

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16947

研究課題名(和文) Fuchs角膜内皮変性症のトリプレットリピート伸長が病態に与える影響の解明

研究課題名(英文) A study to elucidate influence of triplet repeat expansion on pathology in Fuchs endothelial corneal dystrophy

研究代表者

宮井 尊史 (MIYAI, TAKASHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40599007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：外来のFuchs角膜内皮変性症患者から採取した41人分のDNAに対してSTR assayおよびRepeat primed PCRを行い、TCF4のリピート伸長は8人(19.5%)に認められた。不死化角膜内皮細胞HCEnCのリピートをCRISPR-Cas9を用いて切断し、リピートノックアウト細胞株の作成に成功した。この細胞株は光学顕微鏡による表現型、細胞増殖曲線、TCF4の遺伝子発現量に違いがなかった。HCEnCに対して60および80リピートのドナーを用いリピートノックイン細胞株の作成にも成功した。80リピートノックイン細胞株ではRNA凝集、TCF4遺伝子発現の増加がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題における検討において、世界で角膜移植の約40%を占めるFuchs角膜内皮変性症について本邦の症例のDNA解析を行い、TCF4遺伝子のリピート伸長型が一定の比率を占めることを確認できた。また、CRISPR-Cas9を用いて角膜内皮細胞株のリピートのノックアウトおよびノックインに成功し、リピート切断治療の可能性および、リピート伸長によるRNA凝集という細胞内の病態を反映するモデルを作成できた。今後のFuchs角膜内皮変性症の病態解明および治療法の検討にあたり、大変有用なモデル細胞で学術的、社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research, STR assay and repeat primed PCR were performed on the DNA of 41 outpatients with Fuchs corneal endothelial dystrophy, and repeat elongation of TCF4 was observed in 8 patients (19.5%).

We succeeded in cleaving the repeat of the immortalized corneal endothelial cell HCEnC using CRISPR-Cas9, and succeeded in creating a knock-out cell line. We also succeeded in producing knock-in cell lines for HCEnC with 60-repeat and 80-repeat donors using the Homology direct repair method. RNA foci was observed in the 80 repeat knock-in cell line, and TCF4 gene expression by RT-PCR was increased.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜ジストロフィ ゲノム編集 角膜内皮 Fuchs角膜内皮ジストロフィ TCF4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Fuchs 角膜内皮変性症 (FECD) は角膜内皮細胞が進行性に障害される遺伝性疾患であり、滴状角膜というデスメ膜肥厚を呈する角膜内皮変性症である。進行して角膜内皮細胞密度が低下すると水疱性角膜症という不可逆性の角膜浮腫をひきおこし、重篤な視機能低下をもたらす。現在考えられている病態としては、酸化ストレスを介した角膜内皮細胞のアポトーシスが有力視されているが (Am J Pathol 2010) まだはっきりとはわかっていない。現時点で角膜移植しか治療法がなく、本疾患は、世界のアイバンクのサーベイランスにおいて、角膜移植の約 4 割を占める第一位の原因疾患であることが報告されている (JAMA Ophthalmol 2016)。FECD の原因遺伝子については、GWAS によると 18 番染色体上の TCF4 遺伝子の rs613872 の SNP と有意な関連性が示されてきたが (N Engl J Med 2010) この SNP と連鎖関係にある 3 塩基の繰り返し多型 (CTG リピート) の伸長がより高い特異性を示し、疾患の原因として考えられている。このリピートは TCF4 遺伝子の intron 2 に存在し、FECD 患者の約 80% に、50 個以上の CTG リピートがみられたとの報告もある (PLoS One 2012)。

TCF4 のイントロン領域の CTG リピート伸長による疾患発症メカニズムは未解明であるが、筋強直性ジストロフィなど他のトリプレットリピート病の知見からは、TCF4 の選択的スプライシングに影響を与えていることが想定される。また、TCF4 遺伝子が上皮間葉転換 (EMT) 経路を制御すること (J Cell Sci 2009) や、FECD において ZEB1、SNAL1 などの EMT 関連転写因子の発現が亢進していること (Lab Invest 2015) などより、EMT 経路の亢進が病態に関与している可能性が考えられているが、CTG リピートとの因果関係については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、FECD の角膜内皮細胞にみられる TCF4 遺伝子のイントロン領域の CTG リピートが splicing variants を介して EMT 経路の亢進及びミトコンドリア変異といった細胞内の状態にどのように関わっているかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

