

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11472

研究課題名(和文) Leber先天性黒内障疾患モデル作製と遺伝子治療および網膜におけるCCT2機能解析

研究課題名(英文) Analysis of retinal function of LCA-causing CCT2 and the generation of mouse model and therapeutics

研究代表者

峯岸 ゆり子 (MINEGISHI, Yuriko)

公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター プロテオミクス解析グループ・研究員

研究者番号：20621832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Leber先天性黒内障(LCA)患者ではCCT2遺伝子上の別個の変異2種(T400PとR516H)が同居する複合ヘテロ接合遺伝子変異が同定されており、本研究ではこれらの遺伝子変異についてそれぞれゲノム編集技術を駆使してマウスCct2遺伝子に導入したノックインマウスを作製・樹立し、ノックインマウス網膜においてもLCA患者と同様の網膜変性が生後早期より引き起こされることを明らかにした。本研究で樹立したLCAモデルマウスを用いることで、複合ヘテロ接合遺伝子変異の意義やCCT2が有する網膜における生理機能の重要性とLCA発症機序の理解が進み、さらに将来的な治療法開発の上で有用となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子シャペロンの1つであるCCT2は複合体を形成し、細胞内で産生されるタンパク質を正常な立体構造へと折り畳む機能を持つ。CCT2遺伝子における「複合ヘテロ接合変異」と呼ばれる、同一遺伝子内での別個の2つの変異が同居することでLCAという遺伝性網膜変性疾患が惹起されることが過去の研究で示されたが、分子シャペロンの機能と網膜疾患の関連は未だ不明で、また複合ヘテロ接合変異という特殊な遺伝形式の意義について遺伝型と表現型を実際にモデル動物を用いて解析した研究は過去に例がない。最新のゲノム編集を用いることで可能となったノックインマウスモデルの樹立により、治療法の開発が可能となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The compound heterozygous mutation, carrying the 2 distinct mutations in the same gene, of CCT2 gene (T400P and R516H) has been identified in the Leber congenital amaurosis (LCA) patients previously. In this study, these two mutations were introduced into mouse Cct2 gene by genome editing technology and established mouse lines as knock-in mouse models. The retina of knock-in mouse exhibited similar severe retinal degeneration at early in life as LCA patients. The LCA model mice established in this study will help to understand the significance of compound heterozygosity in inherited retinal diseases, the physiological function of molecular chaperone of CCT2 in the retina and the pathoetiology of LCA onset that further lead to future development of therapeutics.

研究分野：眼科学

キーワード：Leber先天性黒内障(LCA) 網膜変性 遺伝子変異 複合ヘテロ接合変異 CRISPR-Cas9 ゲノム編集 モデル動物 CCT

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。

1. 研究開始当初の背景

(1) CCT2 遺伝子における複合ヘテロ接合変異と Leber Congenital Amaurosis (LCA)

Leber Congenital Amaurosis (LCA: Leber 先天性黒内障)は生後2~3カ月の乳幼児の生後早期より瞳孔反応の遅延、および重篤な視力障害が引き起こされる常染色体劣勢の遺伝性網膜疾患であり、小児に至るまでの間に先天性に発症が多く認められる遺伝性網膜ジストロフィーのひとつである。

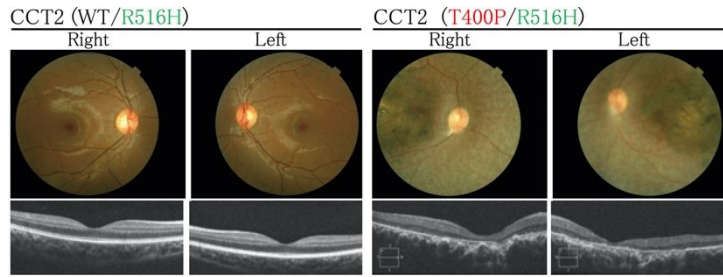


図1:ヒトCCT2遺伝子の複合ヘテロ接合変異によるLCA網膜像

研究代表者の先行研究から、

Leber Congenital Amaurosis (LCA/Leber 先天性黒内障)と診断され、LCA 既知遺伝子変異が認められないとして共同研究の依頼があった LCA 家系について、Whole Exome Sequencing (WES) 解析を行ったところ、CCT2 遺伝子内で、アミノ酸 400 番目のチロシンがプロリンに置換される T400P 変異、およびアミノ酸 516 番目のアルギニンがヒスチジンに置換する 2 つのミスセンス変異が患者において同居する複合ヘテロ接合変異が原因であることが強く示唆された(図1:引用文献より抜粋引用)。この LCA 患者末梢血から樹立した iPS 細胞の内在性 CCT2 タンパク質量は、健常者である親、もしくは CCT2 変異を持たない独立した iPS 細胞と比較して、半分程度に減少していることなどが明らかとなっている(図2:引用文献より抜粋引用)。また分子細胞生物学的検討、立体構造予測などから、両変異体では野生型と異なる結合分子が認められること、細胞増殖が抑制されるなど、立体構造異常による CCT2 発現量の減少や結合分子の変化が LCA の疾患発症に寄与している可能性が考えられた。

