

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03838

研究課題名（和文）CRISPRスクリーニングによる緑内障感受性遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of glaucoma susceptibility genes by CRISPR screening

研究代表者

中澤 徹（Nakazawa, Toru）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30361075

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：緑内障GWASにより得られたゲノムワイド有意水準を満たす遺伝子群のうち、神経脆弱性に寄与する遺伝子を同定することを目的としたCRISPRスクリーニングを実施した。本実験に先立ち、実験系の構築としてSpCas9を恒常的に発現させた安定細胞株の樹立とゲノム編集効率の評価を実施し、既知の緑内障関連遺伝子を評価した結果アポトーシス細胞の誘導を認めた。本試験系は神経脆弱性の評価系として有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は中途失明原因のトップであり、他の失明眼疾患が減少する中で、緑内障による失明患者数は増加の一途を辿っている。多因子疾患である緑内障の病態には遺伝的要因が示唆されており、国際コンソーシアムを中心とした大規模な遺伝子解析がなされている。一方で既存のGWAS情報のみでは疾患表現型に直接影響を与える感受性遺伝子の同定が困難であった。本研究結果は、遺伝的要因により発症する緑内障の病態解明および疾患に關与するターゲット分子を効率的に調べることができるシステムの構築として大きな意義があり、今後の創薬ターゲットの同定が期待される。

研究成果の概要（英文）：A CRISPR screen was conducted to identify genes that contribute to neurovulnerability among a group of genes that fulfill the genome-wide significance level obtained by the glaucoma GWAS. Prior to this experiment, we established a stable cell line with constant expression of SpCas9 and evaluated the efficiency of genome editing as the experimental system, and evaluated known glaucoma-related genes, which showed induction of apoptotic cells. This test system was shown to be useful as an evaluation system for neurovulnerability.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 ゲノムワイド関連解析 CRISPRスクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障は、本邦では中途失明原因第一位の眼疾患であり、人口の高齢化とともに患者数は増加の一途を辿っている。眼圧下降が唯一エビデンスのある治療だが、十分な眼圧下降が得られても半数程度の症例では視野障害がさらに進行するのが現状である。さらに、本邦の緑内障患者における約7割が正常眼圧緑内障であり眼圧非依存的因子が主病態の症例が多く存在し、病態解明と機序依存的な創薬は急務である。これまでの基礎および臨床研究から、緑内障性の視神経障害には他の中枢神経変性疾患と同様に興奮性アミノ酸、慢性炎症、酸化ストレス、微小眼循環障害、栄養因子枯渇、遺伝的要因などの多様な原因因子が想定されている。

緑内障における原因遺伝子として詳細に検討されているオプティニューリン遺伝子変異による RGC 障害はオートファジーの異常が主要因と報告され、眼圧非依存性である。特にオプティニューリン E50K 遺伝子変異の症例では損傷ミトコンドリア代謝 (mitophagy) の機能不全に繋がっている (Minegishi et al., Hum Mol Gene. 2013, Wnog et al., Proc Natl Acad Sci. 2014)。また、GWAS により緑内障関連 SNP として同定された Six6 のリスクアレルを持つ緑内障患者から樹立した iPS 由来 RGC は機能的、形態的異常を引き起こし RGC 死が誘導されることが報告されている (Teotia et al., Stem Cells. 2017)。その一方で、SNP が翻訳領域以外にある場合には緑内障病態との関連は不明な点が多い。

申請者の施設では東北メディカルメガバンク機構による 15 万人のゲノムコホートを基盤とし、疾患と比較することにより、国内ではゲノム研究を推進するのに恵まれた環境が揃っている。当科からは、日本人の SNP 検出に有効なジャポニカアレイを用いて、500 人規模で 3 個の緑内障関連 SNP を同定し、臨床パラメータとの相関を解析し報告した (Shiga et al, PLoS One 2017)。加えて、理化学研究所との共同研究で日本人緑内障患者を主な対象とした約 10 万人の世界最大規模 (当時) の GWAS を遂行し、申請者が新規に同定した 7 個を含む計 11 個の緑内障関連 SNP を報告した (Shiga et al., Hum Mol Gene. 2018)。一方、GWAS により同定された遺伝子の病態への寄与は十分に理解されていない。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子多型における緑内障病態への関与を明らかにし、創薬研究に橋渡しすることを目的とする。

