

平成 30 年 9 月 26 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462708

研究課題名(和文) 網膜光障害モデルを用いた加齢黄斑変性機序追究：責任ゲノム領域の限定エキソーム解析

研究課題名(英文) Investigation of a new mechanism of age-related macular degeneration using a rat model of retinal photic injury: targeted exome analysis for a responsible genomic region

研究代表者

大石 健太郎 (Ohishi, Kentaro)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教

研究者番号：80345826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性(AMD)は日本人に急増している失明原因疾患である。本疾患の新規原因遺伝子を探索するために、ラット網膜光障害実験モデルでの障害感受性の系統差を遺伝学的・分子遺伝学的に追究してきた。戻し交配個体の表現型とゲノム型を解析して責任遺伝子領域を限局化し、次世代シーケンサーによる遺伝子多型の検索により、候補を1遺伝子に絞り込んだ。この遺伝子のヒト相同遺伝子のコモン多型について、AMDに関する症例対照研究を実施し、疾患との有意な関連を示す新規の多型を見出した。この遺伝子は、網膜関連疾患において報告がない遺伝子であるため、新たな網膜変性疾患の発症機序を検討する上で重要な遺伝子であると考えている。

研究成果の概要(英文)：PURPOSE: To identify genes for photic injury susceptibility of rat retina, eventually to elucidate an etiology for age-related macular degeneration (AMD). METHODS: A retinal degeneration size showing the susceptibility was evaluated on pathological specimens. A targeted exome analysis was performed with MiSeq system (illumina, Inc.). RESULTS: We performed the targeted exome analysis for 3.8-Mb Rpi1 region among resistant (LEW) and susceptible (WKY and F344) strains and found 3 loci with non-synonymous base changes in 2 genes. In parallel, obtained BC9 offspring had a 284-kb WKY genome region as a sole WKY component, and in which only 1 locus in 1 gene (tentatively gene R) was narrowed down. CONCLUSION: We consider that the gene R is Rpi1 itself. The gene R has never been reported as the susceptibility gene of AMD. We are now extensively making efforts to give more direct evidence for the gene R as the causal gene of rat retinal photic injury and possible relationship with AMD.

研究分野：医歯薬学

キーワード：網膜光障害 ラット 戻し交配 系統差 責任遺伝子 エキソーム解析 加齢黄斑変性

1. 研究開始当初の背景

加齢とともに発症率が増加する中途失明の原因疾患である加齢黄斑変性（AMD）は、我が国においても患者数が急増している。本疾患は視細胞や色素上皮細胞の変性・消失に伴う「地図状萎縮」を来す『萎縮型』と、黄斑部の脈絡膜新生血管の形成が起きる『滲出型』に分かれ、ともに視機能に重篤な障害を来す。

本疾患は、遺伝要因と環境要因の両方が関与する多因子疾患であり、眼科領域において患者数が多い失明関連疾患である。遺伝要因に関しては、幾つもの遺伝子（*ABCR*, *FBN5*, *CFH*, 他）が報告されているが、それらと AMD の発症機序との関係については未だ不明な点が多く、全ての AMD 患者の病態を説明できる訳ではない。

本疾患の環境要因のひとつに、『長年にわたる太陽光曝露』がある。ラットやマウスに蛍光灯照射をすると、視細胞と色素上皮細胞においてアポトーシスが起これ、萎縮型 AMD に類似した網膜変性を生じる（「網膜光障害実験モデル」）。この網膜光障害は、ラットやマウスの系統により、その重篤度が大きく異なる。すなわち、動物の遺伝的背景の違いにより、網膜光障害の起き易さ（感受性の程度）に違いがある。

これまで、我々は、AMD の新規原因遺伝子多型を追究するために、ラット網膜光障害の感受性の系統差を遺伝学的に解析することで、5 番染色体長腕テロメアを含む 4.6 Mb 領域にまで限局化を進めてきた。その領域を *Retinal Photic Injury susceptibility-1* から、“*Rpi1*”と命名し、更なる検討を実施した。

2. 研究の目的

本研究では、次世代シーケンサーによる領域限定エキソーム解析で、*Rpi1* 領域から網膜光障害感受性遺伝子候補を抽出し、その中から、網膜光障害感受性を支配する責任遺伝子および多型を決定することを目的とした。

また、そのヒト相同遺伝子に関して、AMD 患者と対照者でのコモン多型と AMD 発症との関連について調べた。

3. 研究の方法

3-1. *Rpi1* 領域の更なる限局化

3-1-1. 戻し交配

本研究期間における戻し交配（BC）は、戻し交配第 7 世代（BC₇）個体（Rat ID No. 1528）および BC₁₁ 個体（同 No. 1655）などを LEW

系統ラットと交配することで各ラインの継続的な BC を実施した。各個体は多型解析（3-1-2.参照）により、WKY|LEW ヘテロ個体を選出し、次の BC に用いた。

