

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06473

研究課題名(和文) ラットモデルを用いたヒト小眼球症の不均一性に作用する遺伝的要因の解明

研究課題名(英文) Identification of genetic factors act on heterogeneous pathology in microphthalmia using rat model

研究代表者

和田 健太 (Wada, Kenta)

東京農業大学・生物産業学部・教授

研究者番号：20508113

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)：本研究は、遺伝的背景および母体効果によってヒト小眼球症の不均一性を再現するラット系統、NAK/Nokhの眼球発生異常に関連する遺伝子群の同定と、その発症機序を明らかにすることを目的とした。本研究は第一に、NAKに検出されたCyp4v3の欠失変異がその転写産物を減少させ、そのホモ接合体は左右の無眼球症に有意に関連することを明らかにした。第二に、NAKの眼球発生不全は神経網膜の分化・増殖不全に起因することを明らかにした。一方、Cyp4v3ゲノム編集マウスは正常な眼球発生を示した。これは、Cyp4v3の他にも発症を決定づける因子が存在すること、あるいはラット・マウス間の種差によることと推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、その発症メカニズムが不明である小眼球症における病態の不均一性を再現するラット系統を対象としている。本研究に成果は、ヒト小眼球症の原因遺伝子、発症メカニズム、ならびに病態の不均一性を引き起こす遺伝的要因の解明に貢献する情報となることが予測される。また、眼球発生のプロセスは未だ不明な点も残している。従って、NAKにおいて観察された神経網膜の消失は、そのメカニズムと、水晶体発生との関連を明らかにするためのモデルになることも期待できる。

研究成果の概要(英文)：NAK/Nokh (NAK) rats exhibit microphthalmia with heterogeneous pathology like humans and we identified that it was caused by genetic background and maternal effects. We revealed that a large deletion mutation of Cyp4v3 gene leads to reduction of its transcript and its homozygous mutation was significantly correlated to development of anophthalmia. In addition, we suggested that hypoplasia of the eyes in NAK rats was caused by loss of neural retina but not retinal pigment epithelium during eye development through several marker study. Finally, we generated genome-editing mice targeting Cyp4v3 gene and investigated its eye phenotypes. Unexpectedly, Cyp4v3 genome-editing mice did not show any defects of eye development. These results suggested that microphthalmia of NAK rats was influenced by other factor besides mutation of Cyp4v3. Alternatively, we predicted that normal eye development of Cyp4v3 genome-editing mice might be caused by species differences between mouse and rat.

研究分野：実験動物学

キーワード：ラット 小眼球症 眼球発生

1. 研究開始当初の背景

無眼球症および無水晶体症を含む小眼球症は、ヒト集団において約 10,000 人に一人の割合で発症する極めて重篤な先天性眼球疾患である (Verma & Fitzpatrick, *Orphanet. J. Rare. Dis.* 2007)。小眼球症は、しばしばクリアなメンデル遺伝による伝達を示さないこと、同一家系内に多様な病態が存在すること、また左右の眼球間に異なる病態が示されることも知られている。これらの表現型の不均一性は、小眼球症発症の直接的原因となる主働遺伝子に加えて、複数の遺伝子多型による修飾効果に高い感受性を有することが推測されるが、これまでこのような表現型の不均一性を引き起こす遺伝的要因が実証された報告例はない。従って、本疾患の発症メカニズム理解するためには、小眼球症を発症し、さらに表現型の不均一性を再現可能なモデル動物の存在が重要となる。

我々は、ヒト小眼球症の病態の不均一性を再現する近交系ラット、Nodai aphakia (NAK/Nokh) を樹立した。NAK と他の系統間の F2 および戻し交配個体群は、両眼性および片眼性の無眼球および小眼球など、ヒトの患者にみられるような多様な表現型を示した。これまで我々は、NAK の小眼球症の原因が第 16 番染色体、右眼は特に第 2 番染色体にあり、NAK の左右の眼球表現型はそれぞれ異なる遺伝的変異によって制御・修飾されることを示唆し、次世代シーケンスにより、第 16 番染色体の *Cyp4v3* に大規模欠失 (*Cyp4v3^{nak}*) と、複数の NAK 特異的な突然変異を同定した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、第一に *Cyp4v3^{nak}* が NAK の小眼球症の原因であることを証明するために、そのアレルの効果を評価するとともに、それを導入したゲノム編集マウスを作製し、その表現型を明らかにすることとした。第二の目的は、NAK の眼球消失プロセスを理解するとともに、それに *Cyp4v3^{nak}* がどのように作用するかを解明することとした。

3. 研究の方法

(1) *Cyp4v3^{nak}* の効果

Cyp4v3^{nak} の転写産物およびタンパク質への影響は、それぞれ定量的 RT-PCR およびウェスタンブロット/免疫組織染色により実施し、無眼球症の発症へのアレル効果は、NAK と BN 系統との戻し交配個体 (N2 ; n=213) を対象とした遺伝子型-表現型の相関によって評価した。

