

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18348

研究課題名（和文）RNA代謝異常による遺伝性網膜変性症の疾患モデル作製と発症機序の解明

研究課題名（英文）Development of a disease model of hereditary retinal degeneration caused by abnormal RNA metabolism and elucidation of the pathogenic mechanism

研究代表者

八塚 洋之（Yatsuka, Hiroyuki）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00812299

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：RNAエキソソームは、RNAの品質管理に重要な役割を担っている。研究代表者は、exosc2遺伝子をKnockoutした疾患動物モデルゼブラフィッシュを作製し、その病態にヌクレオチド代謝バランスの異常が関連することを報告した。同モデル動物は、ロドプシン免疫染色において、網膜ロドプシンの減少がみられた。同モデル動物の網膜機能は、網膜電図の検討、背地適応の検討等から低下していることが確認された。この結果はRNAエキソソームの遺伝子異常が、ヌクレオチド代謝バランスの異常と関連し、網膜変性を含む神経変性疾患の原因となる可能性があることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAエキソソームは、RNAの品質管理に重要な役割を担っている。このRNAエキソソームを構成するEXOSC2の遺伝子変異は、網膜変性を含む神経変性疾患の原因となることが報告されているが、その詳細な病態メカニズムは解明されていない。研究代表者らは、exosc2遺伝子をKnockoutした疾患動物モデルゼブラフィッシュを作製し、その病態にヌクレオチド代謝バランスの異常が関連し、網膜電図検査、背地適応の検討などの実験を通して、RNAエキソソームの異常が網膜変性の原因となる可能性があることを報告した。この研究成果はRNAエキソソーム関連神経変性疾患の病態解明、ひいては治療法の確立に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：RNA exosomes play an important role in RNA quality control. The principal investigator developed an animal model zebrafish model of the disease in which the exosc2 gene was Knockout, and reported that the pathology was associated with an abnormal nucleotide metabolic balance. The animal model showed decreased retinal rhodopsin in rhodopsin immunostaining. The retinal function of the model animal was confirmed to be decreased by examination of electroretinograms and back-ground adaptation. These results suggest that genetic abnormalities in RNA exosomes are associated with abnormal nucleotide metabolic balance and may cause neurodegenerative diseases, including retinal degeneration.

研究分野：眼科学

キーワード：ゼブラフィッシュ 神経変性疾患 網膜 RNAエキソソーム 背地適応

1. 研究開始当初の背景

RNA エキソソーム (図 1)は、様々な RNA を 3' から 5' に向かって分解・修飾する多タンパク質複合体であり、RNA の品質管理に重要な役割を担っている。

1997 年に発見されて以来、重要な分子機構として多くの研究者が注目し、解析が進められている (Mitchell P et al. Cell, 1997, Quansheng Liu et al. Cell, 2006)。また、近年の次世代シーケンサーの発達により、多

