

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592603

研究課題名(和文)トランスジェニックウサギを用いた錐体系網膜電図の新しい概念の確立

研究課題名(英文)Establishment of new concepts in cone electroretinogram using transgenic rabbits

研究代表者

近藤 峰生(KONDO, MINEO)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80303642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、ロドプシントランスジェニック(Tg)ウサギを用いて、視細胞変性網膜における錐体ERGのa波の起源を研究した。家兔の硝子体内にCNQXとAPBを注入することによって、視細胞以降の活動を遮断した前後で錐体ERGのa波を記録した。その結果、野生型ウサギでは錐体ERGのa波に占めるOFF型双極細胞の割合は25-55%程度であったが、Tgウサギではこれが50-70%程度と高くなっていた。今回の研究により、視細胞が徐々に変性していく網膜(例えば網膜色素変性)においては、錐体ERGのa波は錐体視細胞よりもOFF型双極細胞の関与がかなり大きくなっていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine the contributions of cones and post-photoreceptor neurons to the a-wave of the photopic ERGs in rhodopsin Pro347Leu transgenic (Tg) rabbits. Post-photoreceptor neural function was completely suppressed by intravitreal injections of CNQX and APB. We found that the percentage contribution of the cone photoreceptors to the photopic ERG a-waves ranged from 54% to 75% in wild-type (WT) rabbits. In contrast, the percentage contribution of the cone photoreceptors in Tg rabbits ranged from 32% to 51%. These results suggest that the relative contribution of cone photoreceptors to the photopic ERG a-wave is smaller in retinas with inherited photoreceptor degeneration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：網膜色素変性 網膜電図 動物モデル トランスジェニック

1. 研究開始当初の背景

網膜電図 (electroretinogram: ERG) は、網膜を光刺激した際に網膜が生じる電気反応を角膜から記録する検査であり、網膜疾患の診断や評価に重要な役割を果たしている。ERG の 2 つの主な成分は、光刺激後の早期の陰性波である a 波と、それに続く陽性波である b 波である。明順応状態で記録した錐体 ERG の a 波の起源は錐体視細胞であると古くから信じられてきたが、1994 年の Bush らの研究により、霊長類の錐体 ERG の a 波には錐体視細胞だけでなく OFF 型双極細胞や水平細胞などの視細胞以降の成分が関与していることが示された。

しかし、彼らの研究は正常眼における結果であり、実際に網膜色素変性 (retinitis pigmentosa: RP) などの視細胞変性疾患において錐体 ERG の a 波に対する視細胞と視細胞以降成分の関与がどのように変化するのはこれまで明らかにされていない。我々は、2009 年に RP の原因遺伝子の 1 つであるロドプシン遺伝子を変異させた P347L トランスジェニック (Tg) ウサギの作製に成功し、この動物が実際の患者と同様に進行性の視細胞変性をおこすことを確認した。

2. 研究の目的

そこで、本研究では野生型 (WT) と Tg ウサギの錐体 ERG の a 波の細胞起源を薬物によるシナプス遮断により調べ、Tg ウサギの錐体 ERG に占める視細胞および視細胞以降成分の関与の割合を研究した。

3. 研究の方法

(1) 4 か月および 12 か月齢の WT および Tg ウサギ各 5 例を全身麻酔し、明順応後にドーム型光刺激装置を用いて白色背景光下 (3.3 log scot td.) に 5 段階 (0.2-2.2 log cd-s/m²) のフラッシュ光で網膜を刺激して錐体 ERG を記録した。2-Amino-4-phosphonobutyric acid (APB) と 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione (CNQX) の硝子体内注射により、視細胞から ON 型双極細胞の伝達と OFF 型双極細胞及び水平細胞への伝達をそれぞれ遮断した。

(2) a 波振幅の測定方法は、薬物注射前では基線から陰性頂点までとし、薬物注射後では基線から投与前の頂点潜時における陰性点までとした (図 1A)。

4. 研究成果

(1) 4 か月齢および 12 か月齢の Tg ウサギの錐体 ERG の a 波振幅は WT より有意に小さく、Tg の錐体 ERG の a 波振幅は加齢により減弱した (図 1B, 1C)。4 か月齢の錐体 ERG の潜時は Tg と WT とで差はなかったが、12 か月齢では Tg の潜時が延長していた (図 1D)。

