

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09401

研究課題名(和文)新規に発見した加齢黄斑変性責任遺伝子PANK4の機能解析と発症メカニズムの追究

研究課題名(英文)Functional analysis of PANK4 and elucidation of an onset mechanism in age-related macular degeneration

研究代表者

大石 健太郎 (Ohishi, Kentaro)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教

研究者番号：80345826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに我々は、ラット網膜光障害感受性原因遺伝子としてPank4を同定し、さらにそのヒト相同遺伝子PANK4の多型が加齢黄斑変性(AMD)の関連遺伝子であることも明らかにした。本研究期間において、我々は、耐性系統のラットでPANK4タンパク質が発現していないことを確認した。また、ゲノム編集技術によりPank4-KOマウスおよびPank4正常化ラットを作製し、網膜光障害-感受性の程度(表現型)を比較したところ、Pank4遺伝子のエキソン19における4塩基-5塩基置換変異がPank4遺伝子の発現を抑制すること、そして、これにより表現型が耐性に変化することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、感受性系統のラットからPank4-KOラットを作製し、さらに耐性系統のラットからPank4正常化ラットを作製した。これにより、Pank4遺伝子の重要な動物研究ツールとして、今後も活用できる。また、Pank4がノックアウトされても個体の成育に異常が認められないことから、AMDの創薬ターゲットとして副作用が少ない薬剤や治療法に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Previously, we identified Pank4 as a gene responsible for the susceptibility to rat retinal photic injury, and also demonstrated that the haplotype in the human homologue PANK4 is associated with the onset of age-related macular degeneration. During this study period, we confirmed that the PANK4 protein is not expressed in a resistant strain of rats. We produced Pank4-knockout rats and Pank4-normalised rats by genome editing technology, and compared the degree of the retinal photic injury (phenotype). It was found that a four-base to five-base substitution mutation in the exon 19 of the rat Pank4 gene suppressed the gene expression, which changed the phenotype to resistant.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜光障害 加齢黄斑変性 遺伝子改変動物 ハプロタイプ

## 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(AMD)は、加齢に伴い黄斑部の視細胞や色素上皮(RPE)細胞の変性や脈絡膜血管の異常をきたすことで視機能が障害され、発症する失明原因疾患である。本疾患は、遺伝要因と環境因子(加齢、光曝露、喫煙、黄斑色素量の低下、低メラニン量など)が関与する多因子疾患である。これまでにAMDの易罹患性を左右する遺伝子として、数多くの遺伝子が報告されたが、光関連の遺伝子は報告されていない。そのため、視細胞やRPE細胞といった光受容に関係する細胞で起こるAMDの発症・進展メカニズムを説明する根幹ストーリーが描けなかった。

一方、AMDの動物実験モデルとして、網膜光障害実験モデルがある。この実験モデルについては、Noellらが1966年に初めてラットを用いた実験系を発表したが、そこで起きる網膜変性が形態学的にも生化学的にもAMDの病態に類似している。しかし、分子レベルでの発症機構の共通性が示されておらず、網膜光障害がAMDのモデルであることを裏付ける科学的根拠は乏しかった。

我々は、市販の正常アルビノラットの中に極端な網膜光障害-耐性を示す系統があることに気付いており、この感受性の違い(系統差)に関与する遺伝子がAMDと光を関連付ける鍵となるのでは?と考えた。そこで我々は、ラット網膜光障害-感受性の責任遺伝子の同定を遺伝学的手法により試みた。その研究成果として、“パントテン酸キナーゼ4(*Pank4*)”を同定した。

このラット*Pank4*遺伝子のヒト相同遺伝子*PANK4*のコーディング領域に存在し、アミノ酸置換変異を引き起こす多型を遺伝子多型データベースの解析により見出すことができた。その多型はrs7535528 [p.Ala555Val]とrs2494620 [p.Gln692Arg]の2種類の一塩基多型(SNP)であった。両多型について、AMDの症例-対照研究を実施したが、両者ともAMDと有意な関連を示さなかった。しかし、それらの組み合わせ、即ち、ハプロタイプとして関連解析を実施すると、AMD発症との関連性を見出すに至った。

