

令和元年6月19日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07098

研究課題名(和文) 多種疾患に關与するPhldb1ゲノム多型を標的とした新規モデルマウスの開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of mouse model of Phldb1 mutation associated with multiple diseases

研究代表者

和田 健太 (WADA, Kenta)

東京農業大学・生物産業学部・准教授

研究者番号：20508113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： rlc2マウスは、Phldb1の1塩基挿入変異により水晶体核の脱臼と白内障を引き起こす。本研究は第一に、rlc2マウスの白内障が水晶体核の脱臼を原因とすることを明らかにした。次に、rlc2の水晶体カプセルにおいて、PHLDB1タンパク質は欠失することを見出した。この結果は、rlc2マウスのPHLDB1タンパク質の欠失が水晶体カプセルの崩壊の原因であることを強く示唆した。加えて、RNA-seq解析の結果、それぞれの週齢においてrlc2マウスは一貫性のない遺伝子発現プロファイルを示した。本研究成果は多種疾患に關与し、そのin vivoにおける機能が明らかでないPHLDB1の新たな洞察を提供した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヒト疾患との關連性が示唆されているものの、その生体内(in vivo)における機能が明らかになっていないPHLDB1が、水晶体カプセルの維持に機能することをモデル動物の解析に基づいて明らかにした初めての研究である。このことは、本研究の成果と、rlc2マウスがPHLDB1のin vivoにおける機能について、新たな知見を提供することを示している。

研究成果の概要(英文)：The rlc2 mouse spontaneously exhibits lens opacity with luxation of lens nuclei, which is caused by a 1-bp insertion on the Phldb1 gene. At 2 months of age, disruption of posterior lens capsule was found in transparent lens of rlc2 mouse. Therefore, we concluded that lens opacity was caused by luxation of lens nuclei. In wild-type, PHLDB1 protein detected on anterior lens capsule of embryonic day 15.5 and postnatal day 1, and that extended to posterior capsule at postnatal day 5. The expression of PHLDB1 could not be observed in rlc2 lens capsule. Therefore, we suggested that rupture of lens capsule of rlc2 mouse was caused by a large reduction of PHLDB1 protein on lens capsule. Transcriptome analysis detected many differentially expressed genes between wild-type and rlc2 lenses. We speculated that these differentially expressed genes caused by reduction of PHLDB1 protein have roles for maintenance of lens capsule. Our results would provide new insight of PHLDB1 function on the lens.

研究分野：実験動物学

キーワード：白内障 水晶体脱臼 PHLDB1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで、PHLDB1 は微小管のアンカータンパク質として機能することが *in vitro* の解析によって明らかにされており、脂肪細胞の分化に関与することが報告されている。さらに興味深いことに、ヒトの悪性脳腫瘍のうち 80% 程度の頻度で見られる神経膠腫(グリオーマ)発症と、PHLDB1 の 5'非翻訳領域に存在する SNP との間には、数多くの全ゲノム関連解析 (GWAS) によって高い関連が認められている。また、PHLDB1 の第 3 イントロンに存在する SNP (rs11603023) は自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) あるいは高コレステロール血症との高い関連も認められている。しかし、PHLDB1 に関する報告は *in vitro* の解析による細胞生物学的研究と、ヒト GWAS による危険遺伝因子の検出にとどまっている。そのため、PHLDB1 の変異と疾患発症との関連性を明らかにするためには、それらの間隙を埋める疾患モデル動物の存在と、それらを用いた *in vivo* における解析が必要である。我々は Rupture of Lens Cataract 2 (*rlc2*) の白内障が *Phldb1* の 1 塩基挿入変異によって引き起こされることを明らかにした。そこで我々は、*rlc2* マウスを用いた *in vivo* 解析は、*Phldb1* の突然変異と疾患発症との関連について重要な知見が得られることと期待した。

2. 研究の目的

本研究は、我々が同定した *rlc2* マウスの *Phldb1* の一塩基挿入変異と、水晶体脱臼との関連を解明することを最初の目標として立案した。さらに、PHLDB1 の多型がグリオーマを含む多様なヒト疾患のリスクとなることも推定されることから、*rlc2* マウス特徴的表現型が認められる眼球のみならず、脳組織の表現型を把握し、*rlc2* マウスのヒトグリオーマモデルとしての有用性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *rlc2* マウスにおける水晶体および脳組織の表現型解析