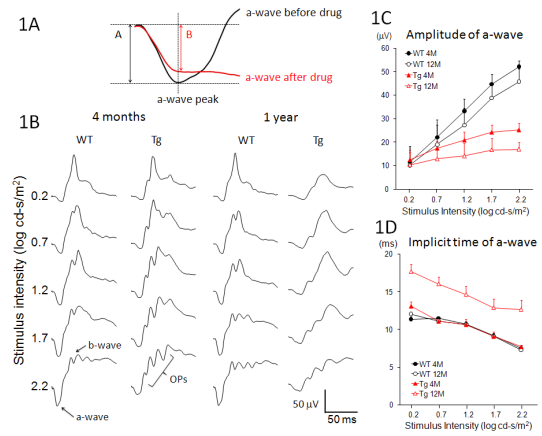


図 1 a 波測定方法と刺激-振幅曲線

(2) 次に、4 か月齢の WT と Tg の錐体 ERG の a 波に対する APB と CNQX の単独的作用を検討した。Tg と WT の a 波振幅は APB 注射前後では殆ど変化しなかったが、CNQX 注射後には著明に減少した (図 2)。

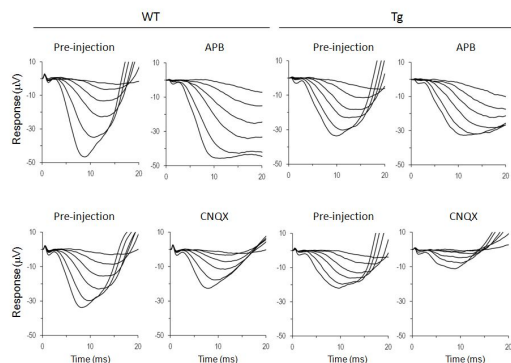


図 2 WT と Tg のウサギに対する APB と PDA

(3) WT と Tg の錐体 ERG の a 波振幅は、APB + CNQX の注射後に全刺激強度で減少した。注射前の a 波振幅に対する薬物注射後の a 波振幅の割合 (即ち a 波に占める錐体視細胞成分の割合) は、刺激強度によって増加する傾向がみられ、4 か月齢の WT では 54%~75% であったが、Tg では 32%~51% と有意に低かった (図 3)。12 か月齢のウサギでも同様の傾向がみられた。

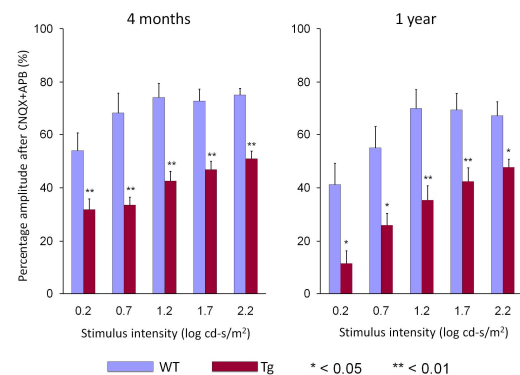


図 3 WT と Tg ウサギに対する、薬物注射後の a 波振幅の変化

(4) Tg の錐体 a 波における視細胞成分の割合が減少した理由は、単に変性により視細胞数が減少したために相対的に視細胞成分の割合が減少したのか、それとも視細胞以降の成分の振幅が増大したことも関与しているのかを確認するため、薬物注射前と注射後の a 波振幅の絶対値の差をプロットした。その結果、4 か月齢の Tg では、弱い刺激強度 (0.2 および 0.7 log cd-s/m²) では視細胞以降成分の振幅が WT より有意に高いことがわかった。これにより、4 か月の Tg では視細胞以降成分の振幅増大も相対的な視細胞成分の割合減少に関与していたことがわかった。

