

令和 5 年 10 月 19 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09818

研究課題名(和文)黄斑低形成の臨床的および分子生物学的検討

研究課題名(英文)Clinical and molecular investigation on foveal hypoplasia

研究代表者

近藤 寛之(Hiroyuki, Kondo)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：40268991

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)：黄斑低形成とは先天的に黄斑の発達が障害された状態を示す。白皮症や無虹彩などの疾患に併発することが多く、その形態と機能の異常は多様である。本研究は日本人にみられる黄斑低形成のなかで、他の併発症を示さない孤立性黄斑低形成の症例の遺伝子異常と臨床像を明らかにし、黄斑の発達に関わるメカニズムの解明を目的とした。特に黄斑低形成をきたす代表的な遺伝子であるPAX6遺伝子について基礎的な実験を行い、黄斑低形成を生じる分子機構を明らかにした。さらにPAX6遺伝子に関する実験より新規の黄斑低形成の候補遺伝子を選定し症例に対してスクリーニングを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黄斑(部)は網膜の中心であり、最も視力の良好な部分を示す。黄斑の発達は視覚を用いた生活の根幹であり、先天的な視機能の障害である黄斑低形成では罹患児の教育や社会参加の大きな障害となる。黄斑低形成の原因となる遺伝子を解明し、その具体的な発症機序を解明することは本疾患の将来の治療や予防の策定に有用である。さらに、黄斑変性や糖尿病網膜症など、視力障害をきたすさまざまな網膜疾患に対する治療や視覚的リハビリテーションの開発にも有益な情報を提供する。

研究成果の概要(英文)：Foveal hypoplasia is a congenital disorder of macular development. It is often associated with diseases such as albinism and aniridia, and its morphological and functional abnormalities vary widely. The purpose of this study was to elucidate the genetic abnormalities and clinical features of isolated foveal hypoplasia in Japanese patients, and to elucidate the mechanisms involved in foveal development. We conducted basic experiments on the PAX6 gene, a representative gene causing foveal hypoplasia, and clarified the molecular mechanism that causes foveal hypoplasia. Furthermore, we selected new candidate genes for foveal hypoplasia based on the PAX6 gene experiments and screened them in patients.

研究分野：眼科学

キーワード：黄斑低形成 PAX6 全エクソームシーケンス siRNA トランス活性ドメイン SLC38A8 GPR143 FRM D7

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ヒトの黄斑部は胎齢後期から生後数年で発達するが、先天的に黄斑の発達が障害された状態が黄斑低形成である。黄斑低形成は重大な視機能障害を併発すると考えられてきたが、近年の眼科画像診断の進歩により、その形態と機能の異常とが相関しない軽症症例も存在することがわかってきた。また、黄斑低形成には白皮症や無虹彩などの疾患に併発することが多いが、このような併発症を示さない孤立性黄斑低形成も知られている。多くの黄斑低形成には *PAX6* 遺伝子など、原因となる遺伝子の異常が存在し、一部の症例では背景となる分子遺伝学的な機序が明らかとなっている。孤立性黄斑低形成を伴う遺伝子異常を解明することは、ヒトでどのような機序で黄斑が形成されるかを理解するショートカットとなり重要である。我が国では、*PAX6* 遺伝子による(常染色体顕性)孤立性黄斑低形成の報告が散見するのみで、遺伝学的解析を行なった症例はわずかであり、他の遺伝子の報告はない。また、*PAX6* 遺伝子ドメインのなかで黄斑低形成と関連する領域が示されているが臨床像との相関は十分明らかでない。さらに、*PAX6* 遺伝子と機能的に連結する遺伝子は黄斑低形成をおこす原因遺伝子となりうるが、十分な検討がなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は孤立性黄斑低形成の症例の遺伝学的変化(原因遺伝子とタイプ)を明らかにし、どのような遺伝子の異常によって黄斑低形成を生じるかを明らかにすることである。また、遺伝子型と臨床像との相関を解明し、遺伝子およびそのバリエーションのタイプにみられる特性を解明する。特に *PAX6* 遺伝子における黄斑低形成の遺伝子型・表現型の相関を明らかにし、*PAX6* 遺伝子内のドメインごとの臨床像の特性を示す。さらに *PAX6* 遺伝子については培養細胞を用いた遺伝子の発現環境を構築し、主に発現解析によって遺伝子型・表現型に関する機能異常を明示し、新規の黄斑低形成の原因遺伝子の解明を試みる。