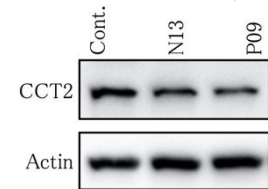


図2:患者由来iPS細胞(P09)の CCT2タンパク質発現量

上述の結果から、CCT2 の複合ヘテロ接合変異が LCA を惹起している可能性が強く示唆されたが、実際のモデル動物が存在せず、T400P と R516H 変異を有するモデル動物を用いた網膜における病態解析が期待されていた。

(2) ゲノム編集による CCT2 変異ゼブラフィッシュモデルと網膜形態形成異常

引用文献に報告したように、CCT2 遺伝子における複合ヘテロ接合変異が LCA の発症に寄与していることが強く示唆されていたが、当該遺伝子変異が実際に網膜病態を引き起こすかについての検討はなされておらず、ヒト LCA 患者で認められる病態を反映し、治療法開発に有用なモデル動物の作製が求められていた。そこで、ゼブラフィッシュをモデル動物とし、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術を用いて CCT2 遺伝子内の変異をもたらす網膜への影響について検討を行った結果、CCT2 遺伝子内の 21 塩基欠損により、結果としてアミノ酸 394 番目のロイシンがヒスチジンに置換し、その後のアミノ酸 395~401 番目までの7アミノ酸が欠損した L394H-7del 変異個体の変異体が樹立された。この変異ホモ個体では、発生早期から小眼球となり、網膜内の CCT2 タンパク質が大きく減少していた。また発生中の網膜内、特に視神経節細胞層における有意な細胞死が認められた(図3:引用文献より抜粋引用)。この現象は正常な CCT2 mRNA をインジェクションし、CCT2 タンパク質の発現を補填することで解消されたが、T400P mRNA のインジェクションにより発現させた変異タンパク質では解消されなかった。

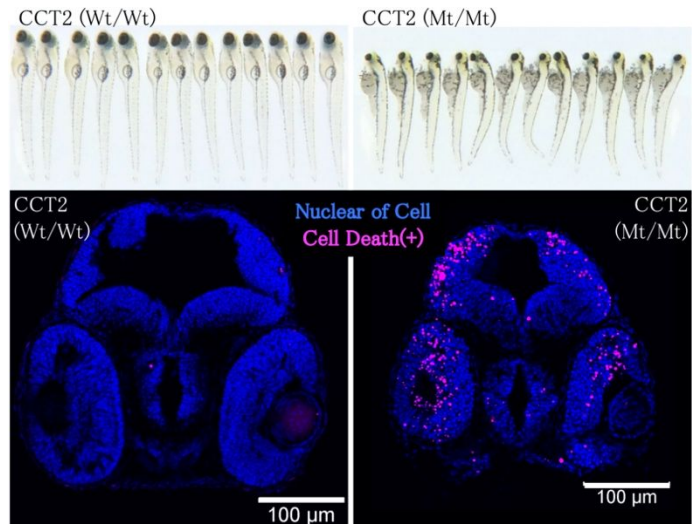


図3:CCT2変異(Mt/Mt)ゼブラフィッシュモデルとその病態

以上のことから、魚類においても CCT2 が眼球、特に網膜の形態形成時に重要な役割を持つことが示された。一方で、ゼブラフィッシュをモデル

としたゲノム編集ではマウスをモデルとした場合と比較してヒトと相同の変異を有するノックインフィッシュの獲得が困難であった。またそのためヒト LCA と同義の病態を呈するモデルの獲得には至らず、疾患治療法の解析に必要なモデル動物の構築が依然として課題として残されていた。

2. 研究の目的

(1) 先行研究の結果を受け、ゼブラフィッシュをモデルとした解析では CRISPR-Cas9 でのゲノム編集技術を用いたヒト変異と全く同様の変異を有するノックインモデルの作製が困難であったこと、魚類と哺乳類では網膜の発生、形態が大きく異なっており、治療法の解析にも不向きである可能性について考慮し、本研究ではマウスをモデル動物とし、CCT2 の LCA 関連遺伝子変異である T400P、および R516H 変異を有するノックインマウスを LCA モデルマウスとして樹立することを第一の目的とし、樹立した LCA