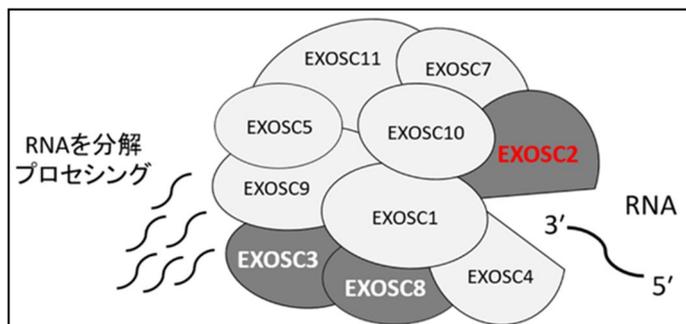


図 1: RNA エキソソーム

くの疾患遺伝子の報告が相次いでいるが、RNA エキソソームを構成する遺伝子についても主に神経変性疾患の原因となる遺伝子変異が複数報告されている。(Schwabova et al. Nat Genet, 2013, Veronika B et al. Nat Commun, 2014, Di Donato N et al. J Med Genet, 2016)。RNA エキソソームは、臨床医学的見地からも重要な分子機構と考えられるが、詳細な病態分子機構はほとんど解明されていなかった。その理由として、病態分子機構の解明のためには生体モデルの樹立とその解析が必須であるが、細胞の生存に重要な RNA エキソソーム構成分子のマウスモデルは早期に胎生致死のため詳細な解析が困難であることが一因であった。網膜変性は様々な原因により発生するが、遺伝子異常を原因とする網膜変性症は原因遺伝子が多く存在し、有効な治療法は少ない。一方で、網膜色素変性症の特殊な病型であるレーベル先天盲においては遺伝子治療の成功が報告されており (Bainbridge JW et al. N Engl J Med, 2006) 遺伝子異常を原因とする網膜変性は今後治療法の開発が期待される分野であった。研究代表者は RNA エキソソームの遺伝子変異によって網膜変性が生じることに着目し、RNA 代謝機構の異常が、網膜変性発生の原因となっていると考えた。その病態メカニズムを解明することにより、新たな網膜変性の治療法の開発につながると考えた。研究代表者は当初、疾患モデルとして EXOSC2 ノックアウトマウスを作製し解析する予定であったが、胎生早期に致死性であり解析が不可能であった。一方、ゼブラフィッシュは受精後約 72 時間で初期発生が完了し、透明胚のため眼発生の全過程が観察できる。また、眼科研究の分野においても疾患動物モデルとしての優れた実績があるため、ゼブラフィッシュを疾患動物モデルに据えた本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究は RNA エキソソームに関連した疾患動物モデルを作製し、その解析を通して病態機構を解明することを目的とする。本研究では、疾患動物モデルとして、電気生理、視覚機能等に関する研究に多くの利点を備えたゼブラフィッシュモデルを使用した。ヒトで遺伝子変異が報告されている RNA エキソソーム構成分子の遺伝子改変ゼブラフィッシュを作製し、形態学的、生化学的、生理学的解析を行った。これらの解析を通して、網膜変性発生の原因の一端を明らかにし、また関連する神経変性疾患も含め、新たな診断法、治療法の解明につながる研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変ゼブラフィッシュモデルの樹立と表現型の解析

CRISPR/Cas9 システムにより RNA エキソソーム関連遺伝子である *exoac2* をノックアウトしたゼブラフィッシュの疾患動物モデル作製し、その詳細な表現型を解析した。経時的な顕微鏡による表現型の観察、生存率の記録、小頭症の評価、小眼球症の評価を行った。

(2) 遺伝子改変ゼブラフィッシュモデルの核酸メタボローム解析

質量分析機器 (Waters ACQUITY UPLC-QDa) を用いて、遺伝子改変ゼブラフィッシュモデルの核酸メタボローム解析を行った。

(3) 遺伝子改変ゼブラフィッシュモデルの網膜の組織学的解析

疾患動物モデル網膜の凍結切片を作成し、ロドプシンに対する免疫染色を実施した。

(4) 網膜電図による網膜の電気生理学的解析

疾患動物モデルの網膜電図を解析し、野生型と比較を行った。

(5) 遺伝子改変ゼブラフィッシュモデルの背地適応の評価

exosc2 ノックアウトゼブラフィッシュにおける背地適応の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子改変ゼブラフィッシュモデルの樹立と表現型の解析

exosc2 ノックアウトゼブラフィッシュは小眼球症 (図 2)、側弯、小頭症等のヒト EXOSC2 遺伝子変異と類似した表現型を示し、10 日前後で死亡した。

exosc2^{-/-} ゼブラフィッシュは小眼球症を呈する

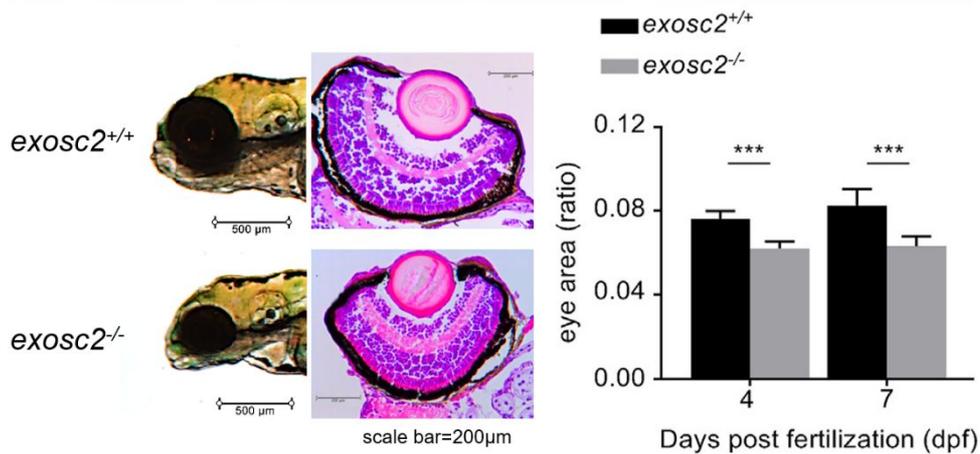


図 2: exosc2 ノックアウトゼブラフィッシュは小眼球症を呈する

(2) 遺伝子改変ゼブラフィッシュモデルの網膜の組織学的解析
疾患動物モデル網膜の凍結切片を作製し、ロドプシンに対する免疫染色を実施した。
exosc2 ノックアウトゼブラフィッシュの網膜ロドプシンは野生型と比較し、著明に減少しており、網膜変性が惹起されていることが示唆された。(図 3)