眼球表現型は、生後 2 ヶ月齢および 3 ヶ月齢の個体において、暗視野実体顕微鏡下で観察した。摘出された眼球および脳組織はそれぞれスーパーフィックスおよび 4% PFA により固定し、パラフィン包埋組織切片のヘマトキシレン・エオシン染色による病理組織学的解析を行った。また、脳組織においては抗 GFAP 抗体を用いた免疫組織染色を行った。

(2) 水晶体における *Phldb1*/PHLDB1 の発現解析

Phldb1 の mRNA における発現は、生後 3 週齢の野生型および *rlc2* マウスの眼球において qRT-PCR により評価した。PHLDB1 タンパク質の水晶体における局在は抗 PHLDB1 抗体を用いた免疫組織染色により調査した。加えて、水晶体のマーカータンパク質 (Integrin $\alpha 6$ 、F-actin、Collagen Type IV、E-cadherin、N-cadherin、Laminin、MIP および SPARC) はそれぞれの特異抗体を用いた免疫組織染色により行った。

(3) トランスクリプトーム解析

トータル RNA は、生後 1 週齢、3 週齢および 6 週齢の野生型および *rlc2* マウス、それぞれ 3 個体から摘出した眼球組織から抽出した。RNA-seq は HiSeq2500 を用いて行った。

4. 研究成果

(1) *rlc2* マウスの表現型解析

2 か月齢における *rlc2* の水晶体を実体顕微鏡下で観察した結果、野生型と同様の透明性を示したものの、その後嚢部からは脱臼過程の水晶体核がみられた (図 1)。3 か月齢では、*rlc2* の

水晶体は水晶体核の脱臼を伴う混濁を示した。また、1 か月齢の *rlc2* における病理組織像は野生型と同様であった（図 2）。2 か月齢では *rlc2* の水晶体に変性は認められなかったものの、その後嚢部には崩壊が観察された。これらの結果は *rlc2* マウスの眼球表現型が水晶体混濁を原因として水晶体核が脱臼するのではなく、水晶体核の脱臼を原因として水晶体混濁を引き起こすことを強く示唆した。

また、生後 25 日齢の *rlc2* マウスにおける脳組織の病理組織切片を作製し、野生型と比較した結果、それらの間に顕著な差異は認められなかった。GFAP の免疫組織染色においても、野生型と *rlc2* との間に差異は認められなかった。以上の結果から、すくなくとも生後 25 日齢の *rlc2* マウスの脳組織にはグリオーマなどの病変は生じていないことが示唆された。

(2) 水晶体における *Phldb1*/PHLDB1 の発現

眼球組織における PHLDB1 の機能についての報告はない。そこで野生型と *rlc2* の水晶体における *Phldb1* の発現量を比較した。その結果、野生型に比べて *rlc2* の mRNA は減少傾向にあるものの、有意な差異は認められなかった（図 3A）。次いで、抗 PHLDB1 抗体を用いた水晶体の免疫組織染色を行った結果、野生型の PHLDB1 は胎齢 15.5 日および生後 1 日齢において、水晶体前眼部のカプセルに局在が認められ、それは生後 5 日齢には後嚢部のカプセルまで拡大した（図 3B）。一方、胎齢 15.5 日、生後 1 日および 5 日における *rlc2* マウスの水晶体カプセルに PHLDB1 を示すシグナルは検出されなかった。また、ウェスタンブロット解析においても *rlc2* の PHLDB1 は検出することが困難なほど顕著な発現量の減少を示した。

(3) *rlc2* マウスにおける水晶体マーカータンパク質の免疫組織染色

PHLDB1 の顕著な減少が水晶体に及ぼす影響を評価するために、PHLDB1 と関連することが推測された Integrin $\alpha 6$ および F-actin、水晶体カプセルに局在する Collagen Type IV および Laminin、水晶体上皮に局在する E-cadherin および SPARC、水晶体線維マーカーとして N-cadherin および MIP について、それぞれの特異抗体を用いた免疫組織染色を行った。その結果、唯一、SPARC の局在において野生型と *rlc2* との間で差異が認められた。野生型では、SPARC