## 2. 研究の目的

本研究申請では、網膜光障害感受性原因遺伝子*Pank4*/AMD関連遺伝子*PANK4*について、生化学的研究、遺伝子改変動物での研究、AMDの症例-対照研究を多角的に検討することで、*Pank4*/*PANK4*が関与するAMD発症メカニズムを追究する。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト*PANK4*-cDNA ミニジーンを挿入したコンストラクトの作製: ヒト*PANK4*遺伝子は、ヒトcDNAライブラリー(Marathon; クロンテック社)より、Nested PCR法にて単離したcDNAミニジーンを使用した。Nested innerプライマーには、プラスミドDNAとの相同配列タグを付加しており、それを用いて、ヒト*PANK4* cDNAを目的のクローニング用プラスミドに挿入した。

今回、単離したヒト*PANK4* cDNAのハプロタイプはC-Gであったため、KOD Mutagenesis kitにより、CをTに、若しくは、GをAに変更することで、それぞれ2種類のハプロタイプ、T-GとC-Aを作製した。更に、T-GのGをAに変更することでT-Aを持つミニジーンを作製し、4種類のハプロタイプのヒト*PANK4* ミニジーンを持つコンストラクトを揃えた。

(2) 培養細胞株での強制発現実験: (1)で構築した4種類のハプロタイプを持つヒト*PANK4* ミニジーンコンストラクトからミニジーン部分を発現ベクターに移し替えた。次に、真核細胞および原核細胞で発現させるためにはプロモーター配列が必要であるため、Kozak/SD配列を開始コドンの直前に挿入し、それを大腸菌でクローニングした。精製後の4種類のコンストラクトは、FuGENE HD(プロメガ社)を用いて、サブコンフルエント下のARPE-19細胞に導入し、24時間培養した。培養を終了した細胞は、化学固定の後、通常の免疫細胞蛍光染色を行った。カウンター染色として、DAPIによる核染を実施した。染色過程を終えた細胞は水溶性封入剤で封入され、蛍光顕微鏡にて観察した。

(3) 遺伝子改変動物の作製: [1] *Pank4*-ノックアウト(KO)ラットの作製. 感受性系統のラット受精卵に対して、CRISPR/Cas9システムによる非同源性末端結合(NHEJ)を介して挿入/欠失(Indel)の導入をラット子宮内で行うGenome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery (GONAD)法を実施した。これにより、エキソン2に1塩基挿入されてフレームシフトが発生し、終止コドンが発生した個体(N<sub>0</sub>)が得られた。このN<sub>0</sub>を起点として交配を繰り返し、*Pank4*-KOアレルがホモ化できた個体を取得した。

[2] *Pank4*-正常化ラットの作製. 耐性系統のラットの*Pank4*遺伝子は、最終のエキソン19内に4塩基-5塩基置換変異が存在していた。そこで、耐性系統のラット受精卵に対して、single-stranded OligoDeoxyNucleotide (ssODN)を使用したCRISPR/Cas9システムによる相同組換え修復(HDR)を介して目的の塩基配列の置換による導入をラット子宮内で行うGONAD法を実施した。これにより、エキソン19における4塩基-5塩基置換変異が修復されたアレルを持つ個体(N'<sub>0</sub>)

が得られた。この N° を起点として交配を繰り返し、正常化した *Pank4*-アレルがホモ化できた個体を取得した。

(4) 免疫学的解析：培養細胞および動物の臓器からタンパク質画分を抽出し、SDS-PAGE を行い、ゲル内で分離したタンパク質バンドをセミドライ式のブロットング装置で PVDF 膜上に転写した。その後、特異抗体を用いた免疫染色を実施し、抗体と特異的に結合したタンパク質バンドを化学発光法により検出した。

