

令和元年6月27日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19738

研究課題名(和文) 遺伝性視神経・網膜硝子体疾患の遺伝学的解析

研究課題名(英文) Genetic analysis for hereditary diseases of the optic nerve and retina

研究代表者

松坂 恵美子 (Matsuzaka, Emiko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・視覚科学研究室・研究補助員

研究者番号：70789974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：国立成育医療センターにおいて第一次硝子体過形成遺残の大規模家系が同定されている。次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析、バイオインフォマティクス解析を用いたところ、機能未知の遺伝子における変異が同定されCRISPR/Cas9システムを用いてこの遺伝子改変マウスを作製した。エクソン2に変異を導入したマウスは目の表現型を示したがホモで胎生致死となり解析は不可能であった。エクソン6では、ホモでは生存するが、目の表現型は軽微な変化であり適さないと考えられた。エクソン3は産仔が得られず胎生致死であることが考えられた。エクソン4は産仔は得られ、現在、次の世代のマウスの塩基配列の解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国立成育医療センター眼科には小児の遺伝性眼疾患症例が全国から集積されており、第一硝子体過形成遺残のみならず、他の遺伝性網膜疾患においても膨大な臨床、遺伝学的データが蓄積されており、今後同様に研究を進めることで新たな遺伝子変異を同定し疾患治療に結びつく可能性がある。

同様に、他の疾患についても遺伝学的、また分子生物学的に解析を進めることで、網膜・視神経の発生に関わる知見のみならず、眼形成初期に働く遺伝子であり、かつ身体の発育を司る遺伝子を新規に同定できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： We have identified a large pedigree of congenital ocular disease, persistent fetal vasculature (PFV), with autosomal dominant inheritance. Whole exome analysis revealed a functionally unknown gene X as a possible causative gene of the disease, and we generated knockout mice of this gene by CRISPR/Cas9 system.

Heterozygous knockout mice of exon2 showed eye phenotype resembling PFV observed in the pedigree, while homozygous knockout mice of exon2 were lethal. Homozygous knockout mice of exon6 were not lethal, however, the mice showed minute eye phenotype. In order to identify the effect of the gene X for the other organs, we have conducted the generation of another homozygous knockout mice carrying mutation in exon3 or exon4. As a result, heterozygous knockout mice of exon3 have been lethal, while the heterozygous knockout mice of exon4 have not been lethal. We further aim to generate homozygous knockout mice of exon4 which show eye and systemic phenotype.

研究分野：農学

キーワード：第一硝子体過形成遺残 エクソーム解析 CRISPR/Cas9 遺伝子改変マウス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

第一次硝子体過形成遺残は、これまで遺伝的な背景はないとされてきた。また、原因も不明で、治療や病態の分子メカニズムに関する知見はなかったといってもよい。しかし、本家系において責任遺伝子が同定されれば、失明することもしばしばある本疾患において、病態解明や治療につながる知見が世界で初めて得られる可能性を内包している。視神経形成と第一次硝子体過形成遺残の関連も明らかになることが期待される。解析中の遺伝子は視神経と網膜硝子体血管の発生に関わっていると考えられるので、その機能解明は発生学の新治験にとどまらず、視神経や網膜の再生医療にも寄与することが期待できる。

### 2. 研究の目的

現在、日本における視覚障害者数は32万人とされ、18歳未満の視覚障害児は4900人（H18年調べ）とされている。小児期における失明の原因としては、網膜疾患に起因するものが多くあげられる。高度な視覚障害をきたす先天的な網膜疾患として代表的なものは、未熟児網膜症がある。家族性滲出性硝子体網膜症や、レーベル先天黒内障など遺伝性疾患も非常に重要であると言われている。通常遺伝性がないとされている第一次硝子体過形成遺残による網膜剥離も高度な視覚障害をきたす疾患として代表的である。しかしその原因、病態生理についてはまだ不明な点が多い。第一次硝子体過形成遺残は、通常、片眼性に起こり小眼球を伴う先天網膜疾患であり、遺伝的背景はないとされている。

しかし当センターにおいて、常染色体優性遺伝形式をとる視神経形成異常と第一次硝子体過形成遺残の大家系が確認された。本家系における第一次硝子体過形成遺残の表現型は、胎生期に水晶体を栄養する硝子体血管遺残による網膜剥離だけでなく、視神経乳頭における形成異常を伴っているものも見受けられた。本家系において、3世代に及ぶゲノム解析が可能であり、罹患者、非罹患者が明確に分かれ、これらの検体を用いて、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行うことで、変異と疾患などの表現型の関連を調べることにより新規の責任遺伝子を同定できるものと考えられる。さらにトランスジェニックマウスの作製により、遺伝子発現の組織特異性の解析、発生過程におけるその遺伝子発現の追求、マウス個体を使って体内での環境の変化に対して遺伝子発現に及ぼす影響の解析等をおこなうことにより病態の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 小児期に発症する遺伝性視神経・網膜硝子体疾患の詳細な臨床データとゲノム集積

眼底写真、蛍光眼底造影、光干渉断層像、網膜電図を含めて、症例ごとに詳しい臨床データを集積する。あわせて、遺伝子解析のために末梢血あるいは唾液からゲノムを調整し、症例を集積する。

