

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 10 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11501

研究課題名(和文) 網膜黄斑部の形成および特性に関する遺伝子の探索

研究課題名(英文) Screening for genes with characteristic expression in the macula of the human retina

研究代表者

田中 卓 (TANAKA, TAKU)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・視覚科学研究室・研究員

研究者番号：20443400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：網膜黄斑部は視細胞が集積する視力に最も重要な領域であり、その損傷は重篤な眼疾患につながる。本研究課題では黄斑形成、機能に関する遺伝子を同定するため、小児網膜の黄斑部のマイクロアレイ解析を実施し、周辺部と比較して黄斑部において発現差が2倍以上、 p -value < 0.05の基準に該当した遺伝子の解析を進めた。全体としては神経伝達に関連するものが多かったが、網膜分化とのつながりが不明な機能未知の遺伝子も含まれていた。また顕著な発現差を示した遺伝子にレチノイン酸や甲状腺ホルモンの代謝で働く遺伝子があり、これらのシグナル伝達経路による黄斑成熟期における遺伝子発現制御が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜の黄斑部は視力に最も重要な領域であり、黄斑部の異常に起因する眼疾患は失明など重篤な症例に至る場合が多い。本研究の解析から得られた黄斑成熟期における網膜の遺伝子発現情報は、黄斑部で機能している可能性がある複数の遺伝子を明らかにし、新たな黄斑疾患原因遺伝子を発見するための手がかりとなりうる。また加齢黄斑変性症の新たな治療法として、iPS細胞由来の網膜細胞の移植が注目されているが、その効果は移植用の細胞の質にも左右される。黄斑部の視細胞に類似した細胞調製法の開発にも今回の知見が役に立つと考える。

研究成果の概要(英文)：The macula is the essential region for visual acuity where cone photoreceptors are in high density, and its damage leads to serious eye diseases. In this research project, we performed a comprehensive transcriptome analysis of pediatric retina and analyzed genes showed an expression difference of more than 2-fold (p -value < 0.05) in the macular region compared with the peripheral region to identify genes involved in macular formation and function. Analysis revealed that a set of genes with functions related to neurotransmission, such as synaptic vesicle transport, were enriched. It also contained unknown genes that has not reported the connection to retinal differentiation. Retinoic acid (RA) metabolizing enzyme and thyroid hormone (TH) inactivation enzyme showed significant difference between macular and periphery region, which suggesting that the expression in the macular region might be affected by RA and TH signal pathway.

研究分野：分子生物学

キーワード：黄斑 網膜 レチノイン酸 甲状腺ホルモン

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜黄斑部は視細胞(錐体)が集積し、視力に密接に関わる領域である。網膜の黄斑部の損傷は決定的な視力低下につながり、黄斑部に関連する重篤な眼疾患は数多い。加齢黄斑変性症に代表されるような成人期に発症するものは症例数も多く、研究が比較的進んでいるが、胎児期の黄斑形成不全による先天性疾患については、関連する疾患遺伝子が不明なものも多い。一方、加齢黄斑変性症を対象に、iPS 細胞の分化誘導に得られた網膜細胞を移植する治療の治験が開始され、黄斑疾患の新たな治療法として、細胞移植が注目されている。黄斑部を構成する網膜細胞の分子生物学的理解は黄斑疾患の疾患原因遺伝子の探索だけでなく、新たな治療法の開発にも必要不可欠であった。成人や胎児網膜由来の黄斑部のトランスクリプトーム解析についての報告はあったが、黄斑の成熟期にあたる生後数年の網膜黄斑部の遺伝子発現に関する情報はほとんど無かった。

2. 研究の目的

- (1) 小児網膜の黄斑部において特徴的な発現を示す遺伝子を解析し、黄斑形成、成熟に関与する新たな遺伝子を探索する。
- (2) 黄斑形成、成熟に関わる遺伝子制御ネットワークの解明し、黄斑部を構成する網膜細胞に類似した細胞集団を得るための知見を得る。

3. 研究の方法

- (1) マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析: 3人の網膜芽腫の手術検体(月齢4、6、14ヶ月)から採取した網膜を黄斑部とその周辺部に分離して回収し、RNeasy カラムによりトータル RNA を抽出した。抽出 RNA を SurePrint G3 Human Gene Expression Microarray 8 × 60 K v2 (Agilent Technologies) で解析し、黄斑部と周辺部との発現を比較した。得られたシグナルデータのプロセッシング、統計処理は GeneSpring GX 14.9 (Agilent Technologies) にて行い、発現差異遺伝子(Differentially Expressed Genes; DEGs)として $|\text{Log}_2(\text{FC})| > 1$ and $P < 0.05$ のクリテリアを満たすものを選別した。
- (2) GO (Gene Ontology) 解析とパスウェイ解析: GeneSpring GX 14.9 を使用して、選別した DEGs に濃縮されている GO Term とパスウェイを解析した。パスウェイのデータは WikiPathways website (<http://www.wikipathways.org/index.php/WikiPathways>) からダウンロードした。
- (3) レチノイン酸(RA)およびトリヨードサイロニン(T3)が DEGs 与える影響の評価: ヒト iPS 細胞 409B02 株の網膜分化誘導系(引用文献)を使用して実施した。レチノイン酸 (Sigma #R2625)、トリヨードサイロニン (Sigma #T6397) を誘導開始 30 日後に投与し、10 日間培養後、細胞を回収した。回収した細胞から RNeasy カラムによりトータル RNA を抽出し、cDNA に逆転写後、TB Green® Premix Ex Taq™ II (タカラバイオ) を使用して StepOnePlus リアルタイム PCR システム(Thermo Fisher Scientific)にて、リアルタイム PCR を実施した。得られた Ct 値を使用して、比較 Ct 法によりコントロールサンプルを 1 とした発現比を算出し、評価した。