(5) 光照射実験と表現型解析：ラットは、朝 7 時から夜 7 時までが明環境である明暗サイクル下にて飼育した。全個体は 10 lux 以下の薄暗いケージ内で飼育した。光照射は 10 週齢以降に実施した。予め、29 時間の暗順応を行い、その後、夜 12 時より 3 時間、照度 3000 lux の白色蛍光灯の光を照射した。光照射終了後は通常の光環境下に戻した。光照射終了後、2 週間以上経過した個体は、イソフルランの過量吸入により屠殺し、定法により矢状断且つ乳頭部を含む眼球の凍結切片を作製し、ヘマトキシリン-エオシン染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

(6) AMD 症例-対照研究：聖隷浜松病院・眼科にて、AMD 患者と対照者の抹消血液献体を収集した。本研究の趣旨を詳細に説明し、インフォームドコンセントが得られた場合のみを対象とした。

抽出、精製したゲノム DNA を用いて、*PANK4* などの遺伝子について DNA シーケンス解析を実施し、各症例における多型を解析した。

#### 4. 研究成果

単離した *PANK4* cDNA は、クローニングベクターに挿入した。そして、DNA シーケンス解析により、全 *PANK4* cDNA 配列が正しく挿入されていることを確認した。今回用いた cDNA ライブラリーは白人に由来していたこともあり、日本人とは異なる SNP が存在していたため、KOD Mutagenesis kit で多型を修正する必要があり修正した。その cDNA のハプロタイプは C-G であった。この C-G ハプロタイプを起点として、KOD Mutagenesis kit で 1 塩基ずつ塩基を変更し、4 種類のハプロタイプ(C-G, C-A, T-G, T-A)を揃えることができた。尚、C-G 以外のハプロタイプを持つ *PANK4* cDNA は cDNA ライブラリーには存在することは確認したが、C-G 以外は単離できなかった。また、これらのマウスゲノムへの導入による遺伝子改変マウスの作製は、現在中断している。

今回の cDNA が正しいタンパク質を発現することを確認するため、cDNA 部分を発現ベクターに移し、開始コドン直前に Kozak 配列を挿入した。その発現用コンストラクトをヒト由来 ARPE-19 株細胞に導入し、強制発現させ、特異抗体を用いた免疫細胞蛍光染色を実施したところ、全ハプロタイプの *PANK4* タンパク質が培養細胞の細胞質で発現していることが確認できた。

感受性系統ラット由来の *Pank4*-KO ラットと耐性系統ラット由来の *Pank4* 正常化ラットを作製した。*Pank4*-KO ラットでの眼などの臓器・組織におけるタンパク質発現をイムノブロット解析により調べ、*PANK4* タンパク質が発現していないことを確認した。一方、*Pank4* 非発現だった耐性系統ラットから作製した *Pank4*-正常化ラットでは、眼および他の臓器・組織での *PANK4* タンパク質(約 87 kDa)のバンドが検出され、*Pank4* 遺伝子の正常化が確認できたと同時に、最終エクソンにおける 4 塩基-5 塩基置換変異が *PANK4* タンパク質の非発現の原因であることが明らかとなった。

*Pank4*-正常化ラットに対して光照射実験を実施したところ、網膜外層の網膜変性が認められた。その変性の程度は、感受性系統と同様であった。このことから、網膜光障害感受性の原因遺伝子が *Pank4* 遺伝子であることが確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Haque Muhammad Nazmul, Ohtsubo Masafumi, Nishina Sachiko, Nakao Shiro, Yoshida Kazue, Hosono Katsuhiro, Kurata Kentaro, Ohishi Kentaro, Fukami Maki, Sato Miho, Hotta Yoshihiro, Azuma Noriyuki, Minoshima Shinsei	4. 巻 66
2. 論文標題 Analysis of IKBKG/NEMO gene in five Japanese cases of incontinentia pigmenti with retinopathy: fine genomic assay of a rare male case with mosaicism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 205 ~ 214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-00836-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muhammad Nazmul Haque, et al.	4. 巻 5
2. 論文標題 A Japanese Family With Cone-Rod Dystrophy of Delayed Onset Caused by a Compound Heterozygous Combination of Novel CDHR1 Frameshift and Known Missense Variants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-019-0048-8	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 -