3. 研究の方法

孤立性黄斑低形成の症例を収集し、*PAX6* 遺伝子などの個別の黄斑低形成の原因遺伝子に対してサンガー法による DNA 配列を同定し、バリエーションの陰性例には全エクソームシーケンスを行なって遺伝子を同定する。同定されたバリエーションについては、bioinformatics 解析を含む評価を行い、バリエーションと臨床像との相関を明らかにする。特に、オカルトすなわち機能の温存されている黄斑低形成と機能障害の明らかな症例との対比を行い、黄斑低形成の臨床像を再分類する。全エクソームシーケンスでの変異陰性例に対しては、新規の候補遺伝子(後述)に対してもバリエーションの精査を行い評価する。

PAX6 遺伝子陽性例についてはそのバリエーションに対して培養細胞を用いる実験系を構築し、転写活性や DNA 結合能を評価し、臨床像との相関を検討する。

ヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19/HPV-16 細胞) および不死化ヒト(胎児)ドーパミン作動性神経細胞 (LUHMES 細胞より分化) に野生型および各種変異型 *PAX6* 遺伝子を安定発現させる。これらの細胞から RNA を精製し、mRNA の網羅的解析を行う。mRNA の発現プロファイルおよび発現制御解析から、*PAX6* 遺伝子と機能的に関連のある遺伝子を同定する。特に中心窩形成に関わるものとしてアポトーシスや細胞骨格、接着分子に関わる遺伝子に焦点をあて、変異型 *PAX6* 遺伝子による発現への影響を解析する。

4. 研究成果

(1) 孤立性黄斑低形成の遺伝子型・表現型の相関

a) *PAX6* 遺伝子

常染色体顕性孤立性黄斑低形成症例 8 家系 13 症例について、8 種類の *PAX6* 遺伝子バリエーションを同定した。7 種類はミスセンスバリエーションであり、1 種類はスプライスバリエーションであった。1 種類のミスセンスバリエーションを除き、いずれも新規のバリエーションであった。これまでの研究ではペアード・ドメインが黄斑低形成の責任領域であるとされてきたが、この領域はさらに N-末端サブドメイン(NTS)と C-末端サブドメイン(CTS)に分かれ、今回検出されたバリエーションは CTS に最も多くみつき、ホメオドメインやトランス活性化ドメイン内に局在するバリエーションも見つかった。

症例によって視力不良や眼振、OCT 所見などから機能的に重症を示すものと軽症を示すものに分類可能であった。隅角検査が可能であった 8 例中 7 例では隅角の形成不全がみられ、*PAX6* 遺伝子を原因とする孤立性黄斑低形成の特徴的な所見であることが示された。トランス活性化ドメイン内のバリエーションは他のバリエーションと比べ視力などの視機能が良好であった。本研究結果は 2020 年度および 2021 年度の日本眼科学会で報告し、Genes 誌 (2023 年) に掲載された。

b) *PAX6* 遺伝子以外の遺伝子異常

PAX6 遺伝子のスクリーニングで陰性であった 6 家系 7 症例に対して全エクソームシーケンスを行い、原因となる遺伝子の同定を行い、その表現型を明らかにした。6 家系中 5 家系では、常染色体性孤立性黄斑低形成の原因遺伝子である *SLC38A8* 遺伝子をはじめ、眼白皮症や先天性眼振の原因遺伝子である *GPR143* 遺伝子や *FRMD7* 遺伝子の変異を我が国ではじめて明らかにした。原因遺伝子が同定できなかった 1 症例については、本研究による新規候補遺伝子に対して全エクソームシーケンスの結果に基づいて評価を行ったが、有意な遺伝子バリエーションの同定には至らなかった。本研究結果は 2023 年度の日本眼科学会で報告した。我が国最初の *SLC38A8* 遺伝子変異例については *Doc Ophthalmol* 誌に報告した。

(2) 孤立性黄斑低形成を起こす PAX6 遺伝子バリエーションの機能解析

PAX6 遺伝子の発現プラスミドを作製し、培養細胞を用いた実験系を確立した。上述の 7 種類の PAX6 遺伝子ミスセンスバリエーションおよびフレームシフトタイプの PAX6 遺伝子バリエーションに対して DNA 結合能と転写活性を評価した。

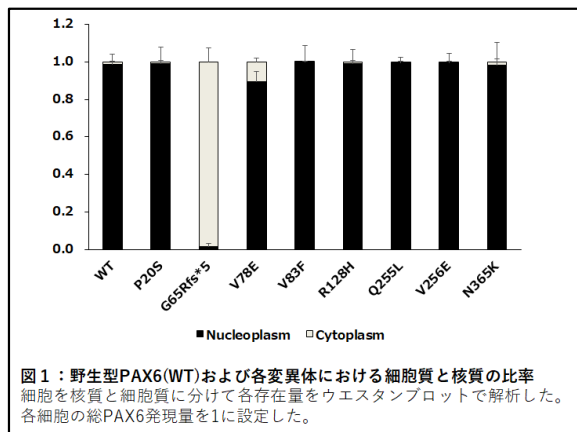


図 1：野生型PAX6(WT)および各変異体における細胞質と核質の比率
細胞を核質と細胞質に分けて各存在量をウエスタンブロットで解析した。
各細胞の総PAX6発現量を1に設定した。

