

平成21年 4月28日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2005～2008  
 課題番号：17390467  
 研究課題名（和文） 癌関連網膜症に関する網膜特異抗原遺伝子の生理機能に関する網羅的分子解析  
 研究課題名（英文） Molecular analysis of a retinal autoantigen recognized by a serum of cancer-associated retinopathy patient.  
 研究代表者  
 菊池 孝信（KIKUCHI TAKANOBU）  
 信州大学・ヒト環境科学研究支援センター・教授  
 研究者番号：5017797

研究成果の概要：癌関連網膜症の患者血清が認識する網膜特異抗原として単離された PTBLP 遺伝子を中心として神経細胞特異的 RNA 結合タンパク遺伝子が網膜神経細胞の発生分化過程においてどのような役割を担っているのかを解明するために、PTBLP 遺伝子を欠失したマウスを用いて以下の研究を実施した。PTBLP (-/-) マウスは誕生後 24 時間以内に死亡するため、PTBLP(+/-)マウス同士を交配させ、E16~18 の胎仔を用い網膜器官培養を行い、網膜の発生分化が (-/-) では同腹の (+/+) や (+/-) に比べ未熟であることから、PTBLP 遺伝子が網膜の発生分化に関与していることが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	4,800,000	0	4,800,000
2006年度	3,800,000	0	3,800,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
総計	15,300,000	2,010,000	17,310,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：癌関連網膜症，自己免疫疾患，遺伝子改変マウス，RNA 結合タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに癌関連網膜症 (CAR) の患者血清が認識する網膜特異抗原遺伝子を単離・同定してきた (Kikuchi et al., J. Neuroimmunol., 2000, 103, 26-33; J. Biochem., 2000, 128, 811-821)。そのひとつとして単離された新規遺伝子 PTB-like protein (PTBLP) はアミノ酸配列の相同性から RNA スプライシングやタンパク翻訳過程の制御因子として知られる Polypyrimidine-tract binding protein (PTB) の新しいファミリー遺伝子と考えら

れた。PTBLP 遺伝子の発現は網膜、脳および生殖臓器に局限していた。また、PTBLP タンパクは網膜においては神経節細胞層の大部分および内顆粒層の一部の細胞の核に局在していた。ここで大変興味深いことに、PTBLP 遺伝子は中枢神経系の障害を惹起する種々の自己免疫性神経症の抗原遺伝子として良く知られている Hu 抗原や La 抗原と同様の RNA 認識ドメイン構造 (RRM 配列) を有し、しかも CAR 患者血清は PTBLP の RRM 配列の特定の部位を認識していた (Tateiwa et al., J. Neuroimmunol., 2001, 120, 161-169)。神

経培養細胞 PC12 の神経成長因子 (NGF) による神経分化誘導系を用いた解析から、PTBLP 遺伝子の過剰発現は分化誘導系を抑制し、PTBLP 遺伝子のスプライシング変異体である PTBLP-S (short form) との共発現では PTBLP が細胞質に移行して分化誘導を抑制しないことを明らかにした (Ichikawa et al., J. Biochem., 2002, 131, 861-868)。これらの結果から、PTBLP 遺伝子が神経分化過程においてどのような機能に関係しているのかは不明であるが、重要な役割を担っていることが推察された。また、同時に分化過程において PTBLP と共役する因子が存在することも推測された。

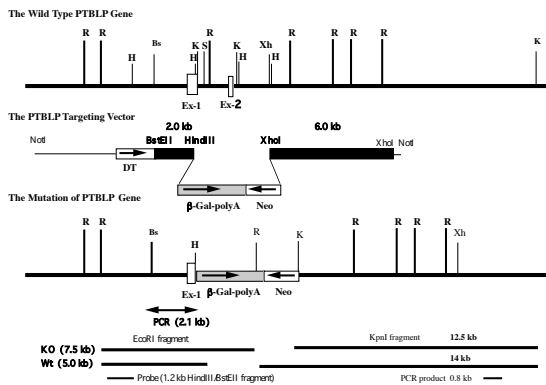
## 2. 研究の目的

本研究計画の目的は、PTBLP 遺伝子を中心にしてその他の神経細胞特異的 RNA 結合タンパク遺伝子が網膜神経細胞の発生分化過程における役割を細胞生物学、免疫組織化学、電気生理学および分子生物学などの最新の手法を用いて解析し、網膜神経細胞の発生および神経回路網の構築・維持に関する分子機構を網羅的に解明することにある。