1. 著者名 Ohishi Kentaro, Hosono Katsuhiro, Obana Akira, Noda Akio, Hiramitsu Tadahisa, Hotta Yoshihiro, Minoshima Shinsei	4. 巻 210
2. 論文標題 Identification of susceptibility loci for light-induced visual impairment in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 108688 ~ 108688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2021.108688	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大石健太郎, 大坪正史, 青戸一司, 尾花明, 細野克博, 上野真治, 才津浩智, 寺崎浩子, 平光忠久, 堀田喜裕, 蓑島伸生
2. 発表標題 ラット網膜光障害感受性遺伝子の同定と発現解析（学術展示優秀賞受賞記念講演）
3. 学会等名 第73回日本臨床眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石健太郎, 大坪正史, 青戸一司, 才津浩智, 尾花明, 堀田喜裕, 蓑島伸生
2. 発表標題 ラット網膜光障害感受性系統差の原因遺伝子の同定と発現解析
3. 学会等名 臨床遺伝2019 in Sapporo (第26下位日本遺伝子診療学会大会 第43回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 合同学術集会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石健太郎, 大坪正史, 青戸一司, 尾花明, 細野克博, 才津浩智, 平光忠久, 堀田喜裕, 蓑島伸生
2. 発表標題 ラット網膜光障害感受性系統差の原因遺伝子の同定: 加齢黄斑変性の発症機序解明を目指して
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石健太郎, 大坪正史, 青戸一司, 尾花明, 細野克博, 上野真治, 才津浩智, 寺崎浩子, 平光忠久, 堀田喜裕, 蓑島伸生
2. 発表標題 加齢黄斑変性の新規関連遺伝子の同定: 光障害動物実験モデルの活用
3. 学会等名 第66回日本臨床視覚電気生理学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ハック ムハンマド ナズムール, 倉田健太郎, 細野克博, 大坪正史, 大石健太郎, 佐藤美保, 蓑島伸生, 堀田喜裕
2. 発表標題 CDHR1遺伝子に新規変異を認めた日本人錐体杆体ジストロフィー成人発症兄妹例
3. 学会等名 第72回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ハック・ナズムール, 大坪正史, 細野克博, 倉田健太郎, 大石健太郎, 佐藤美保, 蓑島伸生, 堀田喜裕
2. 発表標題 日本人錐体桿体ジストロフィー家系から検出された新規変異と文献情報を併用した遺伝子型 - 表現型関連解析
3. 学会等名 第25回日本遺伝子診療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石健太郎, 大坪正史, 青戸一司, 尾花明, 細野克博, 上野真治, 才津浩智, 寺崎浩子, 平光忠久, 堀田喜裕, 蓑島伸生
2. 発表標題 ラット網膜光障害感受性遺伝子の同定と発現解析
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ハック ムハンマド ナズムール, 大坪正史, 仁科幸子, 中尾志郎, 細野克博, 倉田健太郎, 大石健太郎, 佐藤美保, 堀田喜裕, 蓑島伸生, 東範行
2. 発表標題 Fine analysis of IKBKG in a Japanese boy and 3 girls with incontinentia pigmenti
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019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 分担 者	大坪 正史  (OHTSUBO Masafumi)  (10327653)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教   (13802)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	尾花 明  (OBANA Akira)  (40194625)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・客員教授   (13802)	
研究分担者	堀田 喜裕  (HOTTA Yoshihiro)  (90173608)	浜松医科大学・医学部・教授   (13802)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関