

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2006～2008
 課題番号： 18591938
 研究課題名 (和文) 未熟児網膜症における遺伝子要因の解析とシグナル伝達系への関与
 研究課題名 (英文) Genetic screening of retinopathy of prematurity and its association in the Wnt signaling pathway
 研究代表者
 平岡 美紀 (HIRAOKA MIKI)
 日本医科大学・医学部・講師
 研究者番号： 80246983

研究成果の概要：

本研究の目的は、未熟児網膜症の症例の遺伝子解析を行い、未熟児網膜症の内的な発症因子の関与を検討するものである。特に網膜の血管構築に重要である Wnt シグナル系に作用する ND(Norrie disease)遺伝子、FZD-4 (frizzled-4) 遺伝子、および LPR5 (low-density lipoprotein receptor related-protein 5) 遺伝子について、重症未熟児網膜症の検体で遺伝子解析を行った。

各症例のゲノム DNA を抽出し、目的遺伝子のエクソン部分を PCR 法にて増幅し、得られた産物の塩基配列を同定した。その結果、ノリエ病遺伝子については翻訳領域には全例変異はみられなかったが、5'側の非翻訳領域に変異があるものが一例あった。

このことはノリエ病遺伝子の発現の調整に異常をきたしている可能性が示唆された。

FZD-4 遺伝子については、アミノ酸翻訳全領域と 5'側の非翻訳領域の解析を行ったが、遺伝子変異を持つ症例はみられなかった。

LPR5 遺伝子は翻訳領域が 2 3 エクソンに及ぶ長い遺伝子である。その全てのエクソンについて、全例の塩基配列の同定を行った。その結果、複数症例でヘテロな遺伝子変異が見いだされた。これらのうち、新規の変異であるか、またこの変異によってアミノ酸の配列が変わるかについて、現在解析中である。

今まで未熟児網膜症の発症には出生時の状態や出生後の酸素投与などの環境因子が要因と考えられてきたが、本研究の結果から内的因子、特に遺伝子の異常が本症の発症に寄与している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・眼科学

キーワード： 眼科学・遺伝疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、周産期医療の進歩とともに早産児の救命率が上昇し、それに伴って未熟児網膜症の症例は増加傾向にあり、また重症化している。未熟児網膜症の病態は網膜血管の発育不全を主体とし、活動性かつ進行性で、失明にいたることも少なくない。その発症は出生体重や在胎週数などの全身的な未熟性を基盤とし、高濃度酸素投与などの環境因子が要因であるとされてきた。しかし、米国の多施設研究において、黒人種は白人種に比べて未熟児網膜症が軽症であること、またシンガポールでも人種間での発症率や重症度に差があることが報告され注目されている。これらの成績から、未熟児網膜症の発生や重症化には内的因子、とくに遺伝素因が関与することが強く示唆されている。

(2) 未熟児網膜症と非常に似た眼の臨床経過をきたすものに家族性滲出性硝子体網膜症がある。この疾患は、家族性・遺伝性発症をきたすものが多く、その遺伝形式には常染色体優性、常染色体劣性、あるいはX染色体劣性遺伝形式が報告されている。欧米では、常染色体優性遺伝の症例ではFZD-4 (frizzled-4)、常染色体劣性のもものではLPR5 (low-density lipoprotein receptor related-protein 5)、またX染色体劣性の症例ではノリエ病の遺伝子

(No rrie disease gene: ND gene)の異常が報告されている (Robitaille et al. Nature Genetics 2002, Jiao et al. Am. J. Human Genetics 2004, Chen et al. Nature Genetics 1993)。FZD-4、LPR5、およびノリエ病遺伝子(ND gene)の産物は、それぞれ細胞内でWnt/Caシグナル経路の調節に携わっていることが細胞培養系の実験で立証されている (Pinson et al. Nature 2000, Xu et al. Cell 2004)。さらに3種の遺伝子をそれぞれ欠損したマウスでは網膜血管の発達が障害されると報告されている。これらの事実は、家族性滲出性硝子体網膜症ないしはその類縁疾患において、Wnt/Caシグナル経路の異常が関与する可能性が考えられる。

(3) 一方、未熟児網膜症における遺伝子変異の報告は、ND geneやFZD-4の変異が症例報告として孤発例に認められていたが、家系内での遺伝子解析からの有変異者の有無や発症者との関連は検索されておらず、また多数の症例の中でそれら変異の頻度や網膜症発症との関連は不明とされてきた。本研究代表者は、米国の重症未熟児網膜症100余例のDNA検体を解析し、約3%にND geneの変異を発見し、この遺伝子変異が未熟児網膜症の発症に関与する可能性を指摘した (Hiraoka et al. J. Human Genetics 2001)。これら