## 3. 研究の方法

### (1) PTBLP 遺伝子欠失マウスの作製

PTBLP 遺伝子の genomic DNA は 129SV マウスの P1 フェージライブラリーから単離した。この DNA から PTBLP 遺伝子の第 1 エクソンの非翻訳領域を含む 5' 上流 2.0 kb (BstEII/HindIII) 断片および第 2 イントロンの 6.0 kb (XhoI/Sau3A1) 断片を targeting vector pKO-NTKV-1902 に図 1 に示すように挿入した。



**Fig. 1. Disruption of the mouse PTBLP locus by gene targeting.**

(Top) Genomic structure of a portion of the PTBLP locus. (Middle) Targeting vector. (Bottom) Targeted locus. Bs, BstEII; H, HindIII; K, KpnI; R, EcoRI; S, SalI; Xh, XhoI.

直鎖状にした targeting DNA をマウス ES

細胞 107 R1 にエレクトロポレーション法により導入し、G418 存在下で培養し、導入 DNA の NEO 耐性遺伝子が発現し、かつジフテリア毒素 A 遺伝子が発現していないクローンを選択する。得られたクローンについて PCR 法および図 1 に示した 2 種類のプローブ DNA による Southern 法を用いて相同組換えを起こしたクローンを選択する。正確に相同組換えを起こした細胞を用いてキメラマウス、さらに PTBLP ノックアウトマウス (KO マウス) の作製を行った。

### (2) DNA マイクロアレイ分析

得られた PTBLP (+/-) マウス同士を交配したところ、PTBLP (-/-) マウスは誕生後 2-4 時間以内にすべて死亡した。呼吸不全によると思われる。そこで、PTBLP (+/-) 妊娠マウスから E18 の胎仔を摘出し、網膜から RNA を抽出した。この RNA を用いて DNA マイクロアレイ分析を行った。DNA マイクロアレイは Affymetrix 社 Mouse Genome 430 2.0 Array を使用した。

### (3) マウス胎仔網膜の器官培養

PTBLP (+/-) 妊娠マウスから E16-E18 の胎仔を摘出し、眼球を摘出し、網膜の器官培養を行った。器官培養は島山らの方法により行った (Hatakeyama J, Kageyama R., Methods, 28, 387-395, 2002)。摘出した胎仔眼球を 20  $\mu$ l の PBS を乗せた Millicell-CM chamber (0.4  $\mu$ m pore, 30 mm $\phi$ ) に置き、実態顕微鏡下で角膜および強膜を取り除き、注意深く水晶体と虹彩・毛様体を網膜から除去する。網膜は神経節細胞層が上になるように Millicell の膜上に広げる。1 ml の培養液を入れた 6-well 培養 plate に Millicell insert を置き、5% CO<sub>2</sub> で 34°C の培養器に入れ、2 日毎に培養液を交換し、3 週間培養する。培養液の組成は 50% MEM, 25% Hanks 緩衝液, 25% ウマ血清, 5.75 mg/ml グルコース, 0.2 mM グルタミン酸塩, 25 U/ml Penicillin, 25  $\mu$ g/ml Streptomycin である。各胎仔の遺伝型は胎仔尾から抽出した DNA を用いて PCR 法により分析した。

