

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09432

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いたLRRTM4の変異による優性黄斑変性の疾患機序解明

研究課題名(英文) in vivo and in vitro analysis of LRRTM4 mutation associated with dominant-inherited macular degeneration.

研究代表者

岡本 晶子(須賀)(Okamoto, Akiko)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・分子細胞生物学研究部・研究員

研究者番号：70450400

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)：遺伝性網膜疾患の一つである黄斑ジストロフィーを顕性で示す家系から全エクソーム解析により同定されたLRRTM4遺伝子の変異の有害性を検討した。患者と同一の変異をCRISPR/Cas9により導入したLRRTM4変異マウスの解析を行ったが、ヒト患者で見られたような網膜変性と双極細胞の反応低下は確認できなかった。他の遺伝子変異の影響を想定して全ゲノム解析を行った結果、別の遺伝子(X)の構造多型が患者に共通して検出された。遺伝子Xを欠損したマウスは網膜変性と大脳皮質の発生異常を示すことから、本疾患との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

症状と家系情報から遺伝性疾患が疑われるにもかかわらず既知遺伝子変異が検出されない患者に対して、全エクソーム解析および全ゲノム解析をすることで疾患と関連する新規原因遺伝子候補を絞り込むことができた。患者のゲノム情報およびバリエーション頻度と有害度予測により可能性の高い疾患原因と予想された変異であっても動物モデル等で患者症状を反映する表現型が得られない場合、生物種間の差だけでなくゲノム解析の方法に依存して検出できなかった変異が影響している可能性が示唆された。ゲノム解析で示される疾患原因変異の適切な解釈には実験系による検討が重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined the pathogenic effect of LRRTM4 p.C538Y variant which was identified as a candidate causal mutation for autosomal dominant macular dystrophy. Mutant mouse with Lrrtm4 p.C538Y missense mutation was tested. While the patients showed severe macular degeneration and loss of ON-bipolar cell responses, the mutant mice did not show significant differences in the retinal thickness and bipolar cell responses from the wild type littermates up to one year. To examine the possible effect of additional genetic variant(s), we performed whole-genome sequencing of the three patients in a family. From more than 25,000 variants, we selected patient-specific variants that located inside gene(s), and found a tandem duplication of several exons in another gene (gene X). Previous reports showed retinal degeneration in mice with conditional gene X depletion, which suggested possible effect of gene X structural variant on macular degeneration.

研究分野：遺伝性網膜変性疾患

キーワード：遺伝性疾患 全エクソーム解析 全ゲノム解析 変異 機能解析 疾患モデル動物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

黄斑ジストロフィーはわが国の主要な失明原因である遺伝性網膜疾患のひとつである。黄斑ジストロフィーは障害される視細胞のタイプや原因遺伝子によってスターガルト病、ベスト病、錐体杆体ジストロフィーなどの病型に分類される。しかし、黄斑ジストロフィー患者の遺伝学的解析を行っても既知の原因遺伝子に変異が見つからないことも多く、新規原因遺伝子の同定とエクソン外変異の解析が重要と考えられる。我々の研究室では3世代にわたって顕著な網膜変性を示す原因遺伝子不明の顕性黄斑ジストロフィーの家系について、全エクソーム解析により *LRRTM4* 遺伝子の p. C538Y バリエントを新規疾患原因候補と同定した。本バリエントは一般日本人でのバリエント頻度情報及び世界的な健常人でのバリエント頻度データベースである ExAc では検出されず、2つの有害度予測ソフト (SIFT, PolyPhen2) でアミノ酸置換がタンパク質機能に影響しうると予想された。また本家系の患者 (4人) と非罹患者 (4人) の間で分離された。LRRTM ファミリーのタンパク質は神経細胞のシナプス形成に関与しており、LRRTM4 p. C538Y は本家系の症状を説明しうる変異と考えられた。一方で、*LRRTM4* にはスプライシングの調節により exon1-exon3 から翻訳される short isoform (LRRTM4-S) と exon1-exon4 から翻訳される long isoform (LRRTM4-L) がある。アミノ酸置換が見られた 538 番目のシステインは LRRTM4-L 特異的部位に存在する。報告されている LRRTM ファミリータンパクの機能は short isoform に注目しており、LRRTM4-L の機能は報告されていなかった。全エクソーム解析で絞り込まれた変異が網膜に有害かどうかを検証するためには、分子生物学的実験及び *Lrrtm4* 変異マウスで網膜の変性が見られるかどうかの検討が重要と考えられた。