(5) 今回の研究により、Tg ウサギの錐体 ERG の a 波における錐体視細胞成分の割合は WT に比べて有意に低いことがわかった。これまでの研究でも、RP のモデル動物では視細胞数が減少しても網膜中層と内層は保たれるという報告があり、我々の結果は当然のように見える。しかし今回の結果では、Tg ウサギの錐体 ERG の a 波における視細胞成分の割合の減少は、視細胞以降成分の振幅増大も関与しているという興味深い所見が得られた。最近の研究では、杆体視細胞が変性していく過程で杆体 ON 型双極細胞が錐体視細胞に異所性に接続することが組織学的に示されており、今回の我々の結果は、視細胞変性に伴うシナプスやニューロンの 2 次的変化を示唆している可能性があると考えられた。また今回の結果は、眼科臨床的にも重要な意義を持つと考えられた。現在でも錐体 ERG の a 波は錐体視細胞そのものの電気的応答であると考えている臨床家が多い。しかし進行性の視細胞変性疾患を有する患者 (例えば RP) では、錐体視細胞の残存機能を錐体 ERG の a 波で測定しようとするとは過大評価してしまう可能性があることがわかった。例えば国際臨床電気生理学会が推奨する錐体 ERG の刺激強度 (0.48 log-cd-s/m²) における錐体 ERG の a 波に含まれる視細胞の成分は、変性網膜では 34% しかないからである。RP 患者の錐体 ERG の a 波を評価する際には、視細胞以降由来成分が少なからず関与していることを考慮に入れるべきである。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 30 件)

- 1) Morita Y, Kimura K, Fujitsu Y, Enomoto A, Ueno S, Kondo M, Sonoda KH. Autoantibodies to transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1 in a Japanese patient with melanoma-associated retinopathy. *Jpn J Ophthalmol*. [査読有] in press.
- 2) Hibi N, Kondo M, Ishikawa K, Ueno S,

Komeima K, Terasaki H. Transient increase of retinal nerve fiber layer thickness after macular hole surgery. *Int Ophthalmol*. [査読有] in press.

- 3) Suto K, Hosono K, Takahashi M, Hirami Y, Arai Y, Nagase Y, Ueno S, Terasaki H, Minoshima S, Kondo M, Hotta Y. Clinical Phenotype in Ten Unrelated Japanese Patients with Mutations in the EYS Gene. *Ophthalmic Genet*. [査読有] in press.
- 4) Ueno S, Nishiguchi KM, Tanioka H, Enomoto A, Yamanouchi T, Kondo M, Yasuma TR, Yasuda S, Kuno N, Takahashi M, Terasaki H. Degeneration of retinal on bipolar cells induced by serum including autoantibody against TRPM1 in mouse model of paraneoplastic retinopathy. *PLoS One*. [査読有] 2013;8: e81507. DOI: 10.1371/journal.pone.0081507. eCollection 2013.
- 5) Hibi N, Ueno S, Ito Y, Piao CH, Kondo M, Terasaki H. Relationship between retinal layer thickness and focal macular electroretinogram components after epiretinal membrane surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. [査読有] 2013; 54:7207-7214. DOI: 10.1167/iovs.13-12884.
- 6) Nishiguchi KM, Tearle RG, Liu YP, Oh EC, Miyake N, Benaglio P, Harper S, Koskiniemi-Kuendig H, Venturini G, Sharon D, Koenekoop RK, Nakamura M, Kondo M, Ueno S, Yasuma TR, Beckmann JS, Ikegawa S, Matsumoto N, Terasaki H, Berson EL, Katsanis N, Rivolta C. Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and NEK2 as a new disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [査読有] 2013; 110:16139-16144. DOI: 10.1073/pnas.1308243110.
- 7) Ueno S, Koyasu T, Kominami T, Sakai T, Kondo M, Yasuda S, Terasaki H. Focal cone ERGs of rhodopsin Pro347Leu transgenic rabbits. *Vision Res*. [査読有] 2013; 91:118-123. DOI: 10.1016/j.visres.2013.08.006.
- 8) Fukuda S, Nagano M, Yamashita T, Kimura K, Tsuboi I, Salazar G, Ueno S, Kondo M, Kunath T, Oshika T, Ohneda O. Functional endothelial progenitor cells selectively recruit neurovascular protective monocyte-derived F4/80(+)