### (4) 器官培養網膜の形態学的検討

器官培養した網膜は経時的 (培養 10 日、15 日、20 日) に採取し、PBS で洗浄後、亜鉛固定液 (0.5% ZnCl<sub>2</sub>, 17.16mM Zn(TFA)<sub>2</sub>, 0.05% Ca(AcO)<sub>2</sub>, 0.1M Tris-HCl pH 7.4)、4°C 一晚放置にて固定する。パラフィン包埋した後、厚み 5  $\mu$ m の切片を調整する。ヘマトキシリン/エオシン染色し、光学顕微鏡にて形態学的観察を行った。また、電子顕微鏡による観察のために、培養網膜は 2.5% グルトアルデヒドを含む 100mM リン酸緩衝液にて固定し、エポン包埋して超薄切試料を調整した。

#### (5) 酵母 Two-Hybrid 法

PTBLP とタンパク相互作用する因子の検索を行うため、酵母 Two-Hybrid 法による検討を行った。完全長の PTBLP マウス cDNA を Two-Hybrid 用クローニングベクター pGBKT7 に GAL4 の DNA 結合ドメインとの融合タンパクとなるように挿入する。一方、生後 10 日目までのマウス網膜から抽出した RNA から cDNA を合成し、もう一つの Two-Hybrid 用クローニングベクター pGADT7 の GAL4 活性化ドメイン (AD) の上流に挿入し、GAL4 AD 融合タンパク cDNA ライブラリーを作製する。これらのプラスミド DNA を酵母 (AH109) に co-transfection する。選択培地で培養し、生存するコロニーについて、さらに厳しい選択培地で培養する。得られたクローンから DNA を抽出し、PCR 法により pGADT7 ベクターに挿入された cDNA 断片を増幅する。PCR 産物はアガロース電気泳動にて単離・精製し、その塩基配列を決定し、データベースで検索して同定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PTBLP 遺伝子欠失マウスの作製

相同組み換えを起こした ES クローンを用いてキメラマウスを作製した。10 匹のキメラマウスのうち 1 匹から生まれたマウスに変異遺伝子が移行していた。このマウスを C57BL/6 と 8 世代以上交配させた。得られた PTBLP (+/-) マウス同士の交配により PTBLP (-/-) マウスの作製を試みたが、すべて生後 24 時間以内に PTBLP (-/-) のマウスだけが死亡していた。呼吸不全により死亡したと考えられる。E18 の胎仔を検索したところ、PTBLP (-/-) の胎仔も生きており、その網膜を組織形態学的に比較したところ、同腹の PTBLP (+/+) や (+/-) の網膜と大きな違いは見られなかった。

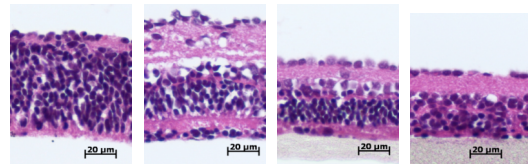
(2) PTBLP 遺伝子の欠失に伴う網膜細胞の分化に及ぼす影響について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。PTBLP (+/+) および (-/-) の E18 胎仔網膜における遺伝子発現の変動をマウスの 4 万個以上の遺伝子に関するプローブを搭載した DNA マイクロアレイを用いて比較した。68 個の遺伝子が野生型に比べ発現が減少していた。また、増加した遺伝子は 30 個であった。減少した 68 個の遺伝子の中で特に細胞の発生・分化に関連することが知られている遺伝子や遺伝性疾患に関連する遺伝子等の 12 個の遺伝子について、定量 PCR や in situ hybridization 法等を行い、PTBLP 遺伝子欠損が網膜の発生・分化に与える影響について解析している。特に、内耳の神経細胞で発現し、遺伝性の疾患と関連する遺伝子が PTBLP (-/-) マウスの網膜で 1.8 倍減少しており、この遺伝子の網膜

における発現部位および生理機能について分析を行っている。

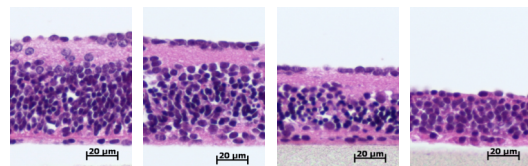
##### (3) PTBLP KO マウス胎仔網膜の器官培養系を用いた発生分化過程の解析