2. 研究の目的

顕性遺伝を示す黄斑ジストロフィー患者家系から同定した LRRTM4 p. C538Y 変異について、タンパク質機能への影響と網膜組織への影響を確認し、網膜変性の分子機序を明らかにする。マウス網膜の組織染色で LRRTM4 タンパク質は視細胞と双極細胞のリボンシナプスに局在することが示されており、*Lrrtm4* p. C538Y 変異マウスを用いてリボンシナプスへの影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) LRRTM4 野生型と C538Y 変異型のコンストラクトを作成し、培養細胞に強制発現させて発現量と局在に差があるかどうかをそれぞれウェスタンブロッティングと細胞免疫染色によって検討した。また脱グリコシル化処理により翻訳後修飾の有無を確認した。

(2) 網膜電図 (ERG) と光干渉断層計 (OCT) を用いた C538Y KI マウス網膜の機能と形態の継続的観察

CRISPR/Cas9 を用いて作成した *Lrrtm4* p. C538Y マウスを生後 4 週齢、半年齢、1 年齢について ERG と網膜断層像を取得し、同腹の野生型マウスと比較した。

(3) 免疫組織染色を用いた外網状層と視細胞の観察

LRRTM4 タンパク質はマウス網膜では外網状層にある視細胞と双極細胞のシナプスに局在していたので、野生型マウスと *Lrrtm4* p. C538Y マウスの間でシナプスマーカーの染色に差があるかどうかを免疫組織染色で確認した。

(4) LRRTM4 long isoform 特異的な抗体の作成

LRRTM4-L に特異的な領域に含まれるペプチド配列を抗原とし、ウサギ 2 羽に免疫して血清を得た。ウェスタンブロッティングにより、ヒト LRRTM4 long isoform を発現させた細胞ライセートに対し LRRTM4-L を特異的に認識した血清を濃縮して抗体を作成した。

(5) 全ゲノム配列解析

研究過程で全エクソーム解析では検出できない遺伝子の構造変異やイントロン内の変異の関与が考えられたため、患者の同意を得て「難病のゲノム医療推進に向けた全ゲノム解析基盤に関する研究開発」において全ゲノム配列解析を行った。得られた配列情報から一塩基置換、短い欠失挿入、構造変異を検出し、一般日本人での頻度が極めて低く疾患の遺伝形式に沿って家系内で遺伝している変異を選別した。

4. 研究成果

(1) LRRTM4 野生型タンパク質と C538Y 変異体の比較

LRRTM4 p. C538Y 変異が LRRTM4-L タンパク質発現量に影響するかどうか検討するために、HA-タグを付加した LRRTM4-L 野生型、LRRTM4-L (C538Y)、LRRTM4-S を強制発現させた Cos-7 細胞からライセートを回収し、ウェスタンブロッティングによりタンパク質発現量を比較した。野生型、変異体ともに 75kDa と 68kDa のタンパク質が確認されたが、75kDa の産物については C538Y 変異

体の方が有意にタンパク質量が少なかった (図 1A 右グラフ)。LRRTM4 は細胞外領域が N-グリコシル化されると予想されたため、細胞ライセートを脱グリコシル化酵素で処理したところ、検出される LRRTM4-L、LRRTM4-S タンパク質の分子量が小さくなった。しかし分子量および脱グリコシル化後のタンパク質発現量は LRRTM4-L 野生型と C538Y 変異体の間に差はなかった (図 1B)。

さらに LRRTM4 コンストラクトを強制発現させた Cos-7 細胞の細胞免疫染色を行い、細胞膜、ゴルジ体への細胞内局在を検討した。LRRTM4-L は LRRTM4-S に比べて弱い細胞膜への局在を示したが、野生型と C538Y 変異体の間で顕著な差はなかった。ウサギ免疫により、in vitro で LRRTM4-L 野生型と C538Y 変異体を認識し、LRRTM4-S は認識しない LRRTM4-L 特異的抗体を得た (図 1C)。しかし野生型と変異体の間で差は見られなかった。