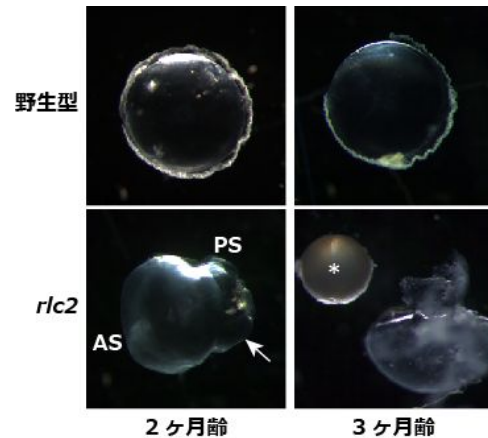


図 1. *rlc2* マウスにおける水晶体の表現型。矢印は脱臼過程の水晶体核、アスタリスクは脱臼した水晶体核を示した。AS: 前嚢; PS: 後嚢。

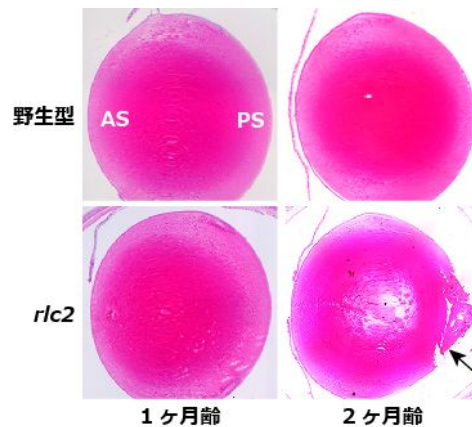


図 2. *rlc2* マウスにおける水晶体の病理組織像。矢印は崩壊した水晶体カプセルを示した。AS: 前嚢; PS: 後嚢。

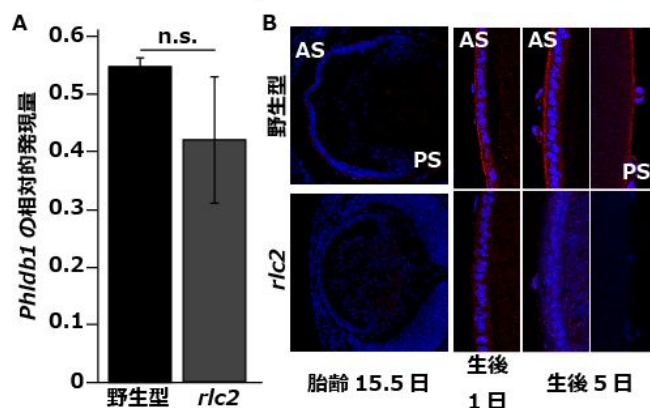


図 3. *rlc2* マウスの水晶体における *Phldb1*/PHLDB1 の発現。AS: 前嚢; PS: 後嚢。

は水晶体上皮の細胞質に強く発現し、水晶体後嚢においては分散して局在した(図4)。*rlc2* マウスにおいて SPARC は野生型と同様に水晶体上皮に強く検出されたものの、後嚢部においては野生型と異なり、凝集した局在パターンを示した。

このことは、水晶体後嚢のカプセルにおける PHLDB1 の欠失が SPARC の異局在を引き起こしたことを示唆している。SPARC の KO マウスは水晶体核の脱臼を引き起こすことが報告されていることから、PHLDB1 と SPARC は水晶体カプセルの維持において相互作用することが予測された。