E16-18 のマウス胎仔眼から網膜を摘出し、セルロース膜上に注意深く広げ 21 日間培養した。培養 10 日で網膜 3 層構造が形成され、各種網膜細胞特異マーカータンパクの発現について免疫染色法を用いて確認した。次に、PTBLP KO マウスの PTBLP (+/-) 同士を交配させ、その胎仔網膜を用いて器官培養実験を行った。同腹の PTBLP (+/+) および (+/-) と PTBLP (-/-) で網膜の分化過程を形態学的に観察した。培養 5 日ではいずれの遺伝型に大きな違いは見られなかった。培養 10 日では、PTBLP (+/+) および (+/-) では網膜 3 層構造が明確に形成されていたが、PTBLP (-/-) では外網状層が不明確であった。培養 21 日まで培養を継続したが、PTBLP (-/-) では外顆粒層と内顆粒層の分離が明確にならなかった。PTBLP (-/-) の網膜の厚みは他の網膜に比べ 20% ほど薄くなっていた。また、神経節細胞層の細胞数が減少していた。また、電子顕微鏡で観察したところ視細胞外節の形成が PTBLP (-/-) の網膜では脆弱であった。

##### (A) PTBLP (+/+)



##### (B) PTBLP (-/-)



5d 10d 15d 21d

Fig. 2. Histologic images during the time course of retinal explant cultures from (A) PTBLP (+/+) and (B) PTBLP (-/-) E18 embryo. Scale bar, 20  $\mu$ m.

##### (4) PTBLP と相互作用する RNA および DNA 結合タンパクの検索

酵母 Two-Hybrid 法を用いた検索により、PTBLP とタンパク相互作用する RNA および DNA 結合タンパク質の検索を行い、3 個の RNA 結合タンパクと 16 個の DNA 結合タンパク質を見いだした。これらのタンパクについて網

膜での発現部位およびPTBLPとの相互作用部位等の詳細な検討を行っている。

以上の結果から、癌関連網膜症患者血清が認識する自己抗原として単離・同定された神経細胞特異的RNA結合タンパク質であるPTBLP遺伝子は、網膜の発生分化過程において重要な役割を担っていることが明らかとなった。本研究で作製したPTBLP遺伝子欠失マウスは、今後さらに胎仔網膜や脳から継体培養が可能な神経幹細胞や神経前駆細胞を取り出すことにより、神経分化過程等の分子機構をより詳細に解明するための材料として有効に活用されることが期待される。また、DNAマイクロアレイ解析や酵母Two-Hybrid分析により明らかとなったPTBLPの生理機能と関連すると思われる遺伝子について、さらに分子解析を行い神経分化過程の分子機構を解明していく予定である。

#### 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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Ohta K, Sano K, Hirano T, Sugimoto T, Kikuchi T. B cell monoclonality of intraocular lymphoma and breast lymphoma. Br J Ophthalmol., 92(2), 296-297, 2008, 査読有。
- (2) Ohta K, Sano K, Suzuki T, Hidaka E, Yoshida A, Kikuchi T. B cell clonality of primary central nervous system and primary intraocular lymphomas. Jpn J Ophthalmol., 51(2), 147-149, 2007, 査読有。
- (3) Arai J, Katai N, Kuida K, Kikuchi T, Yoshimura N. Decreased retinal neuronal cell death in caspase-1 knockout mice. Jpn J Ophthalmol., 50(5), 417-425, 2006, 査読有。

[学会発表] (計 1 件)

- (1) Imai H, Ohta K, Suzuki S, Kikuchi T. A role of  $\mu$ -crystallin in endotoxin-induced uveitis. ARVO Annual Meeting 2007, 2007.5.8, Fort Lauderdale, Florida, USA.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

菊池 孝信 (KIKUCHI TAKANOBU)

信州大学・ヒト環境科学研究支援センター・教授

研究者番号：50177797

##### (2) 研究分担者

宮原 照良 (MIYAHARA TERUYOSHI)