モデルマウスにおいて、Cct2 が持つ哺乳類網膜における生理機能と合わせ、変異ホモ個体、複合ヘテロ接合個体において、ヒト LCA 患者と同様の網膜病態が惹起されるかについて検討を行った上で、遺伝子治療による病態治療効果について検討を行うことを目的とした。近年の Genotype-Phenotype の概念から、同一遺伝子内の変異でも生体内での影響は様々で、過去に疾患関連として報告された遺伝子であっても変異が異なる場合には病態発症がなく、良性の遺伝子変異である場合も数多く報告されている。これまでの遺伝子改変モデル動物の作製には多大な労力と時間が必要であったことから、遺伝学と病態学との間の因果関係についての検証には解離があった点も否めない。本研究では、CCT2 の T400P、R516H 変異それぞれがもたらす網膜への影響について詳細に検討を行うことで、Genotype-Phenotype に対する答えを示し、さらに遺伝学的にも比較的稀なモデルである複合ヘテロ接合変異の初のモデル動物作製として2種のノックインマウスを樹立することで、その掛け合わせにより、ヒトと全く相同の遺伝子変異による病態解析を達成することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ノックインマウスの作製

(a). T400P ノックインマウスの作製: CRISPR-Cas9 では、目的変異近傍に、目的遺伝子以外の配列に影響をもたらさない、オフターゲット効果が低くかつ遺伝子特異性の高い領域が存在し、その PAM 配列を標的としてガイド RNA を設定することが高効率な変異導入のための一つの重要な考慮点であるが、T400P をコードする遺伝子配列周辺ではノックインの作製に有用と思われる PAM 配列を認めることができなかった。そこで本研究では、T400P 変異を挟み、目的変異導入箇所からやや離れた PAM 配列2箇所を標的としガイド RNA を設計し、その2箇所の PAM 配列をまたく全長 200bp 以上となる比較的長鎖なドナーオリゴを用いたゲノム編集により T400P 変異の導入を試み、ノックインマウスを得ることとした。

(b). R516H ノックインマウスの作製: R516H をコードする配列周辺ではノックイン作製に有用と思われる PAM 配列を認めたため、その配列を標的としてガイド RNA の設計を行い、その PAM 配列を中央として全長 100bp のドナーオリゴを用いることで R516H 変異の導入を試み、ノックインマウスを得ることとした。

ゲノム編集により得られる F0 世代のマウス(ファウンダーマウス)から、生後3週齢前後に~5mm 程度の尾組織サンプルからゲノムを回収し、PCR とサンガーシーケンス方を用いたダイレクトゲノムシーケンスにより当該領域の遺伝子配列について確認する。そのうち、目的変異導入部位において変異導入が認められた個体についてはさらに TA クローニングを組み合わせることで、当該領域における塩基配列の確定を行う。目的の T400P、もしくは R516H 遺伝子変異を有する F0 個体を、C57BL/6j 野生型マウスと掛け合わせることで得られる産仔である F1 世代について、繁殖の可否と合わせ、遺伝形質の次世代への伝達(Germ Line Transmission)についての成否を確認する。本研究で用いるマウス作製技術では網膜変性疾患の研究に汎用される C57BL/6j のマウス胚を用いているため遺伝背景が揃っていることから、バッククロスが必要が従来法と比較して軽減できると考えており、F3 世代以降のヘテロマウスの獲得をもってノックインマウスの確立とし、以降の世代のヘテロ個体を実験用に拡大繁殖へ移行させることとした。

(2) 網膜の形態観察: ゲノム編集技術により樹立した上記ノックインマウスの掛け合わせにより得られる同腹産仔について、体重減少や明らかな異常所見の有無について検討を行ったのち、ジェノタイプングにより野生型ホモ個体、変異ヘテロ個体、変異ホモ個体について確認を行う。種々の遺伝型の個体について、その網膜形態を Optical Coherence Tomography (OCT)を用いて経過観察を行い、病態変化の有無、その特徴について検討を行うことで、病態発症時期、および網膜病態の特徴について明らかにする。網膜構成細胞の変化については各種細胞に対するマーカー抗体を用いた免疫組織化学により細胞種の同定を行うことで検討を行う。網膜組織内 CCT2 タンパク質および CCT シャペロンの支配下にあり、網膜病態に関連すると考えられるタンパク質の変化についてウェスタンブロットによる検討を行う。