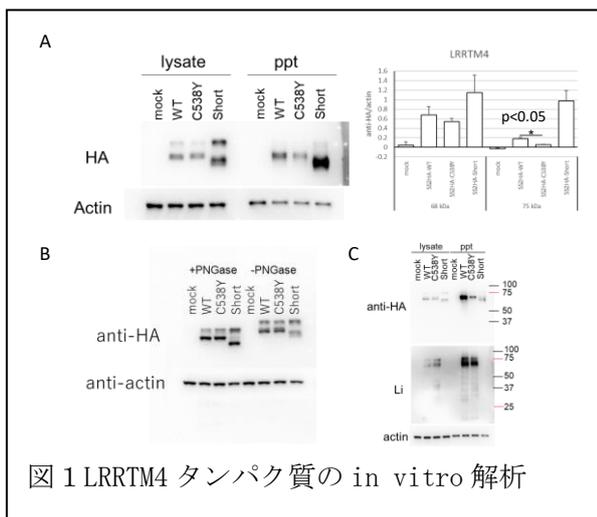


図 1 LRRTM4 タンパク質の in vitro 解析

(2) LRRTM4 C538Y ノックインマウスの表現型解析。

研究開始時にマウス *Lrrtm4* 遺伝子の 538 番目のシステインをチロシンに置き換えたノックインマウス (C538Y) が CRISPR/Cas9 によって作成されていたため、本マウスにおいて LRRTM4 C538Y 変異が原因と考えられた黄斑ジストロフィー患者で見られた網膜の顕著な変性と ON 型双極細胞の反応の低下が見られるかどうかを検討した。生後 8 週齢、半年齢、1 年齢で眼底像と OCT による網膜断層像を撮影したが、網膜層の厚さに野生型と C538Y ヘテロマウス、C538Y ホモマウスの間に顕著な差はなく、変性は確認できなかった (図 2A)。また生後半年齢のマウスで ERG を測定したが、野生型マウスと C538Y ヘテロマウスの間に差は見られなかった (図 2B)。

通常の飼育環境では変性が起こらない可能性を考え、LED 照明を 10 分~2 時間当てて一週間後に OCT による網膜層構造の変化を確認したところ、長時間照明した群では視細胞層の顕著な変性が見られたが、変性が見られたマウスの数・変性の程度に野生型と C538Y ヘテロマウスの間で差は見られなかった。