- /Ly6c(+) macrophages in a mouse model of retinal degeneration. *Stem Cells*. [査読有] 2013;31:2149-2161. doi:10.1002/stem.1469.
- 9) Nishiguchi KM, Ushida H, Tomida D, Kachi S, Kondo M, Terasaki H. Age-dependent alteration of intraocular soluble heparan sulfate levels and its implications for proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis*. [査読有] 2013;19:1125-1131. <http://www.molvis.org/molvis/v19/1125>
- 10) Sugimoto M, Kondo M, Horiguchi M. Uniform suspension of the clustered triamcinolone acetonide particle. *J Ophthalmol*. [査読有] 2013;315658. DOI: 10.1155/2013/315658.
- 11) Matsui Y, Tsukitome H, Uchiyama E, Wada Y, Yagi T, Matsubara H, Kondo M. Peripheral capillary nonperfusion and full-field electroretinographic changes in eyes with frosted branch-like appearance retinal vasculitis. *Clin Ophthalmol*. [査読有] 2013; 7:137-140. DOI: 10.2147/OPHTH.S40110.
- 12) Ushida H, Kachi S, Asami T, Ishikawa K, Kondo M, Terasaki H. Influence of preoperative intravitreal bevacizumab on visual function in eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res*. [査読有] 2013;49:30-36. DOI: 10.1159/000324135.
- 13) Iwata E, Ueno S, Ishikawa K, Ito Y, Uetani R, Piao CH, Kondo M, Terasaki H. Focal macular electroretinograms after intravitreal injections of bevacizumab for age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. [査読有] 2012;53:4185-4190. DOI: 10.1167/iovs.11-9335.
- 14) Morimoto T, Kanda H, Kondo M, Terasaki H, Nishida K, Fujikado T. Transcorneal electrical stimulation promotes survival of photoreceptors and improves retinal function in rhodopsin P347L transgenic rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 [査読有];53:4254-4261. DOI: 10.1167/iovs.11-9067.
- 15) Muraoka Y, Ikeda HO, Nakano N, Hangai M, Toda Y, Okamoto-Furuta K, Kohda H, Kondo M, Terasaki H, Kakizuka A, Yoshimura N. Real-time imaging of rabbit retina with retinal degeneration by using spectral-domain optical coherence tomography. *PLoS One*. [査読有] 2012;7:e36135. DOI: 10.1371/journal.pone.0036135.
- 16) Omori Y, Araki F, Chaya T, Kajimura N, Irie S, Terada K, Muranishi Y, Tsujii T, Ueno S, Koyasu T, Tamaki Y, Kondo M, Amano S, Furukawa T. Presynaptic dystroglycan-pikachurin complex regulates the proper synaptic connection between retinal photoreceptor and bipolar cells. *J Neurosci*. [査読有] 2012;32(18):6126-6137. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0322-12.2012.
- 17) Hosono K, Ishigami C, Takahashi M, Park DH, Hirami Y, Nakanishi H, Ueno S, Yokoi T, Hikoya A, Fujita T, Zhao Y, Nishina S, Shin JP, Kim IT, Yamamoto S, Azuma N, Terasaki H, Sato M, Kondo M, Minoshima S, Hotta Y. Two novel mutations in the EYS gene are possible major causes of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Japanese population. *PLoS One*. [査読有] 2012;7:e31036. doi: 10.1371/journal.pone.0031036.
- 18) Hirota R, Kondo M, Ueno S, Sakai T, Koyasu T, Terasaki H. Photoreceptor and post-photoreceptor contributions to photopic ERG a-wave in rhodopsin P347L transgenic rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. [査読有] 2012;53(3):1467-1472. DOI: 10.1167/iovs.11-9006.
- 19) Nojima K, Hosono K, Zhao Y, Toshiba T, Hikoya A, Asai T, Kato M, Kondo M, Minoshima S, Hotta Y. Clinical features of a Japanese case with Bothnia dystrophy. *Ophthalmic Genet*. [査読有] 2012 Jun;33(2):83-88. DOI: 10.3109/13816810.2011.634877.
- 20) Hood DC, Bach M, Brigell M, Keating D, Kondo M, Lyons JS, Marmor MF, McCulloch DL, Palmowski-Wolfe AM; International Society For Clinical Electrophysiology of Vision. ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2011 edition). *Doc Ophthalmol*. [査読有] 2012;124:1-13. DOI: 10.1007/s10633-011-9296-8.
- 21) Kleinman ME, Kaneko H, Cho WG, Dridi S, Fowler BJ, Blandford AD, Albuquerque RJ, Hirano Y, Terasaki H, Kondo M, Fujita T, Ambati BK, Tarallo V, Gelfand BD, Bogdanovich S, Baffi JZ,

