

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09971

研究課題名(和文) 網膜色素変性を自然発症するカニクイザルの病態解明と繁殖に向けた準備

研究課題名(英文) The study of determining the disease pathogenesis and developing the attractive animal disease model using cynomolgus monkeys with retinitis pigmentosa

研究代表者

池田 康博 (Ikeda, Yasuhiro)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：20380389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまで同定されていた網膜色素変性(RP)を発症したカニクイザル2頭(2007年生雌、2013年生雄)に加え、本研究にて新規の発症個体(2017年生雄)を発見した。さらに、ヘテロ接合体(雄2頭、雌6頭)を同定できている。また、RPを発症した個体(2013年生雄)が死亡したため、眼球を摘出し、病理学的な検討を実施した。既に網膜外層の変化が強いことが明らかとなり、疾患の進行が早いことが予想された。本研究で実施した全ゲノムシーケンスでは、病因遺伝子となる有力な候補遺伝子が同定できなかったため、死亡した個体の眼球を用いてRNAseqによる遺伝子発現解析を実施し、病因遺伝子解析に応用する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

死亡した発症個体の眼球に対する病理組織学的検討により、網膜変性の進行が早いことが予想された。従って、治療薬に対する効能試験に使用するのに好都合な疾患モデルとなる可能性が高いことが明らかとなった。また、新たな発症個体の発見とヘテロ接合体を複数同定できたことにより、疾患コロニーが樹立できる可能性が十分にある。今後、カニクイザルの疾患コロニーが構築できれば、基礎研究で探索された治療法を臨床へ応用する前に、確実性の高い効能試験が実施できる体制が整う。将来的には、RPの治療法開発に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found a new individual with retinitis pigmentosa (RP) among the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigreed population at Tsukuba Primate Research Center, in addition to the two monkeys who were previously discovered. Moreover, we found eight carriers (2 males and six females). We also performed histopathological examination of the eyes ball from the monkey (7 years old male) with RP accidentally died. Severe retinal degeneration was observed and we expected that the disease progression of these monkeys might be fast. Unfortunately, the whole genome sequencing analysis we performed could not identify the pathogenic mutations in these monkeys. Now we perform the RNAseq analysis using these eyes to identify the pathogenic mutations.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素変性 疾患モデル動物 カニクイザル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性 (RP) をはじめとする遺伝性網膜変性疾患は、現時点で有効な治療法の確立されていない眼科領域の難病で、早期の治療法開発が望まれている。研究代表者らのグループは、RP に対する視細胞保護遺伝子治療の実用化を目指したトランスレーショナルリサーチを実践し、アジア初の臨床応用を実現した。

遺伝子治療や再生医療が近未来の治療法として期待され、疾患モデル動物を用いた効能試験を含めた前臨床試験が実施されているが、モデル動物として、ヒトと同じ遺伝子変異を有するマウスなどの齧歯類が一般的に使用されているのが現状である。しかしながら、種が大きく異なることで治療効果や安全性などが必ずしも患者で再現できないという致命的な問題がある。疾患モデル動物として、ヒトに近いカニクイザルのような霊長類が基礎研究に使用できれば、疾患の病態を忠実に再現しているため、患者での病態メカニズムの正確な理解に直結するだけでなく、より説得力のある確実性の高い効能試験結果が得られる可能性が期待できると考えた。

霊長類において、遺伝性網膜変性を有した個体の報告はあるが家系はなく、疾患モデル動物として繁殖されている個体は皆無である。霊長類医科学研究センターでは、35 年以上にわたり家系が厳密に管理・維持されたカニクイザルの大規模繁殖コロニー (約 1400 頭) があり、さらに本コロニー内には自然発症する遺伝性疾患が存在することも既に明らかになっている。これまでの研究で、我々は常染色体劣性遺伝 RP を自然発症するカニクイザルの家系を世界で初めて発見した (Ikeda Y, et al. *IOVS*. 2018.)。この家系を中心に更なる疾患を有する個体の検索を進めながら、現有の個体からの繁殖コロニー樹立を試みる。最終的に疾患コロニーが樹立できる可能性が十分にあり、RP の治療法開発に大きく寄与することが期待される