多型解析結果において、*Rpi1* 領域内で組換えが認められた場合は、BC により仔個体を作成し、仔個体での多型解析および表現型解析（3-2. 参照）を実施することで、組換え後の WKY 由来染色体領域内に責任多型が存在するか否かを検討した。

1 ラインについては、BC を終了した後は、兄妹交配によりコンジュニック系統を樹立し、維持している。

3-1-2. 多型解析 多型解析はマイクロサテライト解析により実施した。マイクロサテライト解析では、一部の多型マーカーについて、マルチプレックス PCR 法を採用した。PCR 産物長の比較解析のためのアガロースゲル電気泳動には、TBE で調製した 3.5%-MetaPhor™（Lonza）ゲルを使用し、低温での泳動を行った。

更に詳細な多型解析を実施するために、ダイレクトシーケンス法による一塩基多型（SNP）解析を実施した。

3-2. 表現型解析

3-2-1. 光照射実験 ラットは、朝 7 時から夜 7 時までが明環境である明暗サイクル下にて飼育した。全個体は 10 lux 以下の薄暗いケージ内で飼育した。光照射は 10 週齢以降に実施した。予め 29 時間の暗順応を行い、その後、夜 12 時より 3 時間、照度 3000 lux の白色蛍光灯の光を頭上より照射した。光照射終了後のラットは、通常の光環境下に戻した。

3-2-2. 網膜変性長解析 光照射終了後、数ヶ月経過した個体（その間に一部を BC に使用）は、エーテル過量吸入により無痛的に屠殺し、常法により、矢状断かつ乳頭部を含む眼球の凍結切片を作製した。そして、ヘマトキシリン-エオシン染色により眼病理標本作製した。これを用いて、外顆粒層（ONL）に明白な異常（ONL の消失）が認められた領域の網膜変性長と網膜全長を計測し、網膜全長における網膜変性長の割合を網膜変性インデックス（DI、 $0 \leq DI \leq 1$ ）として算出した。LEW 個体群の DI 値の $\mu+3\sigma$ にあたる 0.471 を感受性と耐性の閾値として設定した。

3-3. 領域限定エキソーム解析 SureSelect

Target Enrichment システム・カスタム・キット (Agilent 社) を用いて、4.6 Mb の Rpi1 領域の全エキソンと転写断片配列を対象とした cRNA プローブライブラリーをカスタムで設計した。

解析対象ゲノムは、LEW、WKY、F344 ゲノムとした。

領域限定エキソーム解析のためのサンプル調製は、オンビーズ PCR 法対応プロトコル (Ver. 1.5) に従って実施した。解析は MiSeq™ システム (illumina 社) を使用して行った。データは FASTQ 形式として出力され、各種解析ツールを用いて処理し、CLC Genomics Workbench (CLC bio Japan, Inc.) 等を用いて解析を行った。

3-4. 症例対照研究 聖隷浜松病院・眼科より、AMD 症例と非 AMD 患者 (対照者) の末梢血検体を収集した。本研究の趣旨を詳細に説明し、インフォームド・コンセントが得られた場合のみを対象とした。

ゲノム DNA の抽出および精製には、ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep Purification System (Promega 社) を使用し、そのゲノム DNA を対象としてダイレクトシーケンス法を実施した。解析対象領域を PCR 法により増幅し、ExoSAP-IT (Affimetrix 社) による PCR 産物の精製の後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher 社) を用いて蛍光標識し、キャピラリーシーケンサーにて DNA シーケンス解析を実施した。

出力データは、FinchTV による波形解析で得られた DNA シーケンス結果の確認および ATSQ (Genetyx 社) による配列間比較を実施することで、多型を調べた。解析結果は、Microsoft Excel 上で集計し、Excel 関数を用いて統計解析した。

4. 研究成果

4.6 Mb の Rpi1 領域について、より詳細な多型解析を実施することで、3.8 Mb にまで限局化できた。この領域に関して、LEW、WKY、F344 系統 (WKY と同じく感受性) ゲノムを対象に領域限定エキソーム解析を実施した。これにより、耐性 (LEW) と感受性 (WKY 及び F344) で異なる多型を絞り込んだところ、アミノ酸置換が起きる多型として、2 遺伝子 3 多型を検出した。

また、これと並行して実施していた BC により、Rpi1 領域を 284 kb にまで限局化できた個体が得られた。その個体の仔を作製し、各個体の多型解析を実施した。また、10 週齢に

なった時に表現型解析を実施し、各個体の網膜変性度 (DI) をゲノム型別に集計した。DI 値について、閾値 0.471 (3-2-2 参照) を用いて感受性・耐性に分け、比較解析を実施した。これにより、ゲノム型と表現型 (DI 値による網膜変性領域の程度) との間に有意な関連が認められた ($P=2.38 \times 10^{-5}$)。このことから、上記の 284 kb 領域内に原因遺伝子多型が存在することが強く示唆された。