4. 研究成果

- (1) 小児黄斑部において特徴的な発現を示す遺伝子群の解析: マイクロアレイ解析により、周辺部と比較して黄斑部において発現差が 2 倍以上、 $p\text{-value} < 0.05$ の基準で黄斑部の発現差異遺伝子(DEGs)を選別したところ 496 プローブ(上方制御 432、下方制御 64)が該当した。上昇制御および下方制御遺伝子について、変動幅の大きい上位各 5 遺伝子(Top5 DEGs)について、qPCR により、発現レベルを検証し、マイクロアレイと同様の発現差を確認した(図 1)。

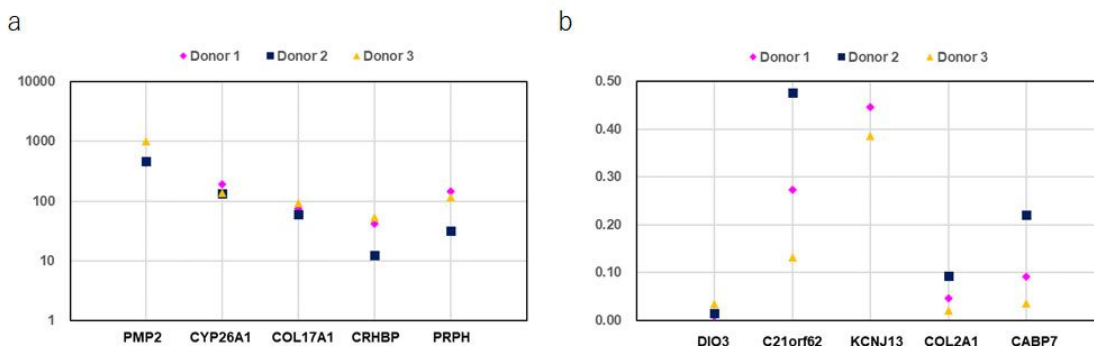


図 1 Top5 DEGs の黄斑部と周辺部との発現差の検証 (a: 上方制御, b: 下方制御)

DEGs を対象にした GO 解析の結果、神経シグナル伝達のコンポーネントやプロセスに関わる GO が濃縮していた。また、パスウェイ解析の結果、Synaptic Vesicle Pathway が最も相関の高い経路であった(表 1)。この経路を構成する 51 個の遺伝子のうち、6 個の遺伝子が本研究の基準の DEGs に該当し、40 個の遺伝子が周辺部よりも黄斑部において高い発現を示した。

表 1 DEGs のパスウェイ解析

Pathway	p-value	Matched Ent Pathway Entities	
Hs_Synaptic_Vesicle_Pathway_WP2267_96972	2.24E-05	6	51
Hs_Spinal_Cord_Injury_WP2431_101932	4.53E-05	8	117
Hs_Splicing_factor_NOVA_regulated_synaptic_proteins_WP4148_9439	9.24E-05	5	42
Hs_Parkin-Ubiquitin-Proteasomal_System_pathway_WP2359_72121	1.26E-04	6	73
Hs_Parkinsons_Disease_Pathway_WP2371_102996	1.03E-03	4	75
Hs_Prostaglandin_Synthesis_and_Regulation_WP98_102309	1.48E-03	4	46
Hs_Calcium_Regulation_in_the_Cardiac_Cell_WP536_102526	1.57E-03	7	150
Hs_Alzheimers_Disease_WP2059_102211	2.19E-03	5	150
Hs_Synaptic_signaling_pathways_associated_with_autism_spectrum_c	2.37E-03	4	50
Hs_Differentiation_of_white_and_brown_adipocyte_WP2895_87889	2.67E-03	3	25
Hs_Pathogenic_Escherichia_coli_infection_WP2272_97629	3.59E-03	4	74
Hs_Neural_Crest_Differentiation_WP2064_101922	5.42E-03	5	101
Hs_MAPK_Signaling_Pathway_WP382_103466	7.18E-03	8	249
Hs_Amyotrophic_lateral_sclerosis_(ALS)_WP2447_96316	8.79E-03	3	38
Hs_Epithelial_to_mesenchymal_transition_in_colorectal_cancer_WP42	8.99E-03	6	160