3. 研究の方法

東北大学病院ならびに関連病院で収集された緑内障患者のゲノム DNA を東北大学メディカルメガバンク機構で開発された SNP アレイであるジャポニカアレイによりジェノタイプピングした。また、東北大学メディカルメガバンク機構で保有する年齢調整された住民コホートサンプルのゲノム DNA をコントロールとした GWAS を実施した。

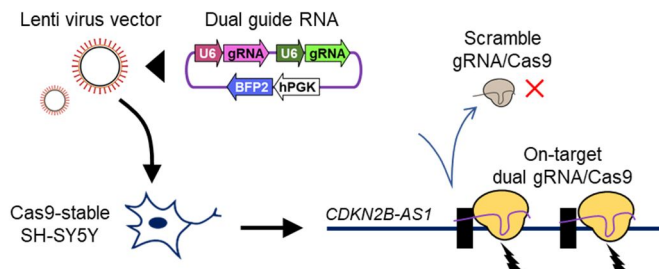
GWAS によりヒットした遺伝子をゲノム編集するための CRISPR Screening 用 gRNA を設計し、レンチウイルスにパッケージングしてライブラリーを作製した。また、スクリーニングに用いる細胞としてヒト神経線維芽細胞株 (SH-SY5Y) に SpCas9 を恒常的に発現させた安定細胞株をレンチウイルスによる遺伝子導入で樹立した。

上述の実験に先立ち、SpCas9 安定発現細胞株を用いたゲノム編集実験系の確認のため、CRISPR Screening 用ベクターに CDKN2B-AS1 遺伝子をゲノム編集する gRNA を設計し搭載した。CRISPR Screening 用ベクターは dual gRNA として設計し、CDKN2B-AS1 をゲノム編集するための 2 種類の gRNA を U6 プロモーターの下流に設計した dual gRNA ベクターとした。また、ウイルス感染細胞を同定するため蛍光レポーターである BFP2 を hPGK プロモーターの下流に搭載した。ウイルス感染後に FACS で BFP2 陽性細胞を回収し、In-fusion cloning で目的箇所の遺伝子をクローニングし、サンガーシーケンスでゲノム編集の有無を確認した。また、ウイルスベクター感染細胞にアポトーシス細胞検出試薬であるアネキシン V ならびにカスパーゼ 3/9 活性を検出する蛍光プローブを添加し、タイムラプス機能を持つ蛍光顕微鏡であるインキュサイトをを用いて 6 時間おきに 72 時間後まで経時的に顕微鏡写真を撮影した。取得したデータは顕微鏡内のソフトウェアを用いて cell confluence、アネキシン V 蛍光陽性細胞面積、カスパーゼ 3/9 活性蛍光陽性細胞面積を定量化しグラフを作成した。

また、緑内障関連遺伝子の中でも神経の脆弱性に寄与する遺伝子を同定する目的で、CRISPR Screening 用のレンチウイルスベクターを感染させ 72 時間後に FACS によりアポトーシス陽性細胞を回収し、gRNA 配列をシーケンシングした。