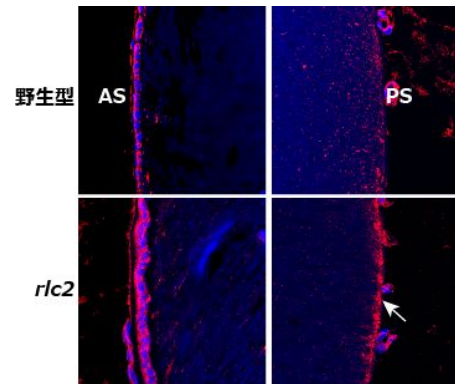


図4. *rlc2* マウスの水晶体における SPARC の局在異常。矢印は水晶体後嚢のカプセルに凝集した SPARC を示す。AS: 前嚢; PS: 後嚢。

(4) *rlc2* マウスの眼球におけるトランスクリプトーム解析

水晶体における PHLDB1 の欠失は SPARC の局在に影響することが示唆されたものの、それが水晶体カプセルの崩壊と、水晶体核の脱臼を引き起こすメカニズムは不明のままである。そこで、PHLDB1 の欠失が引き起こす眼球のトランスクリプトームの変化を把握し、*rlc2* の表現型に關与する分子をスクリーニングするために、RNA-seq 解析を行った。その結果、1 週齢、3 週齢および 6 週齢の *rlc2* マウスにおいて、それぞれ多数の遺伝子発現変動が検出された。1 週齢では *Calm4*、*Krt79*、*Crc1*、*Krt1* および *Dmkn* が、3 週齢では *Ucp1*、*AC123069.1*、*Atrn1*、*Aqp7* および *Mybph* が、6 週齢では *Tecta*、*Dynap*、*Adh6a*、*Csn3* および *Mmp13* に顕著な発現量の減少を示した(図5)。さらに、それぞれの週齢において発現変動した遺伝子は、ほとんど異なる Gene Ontology term に有意な関連を示した。このことは、PHLDB1 がステージ特異的な複数の機能を有することを推測させる。一方、1 週から 6 週齢まで共通して発現量の減少が認められた 5 種の遺伝子が検出された。RNA-seq によって検出された発現変動遺伝子の眼球における機能に関する報告はなく、これらは PHLDB1 と共役して水晶体カプセルの維持に關連する新たな遺伝子であることが期待された。

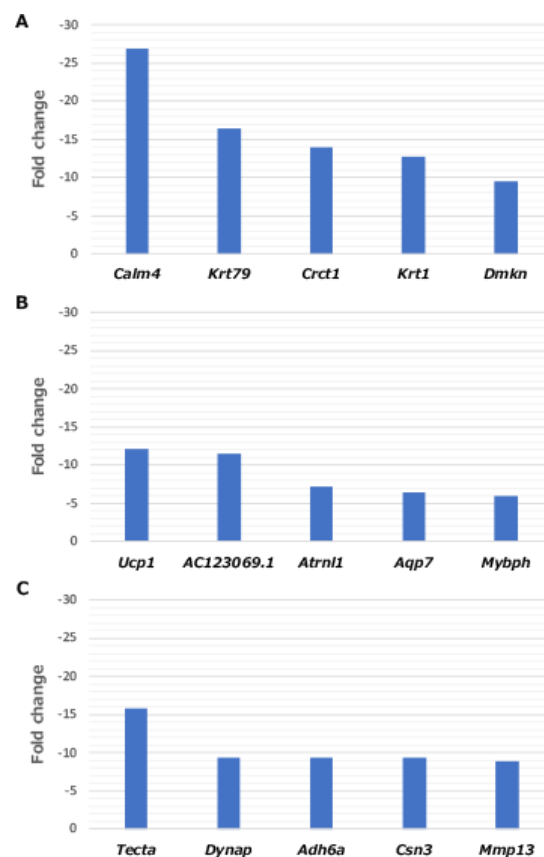


図5. RNA-seqにより検出された $rlc2$ マウス眼球の発現低下遺伝子 A. 1週齢; B. 3週齢; C. 6週齢

5. 主な発表論文等〔雑誌論文〕(計1件)

Wada K, Yasuda SP, Kikkawa Y. 2019. Genetic modifiers of rodent animal models: the role in cataractogenesis. *Experimental Animals*. May 20. doi: 10.1538/expanim.19-0020. [Epub ahead of print]. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

吉川欣亮・和田健太・渡部 桂・松島芳文・設楽浩志・清末優子. 水晶体脱臼白内障モデルマウスの発症原因となる *Phldb1* の1塩基挿入変異. 第57回日本白内障学会総会・第44回水晶体研究会 2018年07月.

〔その他〕

ホームページ等

https://www.nodai.ac.jp/academics/bio/o_biop/lab/1803/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：松岡 邦枝

ローマ字氏名：(MATSUOKA, Kunie)

所属研究機関名：公益財団法人東京都医学総合研究所

部局名：ゲノム医科学研究分野

職名：主席研究員

研究者番号(8桁)：40291158

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：吉川 欣亮

ローマ字氏名：(KIKKAWA, Yoshiaki)

※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、研究者個人に帰属されます。