対して DNA 結合能と転写活性を評価した。PAX6 遺伝子内のメインごとの転写活性について評価を行ったところ、フレームシフトバリエーションは核内移行を示さなかった(図 1)。残りのバリエーションについては、DNA 結合能と転写活性は概ね一致し DNA 結合能が低いバリエーションでは転写活性の低下が見られた(図 2)。NTS バリエーションは転写活性の低下がみられなかった。トランス活性化ドメインに位置するバリエーションは DNA に結合できるものの転写活性の低下がみられた(図 3)。本研究で初めて DNA 結合能と転写活性の乖離を示すバリエーションが存在することが示された。本研究結果は 2021 年度の日本眼科学会で報告し、*Genes* 誌(2023 年)に掲載された。

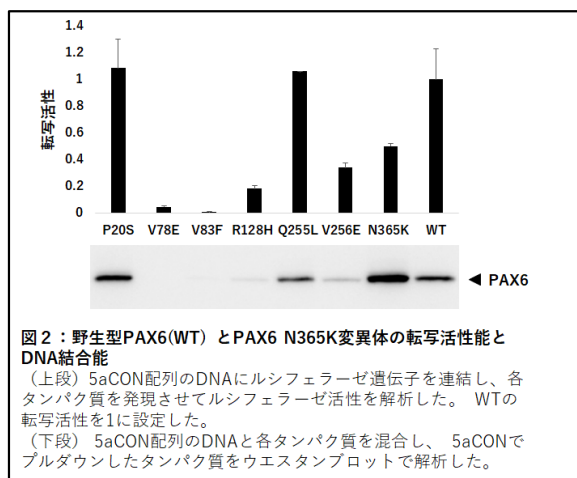


図 2：野生型PAX6(WT) とPAX6 N365K変異体の転写活性能とDNA結合能
(上段) 5aCON配列のDNAにルシフェラーゼ遺伝子を連結し、各タンパク質を発現させてルシフェラーゼ活性を解析した。WTの転写活性を1に設定した。
(下段) 5aCON配列のDNAと各タンパク質を混合し、5aCONでプルダウンしたタンパク質をウエスタンブロットで解析した。

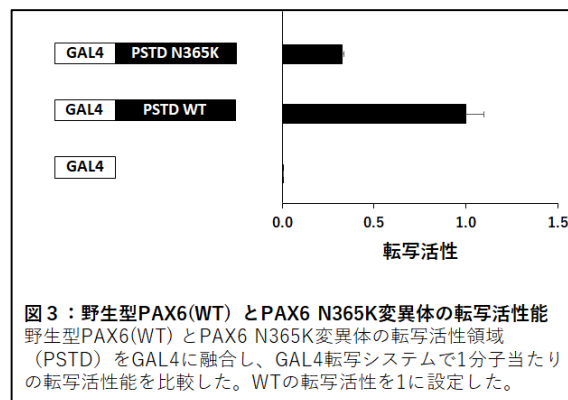


図 3：野生型PAX6(WT) とPAX6 N365K変異体の転写活性能
野生型PAX6(WT) とPAX6 N365K変異体の転写活性領域 (PSTD) を GAL4 に融合し、GAL4 転写システムで 1 分子当たりの転写活性を比較した。WT の転写活性を 1 に設定した。