この 284 kb の Rpi1 領域には、上記のエキソーム解析の結果として検出された 2 遺伝子 3 多型のうち、1 遺伝子 1 多型のみが存在していることが明らかとなった。その遺伝子多型については、別途、サンガー・シーケンス法により確認した。また、感受性を示す別の 2 系統についても同様に調べたところ、同じく感受性を示す WKY や F344 と同じ多型であった。このことから、この遺伝子が網膜外層の視細胞および色素上皮細胞の光により引き起こされる細胞死に関係していることが強く示唆された。

そこで、この遺伝子 ((仮称) gene R) が AMD の責任遺伝子である可能性について検討した。AMD 患者および対照者のゲノム DNA の遺伝子多型を調べた疾患発症との関連について解析した結果、疾患発症との有意な関連を示す新規の多型を見出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 13 件)

- ① Kentaro Ohishi, Masafumi Ohtsubo, Katsuhiko Hosono, Akira Obana, Yoshihiro Hotta, Tadahisa Hiramitsu, Shinsei Minoshima: Forward Genetic Approach for Causal Gene Identification for Rat Retinal Photic Injury. ARVO 2017 Annual Meeting (Baltimore, 2017.5.7-11)
- ② 大石健太郎, 大坪正史, 尾花明, 堀田喜裕, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害の感受性を支配する責任遺伝子の同定. 第 121 回日本眼科学会総会 (東京, 2017.4.6-9)
- ③ 大石健太郎, 大坪正史, 細野克博, 尾花明, 堀田喜裕, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害感受性を支配する遺伝子多型の探索. 第 39 回日本分子生物学会総会 (横浜, 2016.11.30-12.2)
- ④ 大石健太郎, 大坪正史, 細野克博, 尾花明, 堀田喜裕, 平光忠久, 蓑島伸生: ラ

ット網膜光障害の感受性遺伝子領域の領域限定エキソーム解析. 第120回日本眼科学会総会(仙台, 2016.4.7-10)

- ⑤ 大石健太郎, 細野克博, 尾花明, 堀田喜裕, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害感受性の責任遺伝子(Rp1)領域の限局化. BMB2015(第38回日本分子生物学会、第88回日本生化学会合同大会)(神戸, 2015.12.1-4)
- ⑥ 大石健太郎, 細野克博, 尾花明, 堀田喜裕, 平光忠久, 蓑島伸生: 加齢黄斑変性と網膜光障害の関連遺伝子の追究: 易罹患性診断への応用を目指して. 第22回日本遺伝子診療学会(横浜, 2015.7.17-19)
- ⑦ 大石健太郎, 細野克博, 尾花明, 堀田喜裕, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害の感受性を支配する責任遺伝子の追究. 第37回日本分子生物学年会(横浜, 2014.11.25-28)
- ⑧ 大石健太郎, 細野克博, 尾花明, 堀田喜裕, 平光忠久, 蓑島伸生: 加齢黄斑変性と網膜光障害の関連遺伝子探索. COI 2014年度夏の研究会(岡崎, 2014.9.4-5)
- ⑨ 大石健太郎, 細野克博, 尾花明, 堀田喜裕, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害感受性を支配する責任遺伝子領域の限局化. 第118回日本眼科学会(東京, 2014.4.2-6)
- ⑩ 大石健太郎, 細野克博, 尾花明, 堀田喜裕, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害感受性の責任遺伝子領域の限局化: 加齢黄斑変性の易罹患性の遺伝子診断に向けて. 第20回日本遺伝子診療学会(浜松, 2013.7.19-20)
- ⑪ 大石健太郎, 細野克博, 尾花明, 堀田喜裕, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害の感受性に関与する遺伝子の追究. 第35回日本光医学・光生物学会(浜松, 2013.7.12-13)
- ⑫ Kentaro Ohishi: Mapping Susceptibility Loci to Rat Retinal Photoc Injury. 1st International Symposium on Blue Light Society (1stICBLS)(Tokyo, 2013.6.6-8)
- ⑬ 大石健太郎, 細野克博, 尾花明, 堀田喜裕, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害感受性の責任遺伝子領域 Rp1 の更なる限局化. 第117回日本眼科学会(東京, 2013.4.4-7)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 加齢黄斑変性の発症リスクの評価方法
発明者: 大石健太郎
権利者: 国立大学法人浜松医科大学
種類: 特許
番号: 特許願 2017-046540 号
出願年月日: 平成 29 年 3 月 10 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石健太郎 (OHISHI, Kentaro)
浜松医科大学・
光先端医学教育研究センター・助教
研究者番号: 80345826

(2) 研究分担者

大坪正史 (OHTUBO, Masafumi)
浜松医科大学・
光先端医学教育研究センター・助教
研究者番号: 10327653

尾花明 (OBANA, Akira)
浜松医科大学・
光先端医学教育研究センター・客員教授
研究者番号: 40194625

堀田喜裕 (HOTTA, Yoshihiro)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90173608

蓑島伸生 (MINOSHIMA, Shinsei)
浜松医科大学・
光先端医学教育研究センター・教授
研究者番号: 90181966