FECD 患者の TCF4 CTG リピート数の同定

同意の得られた FECD 患者から採取した血液または角膜移植時に得られた検体より、DNA の Target sequencing を行い、18 番染色体 TCF4 遺伝子のイントロン 2 領域の CTG リピート数を同定する。

FECD 患者の角膜内皮細胞における遺伝子発現解析

FECD 患者の角膜検体、及び研究用正常ヒト角膜から得られた角膜内皮細胞から RNA を抽出し RNAseq を行い、遺伝子発現解析を行う。

CRISPR/Cas9 を用いた CTG リピート数の操作および疾患モデルの樹立

CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術により、CTG リピート数の操作を行い、疾患モデルの樹立および治療応用の可能性を検討する。まず、TCF4 イントロン 2 の CTG リピート領域を標的とした guide RNA および切断後の DNA 修復テンプレート dsDNA を設計する。この dsDNA に CTG リピートの追加配列を用いることによってリピート数を増やすことが可能となる。これらを Cas9-GFP タンパク発現プラスミドと共に、培養角膜内皮細胞にリポフェクション法で導入を行う。導入後 FACS により GFP 陽性細胞をソートし回収、シングルクローンを培養して増やし、DNA を抽出、RFLP アッセイにてゲノム編集の結果を確認する。また、CRISPR/CAS9 システムを用いて CTG リピートの短縮操作も行う。すなわち、CTG リピートの 2 か所に gRNA を設計し、CTG リピートを切断したうえでリピート数を減少させる。

4. 研究成果

外来の Fuchs 角膜内皮変性症患者から採取した 41 人分の DNA に対して STR assay および Repeat primed PCR を行い、TCF4 のリピート伸長は 8 人 (19.5%) に認められた。

FECD の角膜移植検体 3 検体と正常角膜 6 検体の角膜内皮から RNA を抽出し、RIN 値が低い検体が含まれるため SMART 法による RNAseq を行った。FECD で有意に発現上昇している遺伝子群の Pathway 解析より PI3K-Akt signaling、Focal adhesion、ECM-receptor interaction に関する遺伝子群の上昇が認められた。