(3) アデノウイルス随伴(Adeno virus associating vector: AAV)ベクターの作製: 上記の形態観察によりヒト LCA の網膜病態と相同、もしくは類似した病態が認められた場合、目的細胞を標的とする AAV ベクターを用いて CCT2 補填実験を行い、遺伝子治療効果の有用性とそのタイミングについて検討を行う。

4. 研究成果

(1) T400P ノックインマウスの樹立

上述した通り、T400P のノックインマウス作製に当たっては2箇所のガイド RNA を利用したが、通常の F0 産出数(通常 50 匹前後)よりもかなり少ない産仔しか得られず、通常用いているゲノム編集手法では T400P をノックイン変異として有するファウンダーマウスは得られなかった。しかしながら、このトライアルの時点で、1 塩基欠損によりアミノ酸 376 番目以降でフレームシフトが生じ、その結果アミノ酸 401 番目が終始コドンとなることで CCT2 タンパク質が中途終了となる遺伝型(R376Vfs*25)を持つマウスが認められたことから、このマウスを T400P 代替用として、ノックアウト様マウス(T400fs*Stop)として先行して樹立を行った。アミノ酸 400 番目周辺は CCT2 の立体構造に重要な alpha-helix を構成していることから、ゲノム編集により、この遺伝子領域に不要に大きな変異が導入されたり、また本系で用いているゲノム編集の高い導入効率によって T400P が両アレルに導入され遺伝子型としてホモ個体となってしまうと、個体発生自体が障害され胎生致死となり、ファウンダーマウスの獲得が困難となる可能性が強く示唆された。そこで、T400P ノックインマウスの作製に限っては、ゲノム編集効率を多少下げること、胚操作の過程で T400P 変異がホモ変異として導入されないようなゲノム編集条件が必要であると考え、次に Cas9-NLA 量を減らしてゲノム編集を試みた。その結果、得られたファウンダーマウスのうち、2 匹に T400P 変

異をヘテロ、もしくはモザイクで有する個体を得ることができた。しかしこれら 2 匹は生後致死となり、ノックインマウスモデルとして確立することは不可能であった。依然として F0 として得られる産仔数が少なかったことから、次にガイド RNA 量を減らしてのゲノム編集を試みた。その結果、得られたファウンダーマウスのうち 1 匹において T400P 変異を認めた。この T400P 変異を有する F0 マウスは外見上正常であり、大きな異常所見も認められず、またファウンダーマウスと野生型マウスを掛け合わせて得られた F1 世代における T400P ヘテロ個体が確認できたことから、本マウスを T400P ノックインマウスとして確立し、拡大繁殖中へと移行させた。

(2) R516H ノックインマウスの樹立:通常のインジェクション作業から、R516H で 50 匹以上のファウンダーマウスが得られた。これらのマウスについて上述の手法と同様の手順で当該領域の遺伝子配列について確認を行なったところ 2 匹が R516H 変異ホモ個体であった。この F0 マウスは外見上正常であり、大きな異常所見もなく繁殖が可能であった。そこで、これらのファウンダーマウスに野生型マウスを掛け合わせ、F1 世代においても遺伝形質が伝達されていることを確認し、これらの 2 匹由来のマウスラインを R516H ノックインマウスとして、以降の実験に用いるため、拡大繁殖へと移行させた。

本研究のゲノム編集で得られた結果をまとめた表を下記に示す。

Summary of Genome Editing for *Cct2*

CCT2-T400P	Guide RNA	# of F0	Obtained Knock-In Line	Alternative Line	Germ Line Transmission
1st Trial	Double Cut	10	n.a.	R376Vfs*25	Successful
2nd Trial	Double Cut	19	T400P (Mosaic) x 3 (All dead after birth)	n.a.	n.a.
3rd Trial	Double Cut	12	T400P (Mosaic) x 1	n.a.	Successful

CCT2-R516H	Guide RNA	# of F0	Obtained Knock-In Line	Alternative Line	Germ Line Transmission
1st Trial	Single Cut	55	R516H(Homozygous) x 2	n.a.	Successful