exosc2^{-/-} ゼブラフィッシュ網膜のロドプシンは減少する

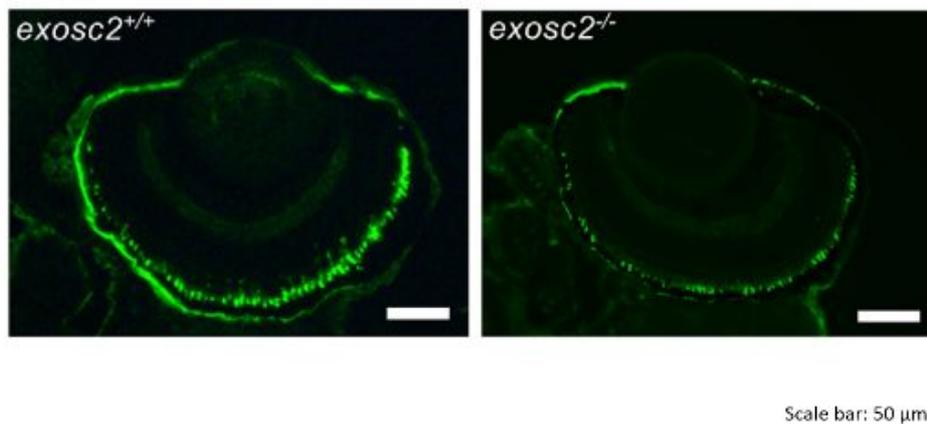


図 3: exosc2 ノックアウトゼブラフィッシュの網膜ロドプシンは減少する

(3) 遺伝子改変ゼブラフィッシュモデルの核酸メタボローム解析
exosc2 ノックアウトゼブラフィッシュの核酸メタボローム解析を行った。解析の結果、exosc2 ノックアウトゼブラフィッシュの生体内のヌクレオチドの減少が確認された(図 4)。この代謝バランスの異常は、RNA 代謝促進作用を持つラパマイシンにより改善(図 5)され、それに伴い exosc2 ノックアウトゼブラフィッシュの小頭症と網膜ロドプシンの発現(図 6)も部分的に改善された。(図 8.9)。この結果から、ヌクレオチド代謝バランスの異常が病態に関連することが示唆された。