不死化角膜内皮細胞 HCEnC のリピートを CRISPR-Cas9 を用いて切断し、リピートノックアウト細胞株の作成に成功した。この細胞株は光学顕微鏡による表現型、細胞増殖曲線、TCF4 の遺伝子発現量に違いがなかった。HCEnC に対して 60 および 80 リピートのドナーを用いリピートノックイン細胞株の作成にも成功した。80 リピートノックイン細胞株では RNA 凝集、TCF4 遺伝子発現の増加がみられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 18件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ono Takashi, Kawasaki Yuki, Chen Lily Wei, Toyono Tetsuya, Shirakawa Rika, Yoshida Junko, Aihara Makoto, Miyai Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Corneal topography in keratoconus evaluated more than 30 years after penetrating keratoplasty: a Fourier harmonic analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71818-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Junko, Toyono Tetsuya, Shirakawa Rika, Miyai Takashi, Usui Tomohiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Risk factors and evaluation of keratoconus progression after penetrating keratoplasty with anterior segment optical coherence tomography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75412-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Risako, Ono Takashi, Toyono Tetsuya, Shirakawa Rika, Noda Mika, Yoshida Junko, Miyai Takashi	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Assessment of Long-Term Anterior and Posterior Topographic Changes in the Cornea After Ptosis Surgery Using Fourier Harmonic Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 440-444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IC0.0000000000002429	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa Suguru, Ishii Hitoha, Takamoto Mitsuko, Kaburaki Toshikatsu, Ishii Kiyoshi, Miyai Takashi	4. 巻 21
2. 論文標題 Diagnosis of cytomegalovirus corneal endotheliitis using surgically removed Descemet's membrane and endothelium despite negative results with aqueous humor PCR: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12886-021-01962-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Omoto Takashi, Agata Chisato, Akiyama Reina, Kitamoto Kohdai, Toyono Tetsuya, Yoshida Junko, Yamagami Satoru, Usui Tomohiko, Miyai Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Iridotrabeular and Iridocorneal Contact Changes after Cataract Surgery and Endothelial Keratoplasty in Bilateral Iridoschisis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Reports in Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 198 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000513793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitamoto Kohdai, Taketani Yukako, Fujii Wataru, Inamochi Aya, Toyono Tetsuya, Miyai Takashi, Yamagami Satoru, Kuroda Masahiko, Usui Tomohiko, Ouchi Yasuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of mouse model of TGFBI-R124C corneal dystrophy using CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58876-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inamochi Aya, Tomioka Akiko, Kitamoto Kohdai, Miyai Takashi, Usui Tomohiko, Aihara Makoto, Yamagami Satoru	4. 巻 9
2. 論文標題 Simple oral mucosal epithelial transplantation in a rabbit model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-54571-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Liu C, Miyajima T, Melangath G, Miyai T, Vasanth S, Deshpande N, Kumar V, Ong Tone S, Gupta R, Zhu S, Vojnovic D, Chen Y, Rogan EG, Mondal B, Zahid M, Jurkunas UV.	4. 巻 117
2. 論文標題 Ultraviolet A light induced DNA damage and estrogen-DNA adducts in Fuchs endothelial corneal dystrophy causing females to be more affected.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 573-583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1912546116.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Omoto T, Toyono T, Inoue T, Shirakawa R, Yoshida J, Miyai T, Yamagami S, Usui T.	4. 巻 39
2. 論文標題 Comparison of 5-Year Clinical Results of Descemet and Non-Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cornea.	6. 最初と最後の頁 573-577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ICO.0000000000002211.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita A, Ushiku T, Miyai T.	4. 巻 126
2. 論文標題 Huge Corneal Fibroma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ophthalmology.	6. 最初と最後の頁 1526-1526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.opthta.2019.06.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyai T, Vasanth S, Melangath G, Deshpande N, Kumar V, Benischke AS, Chen Y, Price MO, Price FW Jr, Jurkunas UV.	4. 巻 189
2. 論文標題 Activation of PINK1-Parkin-Mediated Mitophagy Degrades Mitochondrial Quality Control Proteins in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 2061-2076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2019.06.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita A, Yoshida J, Toyono T, Usui T, Miyai T.	4. 巻 44
2. 論文標題 Severity Assessment of Acute Hydrops Due to Recurrent Keratoconus after Penetrating Keratoplasty Using Anterior Segment Optical Coherence Tomography.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Eye Res.	6. 最初と最後の頁 1189-1194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02713683.2019.1629597.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyai Takashi	4. 巻 37
2. 論文標題 Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy and Mitochondria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 S74 ~ S77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IC0.0000000000001746	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukushima Masaya, Inoue Tatsuya, Miyai Takashi, Obata Ryo	4. 巻 30