(3) 先行してノックインマウスが確立していた R516H ノックインマウスの F3 世代以降のヘテロ型マウス同士を掛け合わせることで、複数の同腹産仔を得た。これらのマウスについて生後 10 ヶ月齢にて眼底カメラを用いた眼底観察を行ったところ、野生型 (WT) CCT2 のみを有する WT/WT ホモ個体、もしくは WT/R516H ヘテロ個体では異常が認められなかったが、R516H/R516H ホモ個体の眼底観察では非常に重篤な色素上皮の脱落が認められ、何らかの網膜病態が惹起されていることが示唆された。そこで、対応する同一個体の網膜全層の変化について、OCT を用いた形態観察を行ったところ、R516H/R516H ホモ個体では網膜が菲薄し、特に網膜外層に変性が認められ、加えて神経繊維層・視神経節細胞層・内網状層・内顆粒層の網膜内層でもにおける層構造の不明瞭化・菲薄化が進んでおり、網膜全層、かつ網膜広範にわたり非常に重篤な網膜変性が惹起されていることが明らかとなった。そこで病変が惹起されるタイミングについて検討を行うため、別途、6週齢のマウスを用い、OCT を用いて網膜全層の厚さ、および視細胞の核が位置する外顆粒層 (ONL) の厚さについて検討を行った。その結果、WT/WT ホモ個体および WT/R516H ヘテロ個体では通常の正常マウス網膜である 200um 程度の厚さが認められたが、R516H/R516H ホモ個体では生後 6 週齢の時点ですでに網膜萎縮を示唆する顕著な網膜全層厚の減少認められ (100~130um 弱)、特に、視細胞の数を反映している ONL での厚さが顕著に減少していたことから、R516H/R516H ホモ個体で認められる網膜変性は主に視細胞が障害されることに起因することが示唆された。後続の検討より、R516H/R516H ホモ個体では生後 3 週齢~4 週齢の時点ですでに視細胞内節-外節接合領域を示す Ellipsoid Line の不明瞭化が認められたことから、生後非常に早期より網膜変性が惹起されていることが明らかとなった。これらの網膜病態所見は、多くのヒト LCA 患者が生後半年以内に視機能の異常を認め、視細胞の減少を起点とした網膜変性を呈する特徴的な病態をよく反映する結果であった。以上の結果から、本研究で確立した R516H ノックインマウスが LCA 疾患モデル動物として有用であることが強く示唆された。

一方で、これまでに CCT シャペロン機能、特に CCT2 の支配下にあつて、網膜機能の維持に重要であると報告されているタンパク質である Gβ1 の網膜での顕著な発現消失は 6 週齢時点では認められず、別因子の関連が考えられた。

現在 T400fs*Stop ノックアウト様マウス、T400P ノックインマウスについても同様の解析を行っているところである。先行研究では T400fs*Stop 様変異や T400P では R516H よりも、生化学的変化、生理機能においてより重篤な影響が認められてきたことから、網膜症状に加え胎性致死の可能性についても加味した検討を行っている。

(4) AAV ベクターの構築を行った:研究代表者らは引用文献 にある通り、マウス網膜に対する遺伝子治療モデルとして AAV を用いた系をすでに確立している。そこで、本研究で必要となる *Cct2* の補填療法のため、同様の AAV ベクターの構築を行った。現在進行中の T400fs*Stop、T400P マウスモデルの基礎データ取得後、複合ヘテロ接合モデルとして WT/T400P と WT/R516H を掛け合わせ、その網膜変化について解析を行うと同時に、構築した AAV ベクターを同腹産仔マウスの眼内網膜下に投与することで、遺伝子治療モデルとしての *CCT2* 補填療法による網膜病態の軽減効果について検討を行う予定である。

引用文献

[Minegishi, Y., et al. \(Sci Rep, 2016\)](#)

Minegishi, Y., et al. (*IOVS*, 2018)

Li, H., Yuan, S., **Minegishi, Y.**, et al., (*Hum Mol Genet*, 2020)

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 Minegishi Yuriko, Nakaya Naoki, Tomarev Stanislav I.	4. 巻 59
2. 論文標題 Mutation in the Zebrafish cct2 Gene Leads to Abnormalities of Cell Cycle and Cell Death in the Retina: A Model of CCT2-Related Leber Congenital Amaurosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 995 ~ 1004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1167/iovs.17-22919	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 2件）

1. 発表者名 Yuriko MINEGISHI
2. 発表標題 Mutation in Leber's congenital amaurosis-causing gene cct2 evokes retinal hypoplasia in zebrafish
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minegishi, Y., Nakaya, N,m Iwata, T. and Tomarev, S.
2. 発表標題 Mutation in Leber's congenital amaurosis causing gene, cct2, evokes retinal hypoplasia in zebrafish
3. 学会等名 Human Genome Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 峯岸ゆり子
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いたCct2遺伝子変異による網膜病態についての検討
3. 学会等名 第10回Retinal Research Meeting
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----