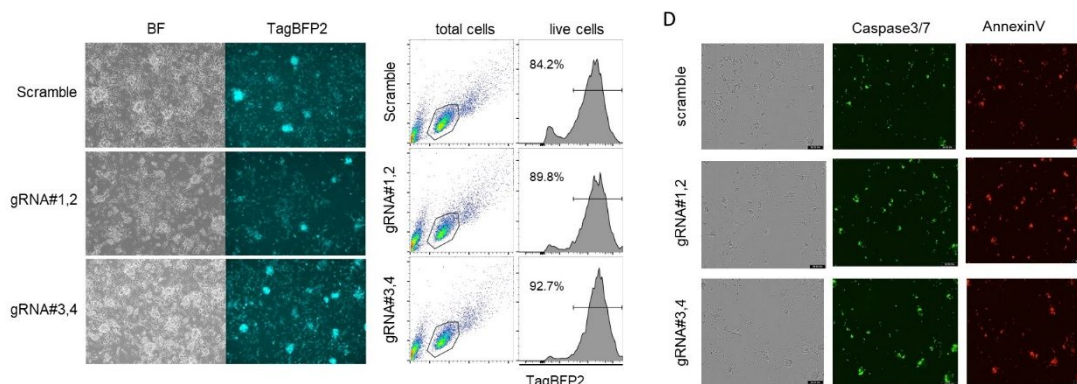
4. 研究成果

緑内障 GWAS (case 3357 例 vs control 7006 例) の結果、ゲノムワイド有意水準を超えた SNP は 25 遺伝子であった。そのうち過去の緑内障 GWAS (2020 Craig et al. Nat Genet, 2021 Gharahkhani et al. Nat Comm) でも共通に報告されている遺伝子として CDKN2B-AS1, CASC20 の 2 遺伝子が同定された。ゲノムワイド有意水準を超えた 25 遺伝子の近傍に存在する遺伝子を含めた合計 87 遺伝子について、神経脆弱性への寄与を培養細胞実験により検討した。CRISPR Screening に先立ち、使用する SpCas9 安定発現細胞株を用いたゲノム編集が可能かどうかを検証するため、代表的な緑内障関連遺伝子である CDKN2B-AS1 を標的としたゲノム編集を実施した (下図に実験の概要を示す)。



まず、ゲノム編集用レンチウイルスベクター感染させ 72 時間後に、BFP2 陽性のウイルスベクター感染細胞を FACS により単離精製した。BFP2 陽性の細胞はおよそ 80-90% であり、高効率にレンチウイルスベクターが SpCas9 安定発現細胞株に感染することを認めた (図)。

その後、FACS により単離した細胞の DNA 抽出し、サンガーシーケンスにより遺伝子変異の有無を確認した。その結果、4 種類の gRNA のうち #1 および #3 の gRNA で標的遺伝子である CDKN2B-AS1 のゲノムの挿入/欠失の遺伝子変異が導入されていることが確認された。続いて、この CDKN2B-AS1 をゲノム編集するレンチウイルスベクターを感染させたのち、アネキシン V ならびにカスパーゼ 3/9 活性を検出する蛍光プローブにより経時的に細胞死を検出した。その結果、gRNA#1 ならびに gRNA#3 のどちらを含むベクターにおいても、コントロールである scramble gRNA を搭載したベクターに比較して、アネキシン V 陽性細胞数ならびにカスパーゼ 3/9 陽性細胞数が有意に増加した (図)。本結果は、CDKN2B-AS1 をゲノム編集することで神経細胞死が誘導されることから、CDKN2B-AS1 は神経細胞の維持・恒常性に寄与することが示された。



続いて、SpCas9 を恒常的に発現する安定発現細胞株に対し、GWAS によりヒットした緑内障関連遺伝子 (87 遺伝子) をランダムにゲノム編集させる CRISPR Screening 用レンチウイルスライブラリーを感染させた。上述と同様に BFP2 陽性細胞の存在を確認したのち、インキュサイトをを用いて経時的に細胞死検出を実施したところ、CDKN2B-AS1 ゲノム編集細胞と同様に、緑内障関連遺伝子をランダムにゲノム編集した細胞においてもアポトーシス細胞の有意な増加が確認された。そのため、FACS により BFP2 陽性かつアポトーシス陽性のポピュレーションをソーティングし細胞を回収して次世代シーケンサーにより gRNA の配列を取得中である。今後、神経細胞のアポトーシスを誘導し神経脆弱性に寄与する遺伝子が同定されることが期待される。

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	小林 航 (Kobayashi Wataru) (20646442)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	佐藤 孝太 (Sato Kota) (50732327)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	

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