#### (2) エクソーム解析

既知の疾患についてはターゲットエクソーム解析、未知の疾患ではホールエクソーム解析を行う。

#### (3) 遺伝子改変マウスを作製

機能未知な遺伝子の変異が見つかった場合は、CRISPR/Cas9 システムを用いて、ノックアウトマウス、ノックインマウスを作製する。

#### (4) 遺伝子改変マウスの解析

眼底検査、発生時期ごとの病理検査を行って、ヒト疾患との類似性を検討するとともに、疾患発生の組織学的機序を明らかにする。

#### (5) 同定分子の発現の解析

In situ ハイブリダイゼーションや RTPCR によって、発生過程における発現様式を検討する。

#### (6) 同定分子の構造予測、機能解析

In silico で同定分子の3次構造と機能を予測し、In vitro でレポーターアッセイ等を行う。

#### (7) 疾患 iPS 細胞作製による疾患の培養細胞モデルとその解析

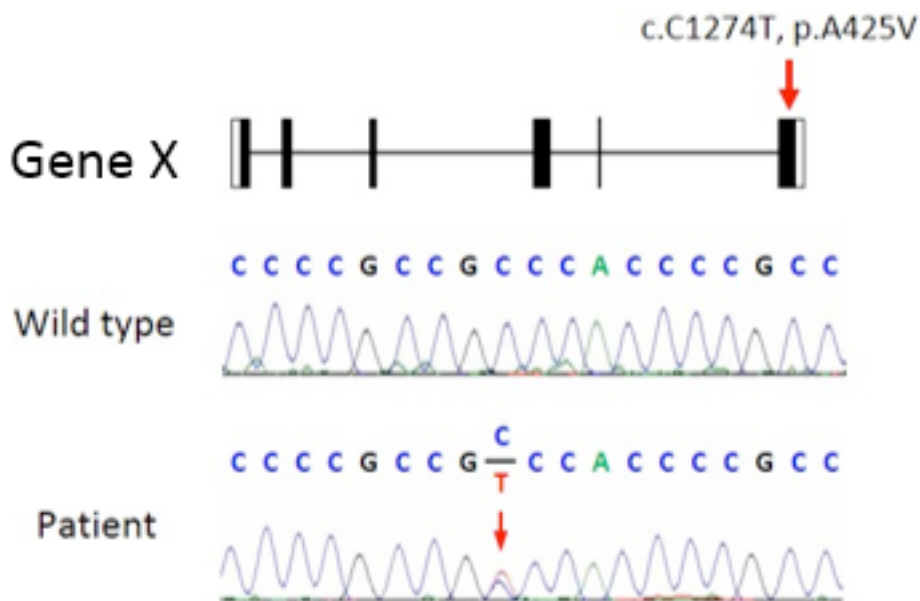
責任遺伝子候補が同定された第一次硝子体過形成遺残症例において、iPS 細胞用いて疾患モデルを確立し、in vitro における病態解明を行う。

### 4. 研究成果

国立成育医療センター眼科において、通常、遺伝的背景は無いとされているが、常染色体優性遺伝形式をとる視神経形成異常と第一次硝子体過形成遺残の大家系が確認された。本家系における第一次硝子体過形成遺残の表現型は、胎児期に水晶体を栄養する硝子体血管の遺残による網膜剥離だけでなく、視神経乳頭における形成異常を伴っているものも見受けられた。本家系において次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析、パイオインフォマティクス解析を行ったところ、機能未知の遺伝子における変異が同定され CRISPR/Cas9 システムを用いてこの遺伝子改変マウスを作製した。

エクソン2に変異を導入したマウスはヒトと同様の目の表現型を示したが、ホモで胎生致死となり他の臓器の解析は不可能であった。最終エクソンであるエクソン6に変異を導入したマウスは、ホモでは生存するが、目の表現型は認められるものの、非常に軽微な変化であり他の臓器の表現型の解析には適さないと考えられた。この結果を考慮し、エクソン2、エクソン6の中間に当たるエクソン3、エクソン4に変異を導入したマウスを作製した。エクソン3は複数回の導入を行なったが、産仔は得られず胎生致死であることが考えられた。エクソン4に変

異を導入したマウスは産仔が得られ、現在、次の世代のマウスの塩基配列の解析を進めている。



Gene X	<i>exon 2 +/+</i>	<i>exon 2 +/-</i>	<i>exon 2 -/-</i>
Offspring	29	70	0
Blastcyst	19	28	5

Gene X	<i>exon 6 +/+</i>	<i>exon 6 +/-</i>	<i>exon 6 -/-</i>
Offspring	43	63	36

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 件）

〔学会発表〕（計 件）

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：松坂 恵美子

ローマ字氏名：MATSUZAKA, emiko

所属研究機関名：国立研究開発法人国立成育医療研究センター

部局名：視覚科学研究室

職名：研究補助員

研究者番号（8桁）：70789974

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：東 範行

ローマ字氏名：AZUMA noriyuki

### (3) 研究協力者

研究協力者氏名：深見 真紀

ローマ字氏名：FUKAMI maki

### (4) 研究協力者

研究協力者氏名：高田 修治

ローマ字氏名：TAKADA shuji

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。