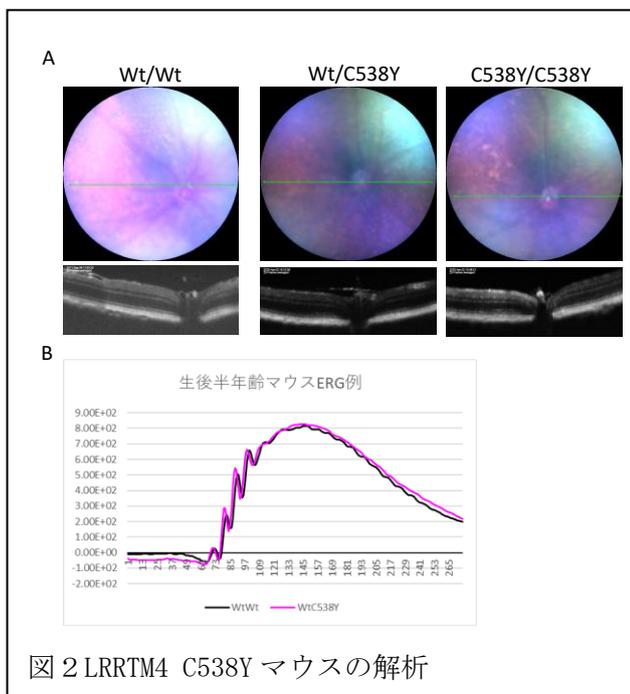


図 2 LRRTM4 C538Y マウスの解析

(3) 全ゲノム配列解析による遺伝子 X の構造変異の検出

以上の結果から、LRRTM4 p. C538Y 変異だけでは患者で見られた顕著な黄斑変性の原因とならない可能性が考えられた。全エクソーム解析では検出できないエクソン外の変異やゲノムの構造変異も含めて検討し直すために、患者 3 名の同意を得て全ゲノム解析を行った。得られた約 25,000 バリエント (一塩基置換、インデル、構造多型) から顕性遺伝と合致する遺伝形式を示す遺伝子領域内の希少バリエントを絞り込んだ結果、遺伝子 X の中に複数のエクソンにまたがる約 25kb のタンデム重複を検出した。qPCR の結果重複領域内のエクソンは倍化しており、ブレイクポイントを挟んだ PCR 産物の配列確認により倍化した領域は並んでいることが確認できた。遺伝子 X をノックアウトしたマウスは網膜変性と大脳皮質の発生異常を示すことが報告されている。遺伝子 X は神経組織以外でも発現しているため、今後は患者検体での遺伝子発現量を非罹患者と比較し、構造変異による影響を確認する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Pan Yang, Iejima Daisuke, Nakayama Mao, Suga Akiko, Noda Toru, Kaur Inderjeet, Das Taraprasad, Chakrabarti Subhabrata, Guymier Robyn H., DeAngelis Margaret M., Yamamoto Megumi, Baird Paul N., Iwata Takeshi	4. 巻 296
2. 論文標題 Binding of Gtf2i- / transcription factors to the ARMS2 gene leads to increased circulating HTRA1 in AMD patients and in?vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100456 ~ 100456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100456	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
1. 著者名 Li H, Yuan S, Minegishi Y, Suga A, Yoshitake K, Sheng X, Ye J, Smith S, Bunkoczi G, Yamamoto M, Iwata T	4. 巻 29
2. 論文標題 Novel mutations in malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase provoke autosomal recessive optic neuropathy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 444-458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddz311	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
1. 著者名 Yuichi Kawamura, Akiko Suga, Takuro Fujimaki, Kazutoshi Yoshitake, Kazushige Tsunoda, Akira Murakami, Takeshi Iwata	4. 巻 63
2. 論文標題 LRRTM4-C538Y novel gene mutation is associated with hereditary macular degeneration with novel dysfunction of ON-type bipolar cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 893-900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-018-0465-4	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 Suga Akiko, Yoshitake Kazutoshi, Minematsu Naoko, et al.	4. 巻 43
2. 論文標題 Genetic characterization of 1210 Japanese pedigrees with inherited retinal diseases by whole exome sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Mutation	6. 最初と最後の頁 2251 ~ 2264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/humu.24492	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 須賀 晶子
2. 発表標題 劣性遺伝性視神経萎縮症の新規原因遺伝子MCAT変異の同定と機能解析
3. 学会等名 第68回日本臨床視覚電気生理学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akiko Suga
2. 発表標題 Genome-edited mouse model with Lrrtm4 mutation found in human macular dystrophy patients, showed light-induced photoreceptor degeneration.
3. 学会等名 ARVO 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須賀晶子
2. 発表標題 家族性視神経萎縮症の新規原因遺伝子同定と機能解析
3. 学会等名 第12回Retina Research Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須賀晶子
2. 発表標題 劣性遺伝性視神経萎縮症の新規原因遺伝子同定と機能解析
3. 学会等名 第24回眼科分子生物学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Suga, Yuichi Kawamura, Kazutoshi Yoshitake, Kazushige Tsunoda, Akira Murakami, Taheshi Iwata
2. 発表標題 Novel mutation in LRRTM4 is associated with dominantly inherited macular dystrophy with reduced ON-bipolar cell response.
3. 学会等名 ARVO 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiko Suga
2. 発表標題 The whole exome and genome analysis for inherited retinal diseases in Japanese population
3. 学会等名 ISER 2023 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Akiko Suga and Takeshi Iwata (Edited by Jann Hau and Steven J. Schapiro)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 CRC Press, Taylor & Francis Group	5. 総ページ数 1016
3. 書名 Handbook of Laboratory Animal Science: Essential Principles and Practices	

1. 著者名 須賀晶子・吉武和敏・岩田岳	4. 発行年 2018年
2. 出版社 メディカルドゥ	5. 総ページ数 228
3. 書名 臨床応用に向けた疾患シーケンス解析(遺伝子医学M00K34号)	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------