図を個別に記録し、杆体および錐体機能を精査した結果、IRD1 マウスは杆体と錐体の両機能が著明に低下していること、IRD2 マウスは杆体機能は著明に低下しているが錐体機能は正常であることがわかった。IRD2 マウスの錐体機能が正常であることが、フラッシュ網膜電図にもとづく IRD2 マウスの網膜機能低下が IRD1 より軽度であった原因と考えられた。1および3ヵ月齢の両系統マウスにおいて、光学顕微鏡レベルで網膜機能異常と関連する病理学的異常所見は認められなかった。交配実験によって、両系統の網膜機能不全の遺伝様式はいずれも常染色体劣性遺伝であり、IRD1 および IRD2 マウスは同じ杆体機能に関連した遺伝子の変異によって杆体機能不全を呈していること、IRD1 マウスは同時に錐体機能に関連した遺伝子の変異も有していることがわかった。

ついで第2章で、IRD1 および IRD2 マウスの網膜形態および機能におよぼす加齢の影響を調べた。1~18ヵ月齢までの IRD1 および IRD2 マウスの視細胞数を同月齢の ICR マウスと比較した結果、3ヵ月齢までは両系統と ICR マウスとの間に有意差はみられず、透過型電子顕微鏡を用いて視細胞の形態を観察しても3ヵ月齢では形態異常は認めら

れなかった。しかし、6ヵ月齢の時点では両系統共に視細胞数が ICR マウスより有意に減少し、アポトーシス (TUNEL 陽性) 数が有意に増加した。その後、視細胞数は減少し続け、両系統共に 18ヵ月齢までにほとんどの視細胞が消失した。両系統を 1~12ヵ月齢まで遮光下で飼育したが、網膜変性 (視細胞消失) を止めることはできなかった。両系統と ICR マウスの錐体細胞数を比較したが差はみられず、明順応網膜電図検査の結果、IRD2 マウスの錐体機能は ICR マウスと同程度であることが確認された。以上の結果から、網膜変性は光感受性の亢進に起因するものではないと考えられ、IRD1 および IRD2 マウスは遅発性かつ進行性の網膜変性を示すことが明らかとなった。

第3章では、IRD1 および IRD2 マウスの両系統で共通してみられる杆体機能不全の原因となる遺伝子変異を調べた。杆体の光伝達カスケードに関与するタンパク質の遺伝子変異は杆体機能のみならず、杆体の生存にも影響をおよぼすことが知られているので、杆体光伝達カスケード関連因子の遺伝子発現を定量的 real-time RT-PCR 法や *in situ* hybridization 法で調べた。その結果、杆体 transducin の α サブユニット (Tra) をコードする *Gnat1* 遺伝子の発現レベルが著明に低く、Tra mRNA は視細胞内節に局在していないことがわかった。さらに Tra タンパク質の局在を免疫染色法で調べたが陽性反応が認められなかった。これらの知見から *Gnat1* 遺伝子に変異が存在すると考えたので、Tra cDNA の direct sequence を実施した結果、両系統共に exon 4 と exon 5 との境界に 48 bp の挿入配列が存在することがわかった。この挿入によって codon 150 が TAC (チロシン) から TAG (終止コドン) に変わる nonsense mutation が生じていた。しかしながら両系統の Tra mRNA は中途終止コドンをも持たず、Tra タンパク質の N 末端を認識する抗体を用いた western blot 解析を行っても truncated Tra タンパク質は検出されなかった。*Gnat1* 遺伝子の intron 4 の配列を精査した結果、splice donor site の最後の 2 bp を含む計 57 bp が欠損していることが見出された。この splice donor site 配列の変化によって intron 4 が splice out されなくなり、exon 4 と exon 5 との境界に intron 4 の一部である 48 bp の挿入配列が残存してしまっただと考えられた。以上の結果から、IRD1 および IRD2 マウスの杆体機能不全の原因は、*Gnat1* 遺伝子に存在する nonsense mutation による Tra タンパク質の欠損であると考えられた。

本研究によって、IRD1 マウスは杆体と錐体の機能不全を、IRD2 マウスは杆体の機能不全を示し、遅発性かつ進行性の網膜変性を呈すること、両系統の杆体機能不全の原因は *Gnat1* 遺伝子の nonsense mutation による Tra タンパク質の欠損によることが明らかとなり、遺伝性の網膜疾患の研究に有用であることが示された。