(3) ヒト培養細胞を用いた PAX6 遺伝子のノックダウンによる mRNA の網羅的解析

さらに培養細胞 (ARPE19 および LUHMES) を用いて PAX6 遺伝子を siRNA でノックダウンさせ、発現が変動する遺伝子をマイクロアレイで調べた。合計 29 種類の遺伝子が対照と比べて発現が増大もしくは低下した。これらの遺伝子としては、SOX 遺伝子ファミリーの転写因子や SLC トランスポーター遺伝子、ミトコンドリアリボソーム蛋白遺伝子、T-細胞膜免疫蛋白遺伝子などがあつた。29 種類の遺伝子のうち 23 種類は網膜で発現がみられた。本研究結果については 2022 年度の日本眼科学会で報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsushita Itsuka, Izumi Hiroto, Ueno Shinji, Hayashi Takaaki, Fujinami Kaoru, Tsunoda Kazushige, Iwata Takeshi, Kiuchi Yoshiaki, Kondo Hiroyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Functional Characteristics of Diverse PAX6 Mutations Associated with Isolated Foveal Hypoplasia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1483 ~ 1483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes14071483	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 Hayashi Takaaki, Kondo Hiroyuki, Matsushita Itsuka, Mizobuchi Kei, Baba Akinori, Iida Kie, Kubo Hiroyuki, Nakano Tadashi	4. 巻 143
2. 論文標題 Homozygous single nucleotide duplication of SLC38A8 in autosomal recessive foveal hypoplasia: The first Japanese case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Documenta Ophthalmologica	6. 最初と最後の頁 323 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10633-021-09842-y	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 Kondo Hiroyuki, Matsushita Itsuka, Nagata Tatsuo, Fujihara Etsuko, Hosono Katsuhiro, Uchio Eiichi, Hotta Yoshihiro, Kusaka Shunji	4. 巻 10
2. 論文標題 Retinal Features of Family Members With Familial Exudative Vitreoretinopathy Caused By Mutations in <i>KIF11</i> Gene	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Vision Science & Technology	6. 最初と最後の頁 18 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.10.7.18	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 近藤寛之	4. 巻 125
2. 論文標題 総説87 黄斑低形成 (専門医制度・生涯教育講座)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日眼会誌	6. 最初と最後の頁 695-708
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 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 近藤寛之	4. 巻 98
2. 論文標題 小児眼科疾患 はじめの一步 特集こども眼科外来 はじめの一步ー乳児から小児までー	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 OCULISTA	6. 最初と最後の頁 50-58
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 近藤寛之	4. 巻 75
2. 論文標題 小児期に遭遇する網膜ジストロフィ (特集・網膜色素変性のアップデート)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床眼科	6. 最初と最後の頁 1501-1510
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 Fujimoto Kazushi, Nagata Tatsuo, Matsushita Itsuka, Oku Kazuma, Imagawa Mamika, Kuniyoshi Kazuki, Hayashi Takaaki, Kimoto Kenichi, Ohji Masahito, Kusaka Shunji, Kondo Hiroyuki	4. 巻 41
2. 論文標題 ULTRA-WIDE FIELD FUNDUS AUTOFLUORESCENCE IMAGING OF EYES WITH STICKLER SYNDROME	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Retina	6. 最初と最後の頁 638 ~ 645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IAE.0000000000002879	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 Matsushita Itsuka, Morita Hirofumi, Kondo Hiroyuki	4. 巻 64
2. 論文標題 Autosomal dominant foveal hypoplasia without visible macular abnormalities and PAX6 mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 635 ~ 641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-020-00766-9	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 Kondo Hiroyuki, Fujimoto Kazushi, Imagawa Mamika, Oku Kazuma, Matsushita Itsuka, Hayashi Takaaki, Nagata Tatsuo	4. 巻 140
2. 論文標題 Electroretinograms of eyes with Stickler syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Documenta Ophthalmologica	6. 最初と最後の頁 233 ~ 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10633-019-09739-x	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8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松下五佳、和泉弘人、近藤寛之
2. 発表標題 PAX6標的遺伝子の検索と孤立性黄斑低形成例における関与
3. 学会等名 第126回日本眼科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤寛之、松下五佳、川村朋子、内尾英一、日下俊次、林孝彰、白澤誠、仁科幸子、金子優、川崎良、坂本泰二
2. 発表標題 我が国の家族性滲出性硝子体網膜症250家系の遺伝子解析
3. 学会等名 第126回日本眼科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅野真美加、奥一真、横山勝彦、木許賢一、久保田敏昭、近藤寛之
2. 発表標題 COL2A1ミスセンス変異に黄斑変性を合併したStickler症候群の2家系
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第6大会 第28回日本遺伝子診療学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田啓文、松下五佳、笹野紘之、尾花明、近藤寛之
2. 発表標題 マルチカラー走査レーザー眼底カメラを用いた反射法による黄斑色素密度の測定
3. 学会等名 第75回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松下五佳 森田啓文 和泉弘人 近藤寛之
2. 発表標題 PAX6遺伝子異常による転写機能の解析
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 近藤寛之
2. 発表標題 眼底疾患、白色瞳孔・瞳孔領白濁の発見と対処（教育セミナー4）
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松下五佳 森田啓文 黒田由賀利 上野真治 藤波芳 角田和繁 岩田岳 寺崎浩子 木内良明 近藤寛之
2. 発表標題 PAX6遺伝子異常を伴う優性遺伝性孤立性黄斑低形成における臨床的特徴と遺伝子型との関連
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤寛之
2. 発表標題 小兒眼底疾患の病態生理（特別講演）
3. 学会等名 第45回日本小兒眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Kondo Hiroyuki	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Nature Singapore	5. 総ページ数 5
3. 書名 A quick guide to pediatric retina	

1. 著者名 Hiroyuki Kondo	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Nature Singapore	5. 総ページ数 5
3. 書名 A quick guide to pediatric retina	

〔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	和泉 弘人 (IZUMI HIROTO) (50289576)	産業医科大学・産業生態科学研究所・准教授 (37116)	

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
---------	---------