2. 研究の目的

本研究は、RP の疾患モデル動物としてカニクイザルの繁殖コロニーを構築することで、RP の病態メカニズムの正確な理解と、より確実性の高い効能試験が実施できる体制を整え、「網膜色素変性を自然発症するカニクイザルのコロニー構築と疾患モデルとしての応用」という将来的な研究課題へと繋げるための立ち上げの段階と位置付けており、具体的には、以下のテーマを実施することを目的とする。テーマ 1. 網膜色素変性を自然発症するカニクイザルの家系調査、テーマ 2. 病因遺伝子の同定と病態メカニズムの解析、テーマ 3. 繁殖コロニー構築に向けた準備

3. 研究の方法

初年度に眼科的検査を実施し、RP を発症した新たな個体の探索を行う。RP を発症した個体については経過観察しながら、経時的に血液や前房水などのサンプルを採取する。さらに、一部の個体を安楽殺し、眼球を用いた病理組織学的ならびに分子生物学的解析により病態メカニズムを解明する。並行しながらテーマ 2 の病因遺伝子検索を実施する。病因遺伝子が同定された後、家系における遺伝子スクリーニング検査により、病因遺伝子を有する個体を同定しながら、テーマ 3 へと進む予定である。

テーマ 1. 網膜色素変性を自然発症するカニクイザルの家系調査

RP を有する個体ならびにその近親について、診断を確定させるために、眼科的検査を実施する。具体的には、細隙灯検査、眼底検査、網膜電図測定、光干渉断層計 (OCT) 検査を実施する。並行して、2013 年以降に生まれたサルについて、眼底写真撮影により、新たに疾患を有する個

体のスクリーニングを実施する。疾患が疑われる個体については、その都度上記の眼科的検査を行い、診断を確定させる。

また、RP を発症した個体を経過観察しながら、経時的に血液や前房水などのサンプルを採取する。これまでに、明らかとなっている慢性炎症、酸化ストレスなどのマーカーについて変化を検討するとともに、新たなバイオマーカーとなる因子を探索する。さらに、病理組織学的ならびに分子生物学的解析により病態メカニズムを検討するために、一部を安楽殺し、眼球を摘出する場合がある。

テーマ2 . 病因遺伝子の同定と病態メカニズムの解析

病因遺伝子の同定のために、RP を発症した個体（2 頭）に加え、それぞれの両親（4 頭）・同胞（2 頭）・子（2 頭）・同胞の子（2 頭）の合計 12 頭より血液を採取した。DNA を精製したあと、12 検体全てにエクソーム解析を行った。既知の網膜色素変性関連遺伝子を中心に変異検索を行ったこれまでの解析では、病因遺伝子となる有力な候補遺伝子が同定できていない。その理由として、ヒトを対象としたキットでエクソン領域をキャプチャーしたこともあり、高い信頼度（depth 20X 以上）でシーケンスできたゲノムはターゲット領域の約 85%であったことや、構造変異などの解析が行えていないことなども考えられた。これらの問題を克服する為に、本研究では、収集済みの DNA サンプルを対象にあらためて全ゲノムシーケンスを行い、既知の網膜色素変性関連遺伝子を含めて再度遺伝子解析する予定である。

有望な候補となる新規遺伝子や既知の網膜色素変性関連遺伝子にミスセンス変異が見つかった場合は、病気との関連性を証明するために遺伝子の発現解析や機能解析の実験を行う。発現解析は AAV をベースにしたプロモーター解析とサル網膜を用いた免疫組織化学染色を行う。機能解析は、AAV をベースにした過剰発現と CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集でターゲット遺伝子切除をマウスに対して行う。AAV を投与したマウスに対して組織学的解析と電気生理学的機能解析を行うことにより、候補となる新規遺伝子やミスセンス変異が網膜に与える影響を *in vivo* で評価する。