(2) レチノイン酸シグナルが黄斑領域の発現に及ぼす影響の解析: 今回の小児黄斑の発現解析で、変動幅が 2 番目に大きい上昇制御 DEG はレチノイン代謝酵素である CYP26A1 (マイクロアレイ解析で 56 倍、qPCR 解析で 155 倍)であった。レチノイン酸は網膜形成初期の黄斑領域決定の際に関与しているとの報告があり、黄斑形成、成熟期においてもその作用が続いていることが示唆された。CYP26A1 と同じ CYP ファミリーである CYP26B1 の発現は逆に周辺部よりも黄斑部において、発現レベルが低下していた。

次に iPS 細胞が網膜細胞へ分化する過程において、レチノイン酸が Top5 DEGs (10 遺伝子)の発現に及ぼす影響を評価した。上方制御 DEGs は CYP26A1 以外では 1 遺伝子(CRHBP)に対して 3 倍程度の促進作用が見られた。一方、下方制御 DEGs に対しては全体的に発現を抑制する効果が確認された(図 2)。

(3) 甲状腺ホルモンシグナルが黄斑領域の発現に及ぼす影響の解析: 黄斑部の特徴の 1 つとして視細胞(錐体)の集積があるが、甲状腺ホルモン(TH)はそのレセプターである THR を介して、オプシンの発現を制御し、視細胞の運命決定に関与している。周辺部と最も大きな発現差を示した下方 DEG の DI03 は高活性型の甲状腺ホルモンであるトリヨードサイロニン(T3)の代謝に働く酵素であった。成人黄斑における解析報告では顕著な発現差を示す遺伝子として報告されておらず、生後の黄斑成熟期において強く作用していること可能性がある。黄斑領域の T3 の濃度と遺伝子発現との関係に関する情報を得るため、iPS 細胞からの網膜細胞誘導系を使用して、T3 が Top5 DEGs (10 遺伝子)の発現に及ぼす影響を評価した。上方制御 DEGs に対しては有意な影響が見られなかったが、レチノイン酸と同様、下方制御 DEGs に対しては全体的に発現を抑制する効果が確認された(図 3)。

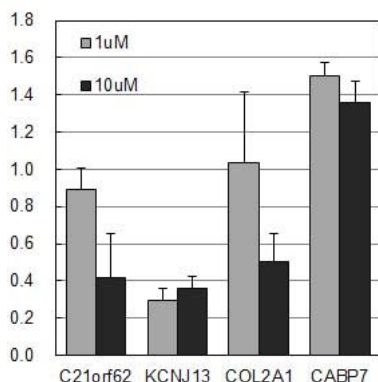


図 2 下方制御 DEGs の発現に対するレチノイン酸の影響の評価

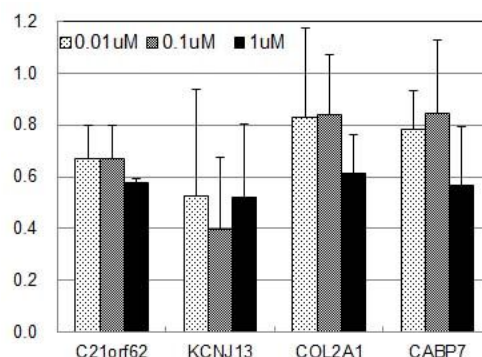


図 3 下方制御 DEGs の発現に対するトリヨードサイロニンの影響の評価

今回は iPS 細胞からの網膜細胞への分化誘導過程の特定の時期で、変動上位の遺伝子を対象にレチノイン酸、T3 の発現への評価をしたが、生体での網膜発生過程では、より厳密に時期や濃度に依存して、黄斑領域の遺伝子発現制御に関与していることも予想される。本研究では評価できなかったが、細胞外マトリックスなど他の因子も含めて、DEGs の情報を黄斑部網膜細胞に類似の細胞集団誘導法に活用していく予定である。

下方制御の Top5 DEGs のなかにレーバー先天黒内障の原因遺伝子として報告されている KCNJ13 が含まれていた。本研究でスクリーニングした DEGs の中にはこれまで網膜発生との関係が報告されていない遺伝子も複数あり、機能解析を通して先天性黄斑疾患との関連も探索していく予定である。

<引用文献>

Tanaka T, Yokoi T, Tamalu F, Watanabe S, Nishina S, Azuma N. Scientific Reports. 2015 Feb 10;5:8344.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中卓
2. 発表標題 網膜黄斑部で特徴的な発現を示す遺伝子の探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年～2020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
研究協力者	横井 匡 (YOKOI Tadashi) (80514025)	国立成育医療研究センター・眼科・視覚科学研究室・医員 (82612)	
研究協力者	仁科 幸子 (NISHINA Sachiko) (40237954)	国立成育医療研究センター・眼科・視覚科学研究室・医長 (82612)	
研究協力者	松坂 恵美子 (MATSUZAKA Emiko) (70789974)	国立成育医療研究センター・眼科・視覚科学研究室・研究員 (82612)	
連携研究者	東 範行 (AZUMA Noriyuki) (10159395)	国立成育医療研究センター・眼科・視覚科学研究室・医長・室長 (82612)	