- Ambati J. Short-interfering RNAs induce retinal degeneration via TLR3 and IRF3. *Mol Ther.* [査読有] 2012;20:101-108. DOI: 10.1038/mt.2011.212.
- 22) Nishimura T, Machida S, Kondo M, Terasaki H, Yokoyama D, Kurosaka D. Enhancement of ON-bipolar cell responses of cone electroretinograms in rabbits with the Pro347Leu rhodopsin mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* [査読有] 2011;52:7610-7617. DOI: 10.1167/iovs.11-7611.
- 23) Sanuki R, Onishi A, Koike C, Muramatsu R, Watanabe S, Muranishi Y, Irie S, Ueno S, Koyasu T, Matsui R, Chérasse Y, Urade Y, Watanabe D, Kondo M, Yamashita T, Furukawa T. miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression. *Nat Neurosci.* [査読有] 2011;14:1125-1134. DOI: 10.1038/nn.2897.
- 24) Yasuda S, Kachi S, Kondo M, Ushida H, Uetani R, Terui T, Piao CH, Terasaki H. Significant correlation between electroretinogram parameters and ocular vascular endothelial growth factor concentration in central retinal vein occlusion eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* [査読有] 2011;52:5737-5742. DOI: 10.1167/iovs.10-6923.
- 25) Kondo M, Sanuki R, Ueno S, Nishizawa Y, Hashimoto N, Ohguro H, Yamamoto S, Machida S, Terasaki H, Adamus G, Furukawa T. Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar cell dysfunction. *PLoS One.* [査読有] 2011;6:e19911. DOI: 10.1371/journal.pone.0019911.
- 26) Yasuda S, Kondo M, Kachi S, Ito Y, Terui T, Ueno S, Terasaki H. Rebound of macular edema after intravitreal bevacizumab therapy in eyes with macular edema secondary to branch retinal vein occlusion. *Retina.* [査読有] 2011;31:1075-1082. DOI: 10.1097/IAE.0b013e318206cf4b.
- 27) Terui T, Kondo M, Sugita T, Ito Y, Kondo N, Ota I, Miyake K, Terasaki H. Changes in areas of capillary nonperfusion after intravitreal injection of bevacizumab in eyes with branch retinal vein occlusion. *Retina.* [査読有] 2011;31:1068-1074. DOI: 10.1097/IAE.0b013e31820c83c2.
- [学会発表](計 42 件)
- 1) Kondo M, Hirota R, Ueno S, Sakai T, Koyasu T, Terasaki H. Photo-receptor and post-photoreceptor contributions to photopic ERG a-wave in rhodopsin P347L transgenic rabbits. *International Society for Electrophysiology of Vision.* Quebec, Canada. June 11, 2012.
- 2) Kondo M, Sanuki R, Ueno S, Nishizawa Y, Hashimoto N, Ohguro H, Yamamoto S, Machida S, Terasaki H, Adamus G, Furukawa T. Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar cell dysfunction. *Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology.* Florida, USA. May 3, 2011.
- [図書](計 5 件)
- 1) 近藤峰生. 「若年網膜分離症」眼科疾患最新の治療 2013-2015: 192. 南江堂. 2013.
- [産業財産権]
- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)
- [その他]
- ホームページ等
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/ophthalmology/>
6. 研究組織
- (1)研究代表者
近藤 峰生 (KONDO, Mineo)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 80303642
- (2)研究分担者
寺崎 浩子 (Terasaki, Hiroko)
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 40207478
- 加地 秀 (KACHI, Shu)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 30345904
- 米今 敬一 (KOMEIMA, Keiichi)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 40362256

上野 真治 (UENO, Shinji)
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・
助教
研究者番号 : 80528670

(3)連携研究者
なし