テーマ3 . 繁殖コロニー樹立に向けた準備

疾患個体の繁殖：霊長類センターの繁殖方式は 1 対 1 交配のため、全個体の交配履歴が明らかである。そこで、最初に発見した RP 疾患個体（ ）を家系解析から病因遺伝子を保因していると考えられる個体を両親や兄弟などの近親交配を避けて優先的に交配を行う。また、次に発見された疾患個体は雄で未成熟である。性成熟後、雌との交配を行う。

疾患症状と繁殖能：RP 疾患個体（ ）の疾患の進行度を定期的な眼底撮影を行うことで評価し、症状と繁殖の相関を調べる。症状の程度により繁殖への影響の有無を明らかにする。RP 疾患個体（ ）については、性成熟に達し次第、雌との交配を行うが、雌の妊娠および膣スメアの精子有無を観察し、繁殖能力を疾患症状と関連付けて評価する。

人為的な個体作出：症状悪化による繁殖能力の低下や単に繁殖しないなどといった疾患コロニー構築を阻害する要因が想定できる。そこで人工授精、受精卵の作出、胚移植などの技術に関する検討を行う。

病因遺伝子が明らかになった際には、大規模な遺伝子検査を行い、病因遺伝子の保因個体を特定する。そして、近親交配を避けた繁殖を行い、コロニー構築の基盤作りを推進する。

4 . 研究成果

テーマ1 . 網膜色素変性を自然発症するカニクイザルの家系調査

本研究開始時既に、常染色体劣性遺伝形式で RP を自然発症するカニクイザル 2 頭（個体 A :

2007 年生雌、個体 B：2013 年生雄）を同定し、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センター（つくば市）にて飼育していた。2019 年度は、これらの発症個体の近親にあたる個体を中心に眼底検査を新たに実施した。さらに、その中から RP が疑われる個体（4 頭）に対して網膜電図測定を実施したところ、1 頭（個体 C < 2017 年生雄 >）は杆体応答ならびに錐体応答がいずれも消失型であり、RP を有する発症個体であると診断された。個体 C は、個体 B の異母兄弟であった。引き続き、2021 年度までに新たに出生した個体（6 頭）に対し、網膜電図測定等の眼科的検査を実施したが、いずれも RP を発症していなかった。

テーマ 2 . 病因遺伝子の同定と病態メカニズムの解析

RP を発症した個体（2013 年生雄）が死亡したため、眼球を摘出し、病理組織標本を作製し、病理学的な検討を実施した。既に網膜外層の変化が強いことが明らかとなり、疾患の進行が早いことが予想された。従って、将来的には治療薬に対する効能試験に使用するのに好都合な疾患モデルとなる可能性が高い。

全ゲノムシーケンスにより、病因遺伝子となる有力な候補遺伝子が同定できなかった。現在、個体 B の眼球を用いて RNAseq による遺伝子発現解析を実施中であり、病因遺伝子解析に応用する予定である。

テーマ 3 . 繁殖コロニー樹立に向けた準備

これまでに実施した家系内調査により、RP を発症した新たな個体（個体 C）だけでなく、ヘテロ接合体（雄 2 頭、雌 6 頭）を同定できている。現時点で性成熟に達していない個体もいるが、性成熟に達した後にこれらの個体を交配、もしくは人工授精する予定である。2022 年度に採択された基盤研究 C「網膜色素変性を自然発症するカニクイザルの繁殖と治療法開発への応用」で、本研究計画からの継続した研究を実施する予定となっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	西口 康二 (Nishiguchi Koji) (30447825)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	下澤 律浩 (Shimozawa Nobuhiro) (50300786)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医学研究センター・主任研究員 (84420)	

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