exosc2^{-/-} ゼブラフィッシュは生体内のヌクレオチドが減少する

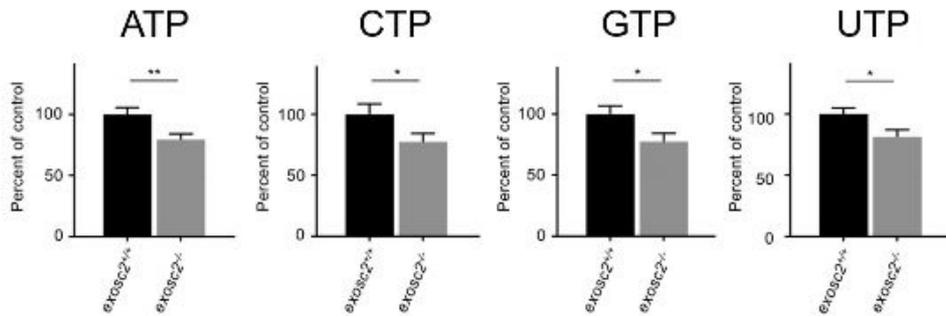


図 4: exosc2 ノックアウトゼブラフィッシュの生体内ヌクレオチドは減少する

ラパマイシンの投与によってexosc2^{-/-} ゼブラフィッシュ 生体内のヌクレオチドが増加する

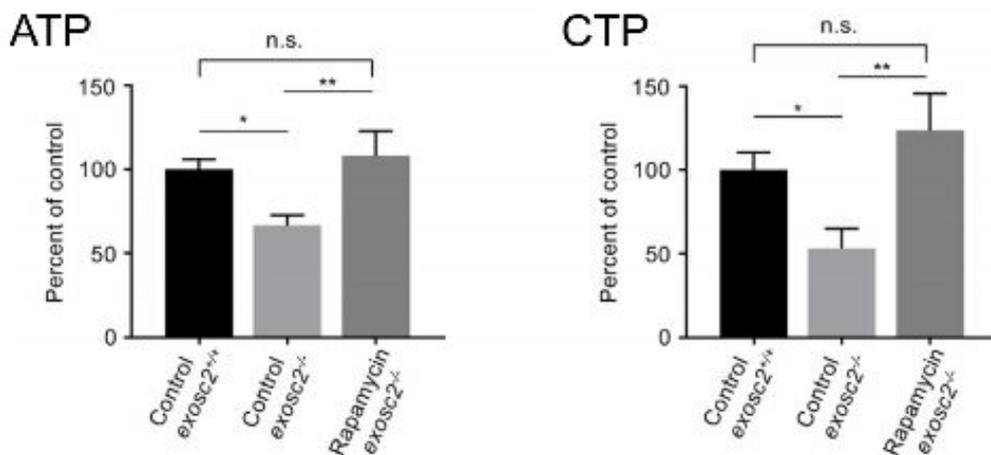


図 5: exosc2 ノックアウトゼブラフィッシュの生体内ヌクレオチドはラパマイシン投与により改善する

ラパマイシンの投与によってexosc2^{-/-} ゼブラフィッシュの網膜ロドプシンが増加する

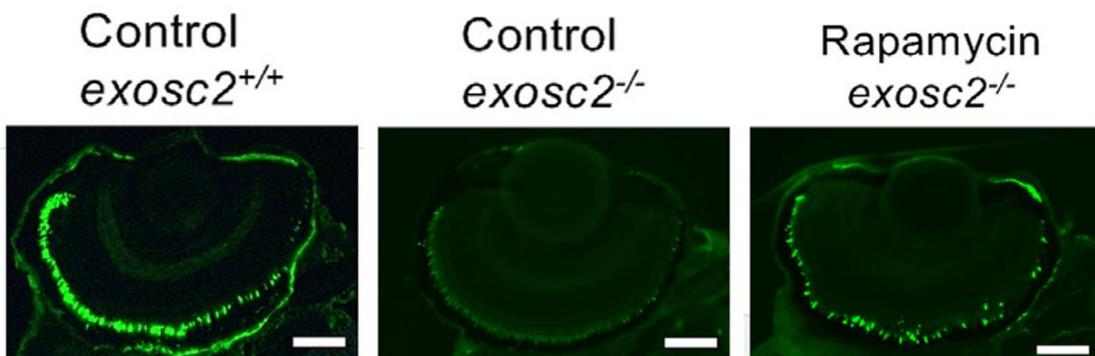


図 6: *exosc2* ノックアウトゼブラフィッシュの網膜ロドプシンは
パラマイシン投与により改善する

(4) 網膜電図による網膜の電気生理学的解析

疾患動物モデルの網膜電図を解析し、野生型と比較を行った。

解析の結果、*exosc2* ノックアウトゼブラフィッシュの網膜機能は野生型と比較し、低下していることが確認された(図 7)。この結果は RNA エキソソームが、網膜変性の原因となる可能性があることを示唆する可能性がある。

