

出國報告（出國類別：進修）

新型 *Grm6* 變異無 b 波小鼠模型中的 表現特徵與基因治療

服務機關：臺灣大學醫學院附設醫院雲林分院

姓名職稱：林佩璇醫師

派赴國家：美國紐約

出國期間：民國 112 年 8 月 1 日至 114 年 1 月 31 日

報告日期：民國 114 年 2 月 27 日至 114 年 3 月 4 日

研究簡介

先天性靜止性夜盲 (Congenital Stationary Night Blindness, CSNB) 是由視網膜中光感受器與雙極細胞之間的訊號傳遞缺陷引起的，導致夜視能力受損和暗適應延遲。患者可能還會出現視力不良、近視、眼球震顫、斜視和視網膜異常。根據全視野視網膜電圖 (FF-ERG) 中桿細胞反應的受影響程度，CSNB 可分為Riggs型和Schubert - Bornschein型。Schubert - Bornschein 型進一步分為完全型 (cCSNB) 和不完全型 (iCSNB)，取決於視網膜訊號傳導路徑的特定缺陷。本研究專注於最常見的cCSNB，其特點是ON-雙極細胞通路受損。

雙極細胞在視網膜中發揮關鍵作用，作為連接兩個突觸層的主要神經元。它在外叢狀層 (OPL) 接受來自光感受器的谷氨酸能 (glutamatergic) 輸入以及來自水平細胞的GABA 能 (GABAergic) 輸入，隨後將谷氨酸能興奮性輸入傳遞給視網膜神經節細胞 (RGCs) 和抑制性無軸突細胞 (amacrine cells)。GRM6、GPR179、NYX、TRPM1和LRIT3是介導光感受器到 ON-雙極細胞訊號傳導的重要分子，這些基因的突變與cCSNB相關。其中，GRM6突變是僅次於NYX和TRPM1的第三大致病原因。先前使用腺相關病毒 (AAV) 基因治療的研究，針對*Nyx*和*Lrit3*基因修復CSNB小鼠模型時，已部分恢復功能。然而，針對*Grm6*突變的小鼠模型 (*Grm6* -/-) 的基因治療效果不佳，這限制了開發有效治療CSNB患者的進展。

本研究建立了一種無 b 波 (nob) 小鼠模型，攜帶一種新型*Grm6*變異，導致視網膜訊號傳導受損。我們的目標是利用AAV基因治療，透過兩種不同啟動子 (hGRM6-*Grm6*，特異性表達於 ON-雙極細胞；CMV-*Grm6*，全視網膜表達)，在兩種不同治療策略(視網膜下(早期)和玻璃體內(成年)注射)下，評估GRM6蛋白的定位、視網膜厚度及功能恢復潛力。

目次

壹、 緣起.....	1
貳、 研究目的.....	1
參、 研究方法過程.....	1
肆、 研究結果.....	2
伍、 心得及建議.....	2

壹、 緣起：

國內有上萬名「基因性視網膜退化疾病」患者，也稱為「遺傳性視網膜失養症」（inherited retinal degeneration, IRD），這類基因缺陷造成的先天性視力疾病過去被認為無法治療，連病理機轉都不易釐清，醫病雙方面對此類疾病都束手無策。近年來基因醫學進步，為 IRD 疾病的診斷與治療帶來巨大改變。目前本院受限於儀器設備以及人員經驗之不足，在 IRD 疾病的診斷和治療上有所侷限，因此希望藉由此次進修能夠進一步學習並精進 IRD 疾病的致病機轉和診斷治療。

紐約哥倫比亞大學醫院的眼科研究室在王南凱醫師的帶領下，在 IRD 的研究和基因治療領域享有盛名。經過聯繫並取得王南凱醫師同意後於 113 年 8 月 1 日前往紐約哥倫比亞大學醫院眼科研究室進行 IRD 疾病的相關研究。

貳、 研究目的：

本研究旨在表徵由自然發生的*Grm6*變異引起的無 b 波（nob）小鼠模型，該變異破壞了光感受器與雙極細胞之間的訊號傳遞，並評估基因治療對恢復視覺功能的效果。

參、 研究方法過程：

透過選擇性育種產生nob表型小鼠。攜帶*Grm6*和GFP基因的腺相關病毒（AAV），分別由hGRM6和CMV兩種啟動子驅動，在小鼠出生後第 5 天（P5）和第 30 天（P30）進行注射。基因治療三個月後，進行視網膜電生理（ERG）和光譜域光學斷層掃描（SD-OCT）分析。

肆、 研究結果：

成功再生nob表型，並鑑定出*Grm6*的變異c.1037G>A (p.Arg346His) 為致病變異。暗適應 (scotopic) b 波缺失，而 a 波正常，顯示桿細胞功能完好但雙極細胞功能受損。SD-OCT 顯示受影響小鼠的視網膜神經纖維層 (RNFL) 和外叢狀層 (OPL) 變薄。免疫組織化學(Immunohistochemistry)與免疫印跡 (Immunoblotting) 分析顯示GRM6及相關訊號蛋白表達降低。基因治療恢復了GRM6表達，並在 OPL 重新建立突觸連接，但 ERG b/a比值與 OPL 厚度的改善有限。值得注意的是，hGRM6啟動子在P5施打時對 OPL 恢復效果更佳。

伍、 心得及建議：

nob小鼠能夠模擬人類先天性靜止性夜盲 (CSNB) 表型。儘管基因治療成功恢復GRM6表達，功能性改善仍有限。早期治療與特定啟動子的選擇至關重要，提高轉導效率可能有助於優化基因治療策略。