2. 論文標題 Retinal dystrophy associated with Danon disease and pathogenic mechanism through LAMP2-mutated retinal pigment epithelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 570-578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1120672119832183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Junko, Murata Hiroshi, Miyai Takashi, Shirakawa Rika, Toyono Tetsuya, Yamagami Satoru, Usui Tomohiko	4. 巻 256
2. 論文標題 Characteristics and risk factors of recurrent keratoconus over the long term after penetrating keratoplasty	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 2377 ~ 2383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-018-4131-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omoto Takashi, Sakisaka Toshihiro, Toyono Tetsuya, Yoshida Junko, Shirakawa Rika, Miyai Takashi, Yamagami Satoru, Usui Tomohiko	4. 巻 37
2. 論文標題 Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty for Failed Penetrating Keratoplasty	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 462 ~ 465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IC0.0000000000001531	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宮井尊史	4. 巻 267
2. 論文標題 【リピート病の病態機構UPDATE-RNA毒性とRAN翻訳】 Fuchs角膜内皮変性症におけるリピート病態	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 814-816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Hitoha, Yoshida Junko, Toyono Tetsuya, Yamagami Satoru, Usui Tomohiko, Miyai Takashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Three-year results of accelerated transepithelial cross-linking (30 mW/cm ² × 3 min) for keratoconus: a prospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMJ Open Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 e000827 ~ e000827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjophth-2021-000827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abe Kentaro, Miyai Takashi, Toyono Tetsuya, Aixinjueluo Wei, Inoue Tatsuya, Asano Shotaro, Ishii Hitoha, Yoshida Junko, Shirakawa Rika, Usui Tomohiko	4. 巻 47
2. 論文標題 Comparison of efficacy and safety of accelerated trans-epithelial crosslinking for keratoconus patients with corneas thicker and thinner than 380 μm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Eye Research	6. 最初と最後の頁 511 ~ 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02713683.2021.2018466	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omoto Takashi, Agata Chisato, Akiyama Reina, Kitamoto Kohdai, Toyono Tetsuya, Yoshida Junko, Yamagami Satoru, Usui Tomohiko, Miyai Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Iridotrabecular and Iridocorneal Contact Changes after Cataract Surgery and Endothelial Keratoplasty in Bilateral Iridoschisis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Reports in Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 198 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000513793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 橋本友美
2. 発表標題 齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症に角膜内皮障害を伴う一例
3. 学会等名 第124回日本眼科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Miyai
2. 発表標題 Anterior and posterior corneal astigmatism with and without corneal edema in Fuchs endothelial corneal dystrophy
3. 学会等名 The 13th Joint Meeting of Korea-China-Japan Ophthalmologists (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Miyai, Kodai Kitamoto, Yukako Taketani, Yasuo Ouchi, Tomohiko Usui
2. 発表標題 CTG repeat excision in TCF4 gene of corneal endothelium with CRISPR-cas9
3. 学会等名 第123回 日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Miyai, Kodai Kitamoto, Yukako Taketani, Yasuo Ouchi, Tomohiko Usui
2. 発表標題 Genome-editing with CRISPR-cas9 system targeting intronic CTG repeat of TCF4 gene in corneal endothelium.
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Miyai
2. 発表標題 Effect of mitochondrial fission inhibitor, Mdivi-1, on apoptosis related pathway in corneal endothelium
3. 学会等名 The 16th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine & The 19th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮井尊史
2. 発表標題 角膜クロスリンキング
3. 学会等名 第73回 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮井尊史
2. 発表標題 CRISPR-Cas9を用いた角膜内皮細胞におけるTCF4遺伝子のCTGリピート部位の切除
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Miyai
2. 発表標題 Genome-editing with CRISPR-Cas9 system targeting intronic CTG repeat of TCF4 gene in corneal endothelium.
3. 学会等名 Association for Research in Vision and Ophthalmology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lily Wei Chen, Yasuo Ouchi, Azusa Kamikawa, Yumi Hashimoto, Kohdai Kitamoto, Tetsuya Toyono, Makoto Aihara, Tomohiko Usui, Takashi Miyai
2. 発表標題 Effect of intronic CTG repeat excision in TCF4 gene on corneal endothelial cells
3. 学会等名 第125回 日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮井尊史
2. 発表標題 Fuchs角膜内皮ジストロフィの病態と治療
3. 学会等名 角膜カンファランス2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮井尊史
2. 発表標題 Fuchs endothelial corneal dystrophy from the viewpoint of pathophysiology
3. 学会等名 第126回 日本眼科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Lily Chen, 1 Yasuo Ouchi, 2; Azusa Kamika Yumi Hashimoto, Kohdai Kitamoto, Tetsuya Toyono, Makoto Aihara, Tomohiko Usui, Takashi Miyai
2. 発表標題 Cellular model for FECD with CRISPR/Cas9-mediated CTG repeat expansion
3. 学会等名 第126回 日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------