exosc2^{-/-} ゼブラフィッシュの網膜電図は減弱していた

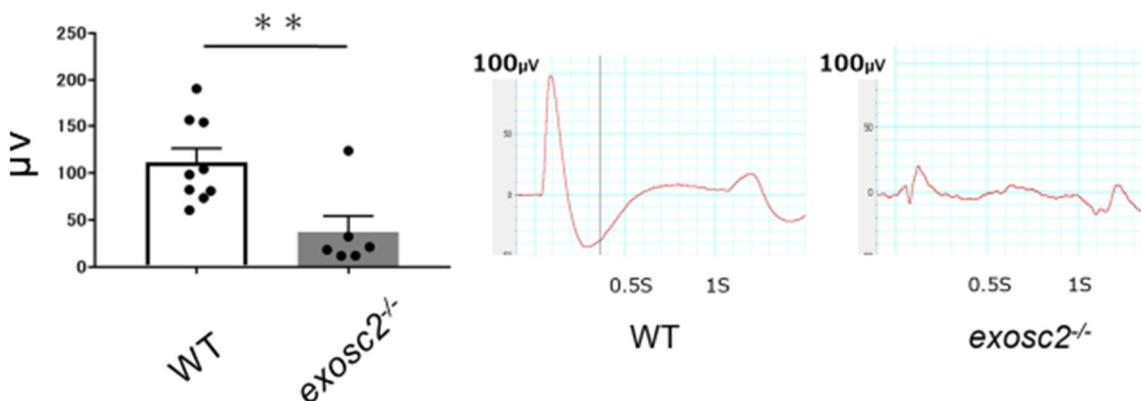


図 7: *exosc2* ノックアウトゼブラフィッシュの網膜電図は減弱が見られた

(5) 遺伝子改変ゼブラフィッシュモデルの背地適応の評価

exosc2 ノックアウトゼブラフィッシュ及び *exosc8* ノックアウトゼブラフィッシュにおける背地適応の解析を行った。背地適応は背景の明暗に合わせて自身も体色を変化させる反応であり、非視覚型オプシン発現ニューロンによって制御される。解析の結果、*exosc2* ノックアウトゼブラフィッシュ及び *exosc8* ノックアウトゼブラフィッシュは明順応を行っても、背地適応が減弱していることが確認され、非視覚型オプシン発現ニューロン機能は野生型と比較し、低下していることが示唆された。(図 8) この結果は RNA エキソソームが、網膜変性の原因となる可能性があることを示唆する結果である。

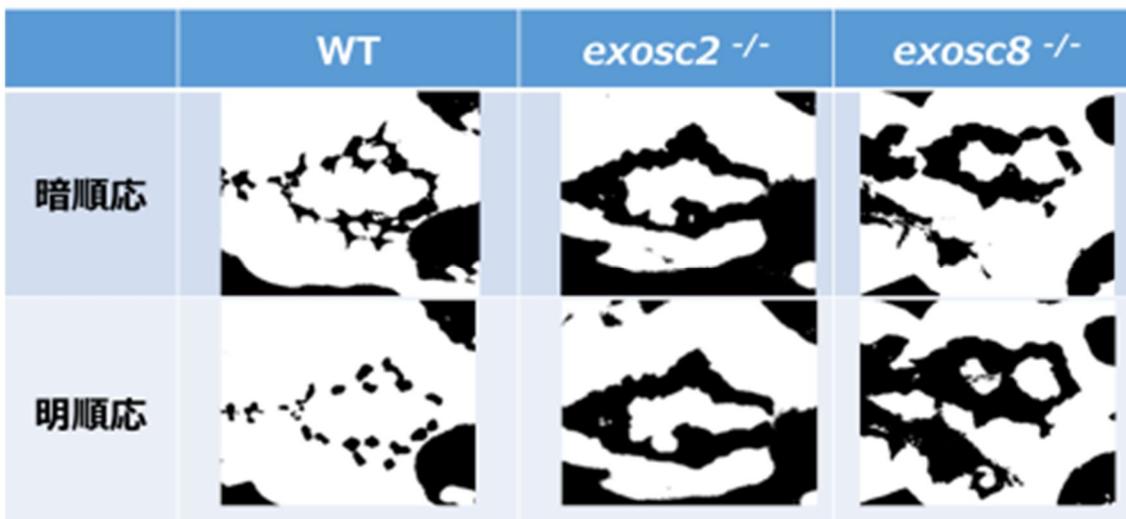


図 8: *exosc2* ノックアウトゼブラフィッシュと
exosc8 ノックアウトゼブラフィッシュの背地適応は減弱する

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yatsuka Hiroyuki, Hada Kazumasa, Shiraishi Hiroshi, Umeda Ryohei, Morisaki Ikuko, Urushibata Hirotaro, Shimizu Nobuyuki, Sebastian Wulan Apridita, Hikida Takatoshi, Ishitani Tohru, Hanada Reiko, Shimada Tatsuo, Kimoto Kenichi, Kubota Toshiaki, Hanada Toshikatsu	4. 巻 533
2. 論文標題 Exosc2 deficiency leads to developmental disorders by causing a nucleotide pool imbalance in zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1470 ~ 1476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.10.044	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八塚 洋之
2. 発表標題 RNA代謝異常による神経変性疾患モデル作製と発症機序の解明
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八塚 洋之
2. 発表標題 Molecular mechanism of RNA exosome related diseases of zebrafish disease model
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八塚 洋之
2. 発表標題 RNAエキソソーム関連神経変性疾患における網膜変性の病態メカニズムの解明
3. 学会等名 第61回日本網膜硝子体学会総会
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
---------	---------