のことから、未熟児網膜症の発症には、家族性滲出性硝子体網膜症の候補遺伝子などの遺伝子変異が関与し、これら遺伝子変異によって引き起された分子レベルにおける細胞内シグナル伝達経路、特に Wnt シグナルの変化が関わっていることが考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本邦での未熟児網膜症の症例の遺伝子解析をおこない、家族性滲出性硝子体網膜症の原因遺伝子候補とされている三つの遺伝子に焦点を絞って、ND gene、FZD-4、および LPR5 の遺伝子変異をスクリーニングし、これらの遺伝子変異が対象例に比べ、未熟児網膜症症例に優位に認められるか否かを検討する。

(2) 上記のスクリーニングから遺伝子変異が優位に認められたものにつき、未熟児網膜症の重症度と、その遺伝子変異の発現率との関連を検討する。

(3) また、見出された遺伝子変異については、変異遺伝子による遺伝子発現の変化や細胞内 Wnt シグナルへの影響を検討する。

(4) 上記の (1) ~ (3) の検討から、未熟児網膜症の遺伝子要因を明らかにし、その発症過程と病態発現の解明ならびにその予防に対する指針を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 各施設の遺伝子倫理委員会の承認のもと、対照例（正常例）と未熟児網膜症例について末梢血の収集を行い、それぞれについてゲノム DNA を抽出する。

(2) PCR 法を用いて、上記のゲノム DNA から三つの遺伝子、ND、FZD-4、および LPR5 のエクソン部分を増幅する。ND、FZD-4 遺伝子についてはアミノ酸翻訳全領域と 5'側の非翻訳領域について行い、LPR5 遺伝子についてはアミノ酸翻訳全領域について行った。得られた DNA 断片の塩基配列をシーケンサーで同定した。

4. 研究成果

(1) 17 例の重症未熟児網膜症例の検体が収集された。対象は男性 12 例、女性 5 例であった。在胎週数は 23~29 (平均 24.3) 週、出生時体重は 458~1212 (平均 732, 2) グラム。網膜症の病期は国際分類で、stage 3 が 4 眼、4a が 13 眼、4b が 1 眼、5 が 16 眼であった。また、Aggressive Posterior Retinopathy of Prematurity は 14 例であった。それぞれの症例について遺伝子解析を行った。

(2) PCR 法を用いて 3 つの目的遺伝子の塩基配列を同定した。その結果、3 つのエクソンからなる ND 遺伝子については翻訳領域には全例変異はみられなかったが、5'

側の非翻訳領域に変異があるものが一例あった。このことはノリエ病遺伝子の発現の調整に異常をきたしている可能性が示唆された。また、2つのエクソンからなるFZD-4遺伝子については、アミノ酸翻訳全領域と5'側の非翻訳領域の解析を行ったが、遺伝子変異を持つ症例はみられなかった。LPR5遺伝子は翻訳領域が23エクソンに及ぶ長い遺伝子である。その全てのエクソンについて、全例の塩基配列の同定を行った。その結果、複数症例でヘテロな遺伝子変異が見いだされた。これらのうち、新規の変異であるか、またこの変異によってアミノ酸の配列が変わるかについて、現在解析中である。

(3) 未熟児網膜症の発症には在胎週数や出生後の酸素投与などが大きな要因とされてきた。しかし、これらの環境因子だけでは症例による発症の有無や重症化の差が説明できない。今回の研究結果から、重症未熟児網膜症の発症には、内的因子、特に遺伝子要因の関与が示唆された。とくにWntシグナル伝達系に作用する3つの遺伝子が網膜血管の発生に重要な役割を果たし、その異常によって未熟児網膜症が発症する可能性が指摘された。

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)

[雑誌論文] (計 0件)

[学会発表] (計 2件)

(1) 平岡美紀、他

「重症未熟児網膜症における遺伝子要因の解析」

第30回日本分子生物学会年会

2007年12月11～15日

横浜

2) 平岡美紀、他

「眼組織におけるCochlin分子の局在とmRNA発現」

第31回日本分子生物学会年会

2008年12月9～12日

神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 美紀 (HIRAOKA MIKI)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：80246983

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者