(2) NAK の眼球消失メカニズム

NAK ラットの眼球消失は、胎齢 12.5 日 (E12.5) および E14.5 の眼球組織において、神経網膜、網膜色素上皮、および水晶体マーカータンパク質の免疫組織染色により、そのプロセスを調査した。また、細胞増殖は BrdU 染色により評価した。

(3) *Cyp4v3* ゲノム編集マウスの表現型解析

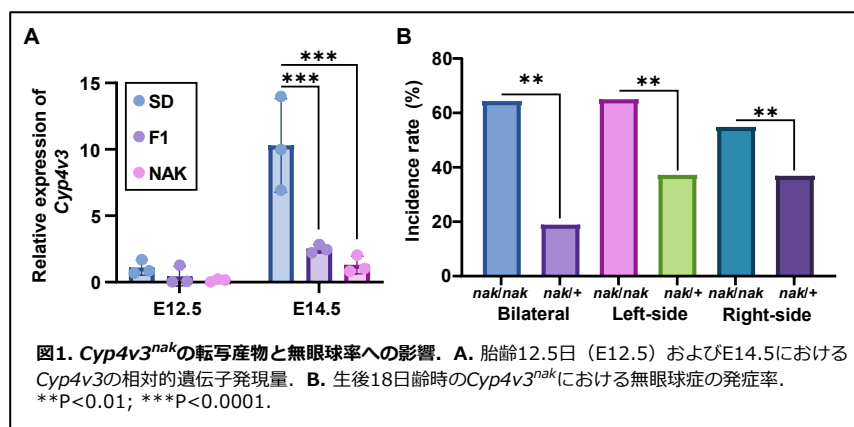
作製した *Cyp4v3* ゲノム編集マウスの系統樹立は、ジェノタイプングにより選抜したヘテロ個体の交配によって作製し、*Cyp4v3* の編集をホモ接合体で有する個体を得た。*Cyp4v3* ゲノム編集マウスの表現型は、E14.5 のパラフィン包埋組織切片のヘマトキシレン・エオシン染色により行った。

4. 研究成果

(1) *Cyp4v3^{nak}* の効果

NAK は *Cyp4v3* の末端部であるエクソン 8-11 の約 4.3 kb を欠失する。そこで *Cyp4v3^{nak}* の転写産物への影響を明らかにするため、定量的 RT-PCR により野生型 (SD)、(SD×NAK)F1 (F1)、および NAK の *Cyp4v3* 転写産物量を相対比較した。その結果、SD に比べて F1 および NAK の転写産物量は有意に減少した (P<0.001)

(図 1A)。以上の結果は、*Cyp4v3^{nak}* が nonsense-mediated mRNA decay (NMD) を引き起こし、NAK の *Cyp4v3* は欠失することを示唆した。一方、CYP4V2 のウェスタンブロットおよび免疫組織染色は、3 種類の抗体を使用して



実施したものの、その特異性を確認できなかった。

次に、N2 を対象として *Cyp4v3^{nak}* のジェノタイプと表現型の相関を調査した。その結果、両眼の無眼球率は *Cyp4v3* のジェノタイプが *nak/nak* (*nak* ホモ) および *nak/+* (*nak* ヘテロ) において、それぞれ 64.3% および 18.8%、左眼は 64.9% および 37.1%、右眼は 54.7% および 36.7% であった (図 1B)。従って、*nak* ホモは *nak* ヘテロに比べて有意に無眼球率が増加した ($P < 0.01$)。この結果は、*Cyp4v3^{nak}* が NAK ラットにおける無眼球症の発症に強く影響することを示唆した。

(2) NAK の眼球消失メカニズム

我々は以前に、NAK の神経網膜における *VSX2* および *Rax* の発現が減少することを報告している。本研究はこれらに加えて、網膜色素上皮マーカー (*OTX2*) および神経網膜マーカー (*SOX2*) における免疫組織染色を行った。*OTX2* は E12.5 の NAK において頭側の神経網膜および網膜色素上皮に検出された後、E14.5 における NAK の網膜全体に検出された (図 2A)。*SOX2* は、NAK の水晶体胞に検出されたものの、その神経網膜における発現は欠失した (図 2B)。この結果は、NAK の網膜が網膜色素上皮のみで構成され、神経網膜を欠失することを示唆した。*BrdU* 染色は、NAK の網膜組織を構成する細胞の増殖が野生型と比べて大きく減少することを明らかにした (図 2C)。また、本研究は、NAK において水晶体上皮細胞マーカーである *FOXE3* が野生型と同様に水晶体胞に検出されたものの、水晶体線維細胞の分化は誘導されないことを明らかにした。以上の結果は、NAK の無眼球が神経網膜の欠失と、それに起因する水晶体線維細胞の分化不全により引き起こされることを示唆した。

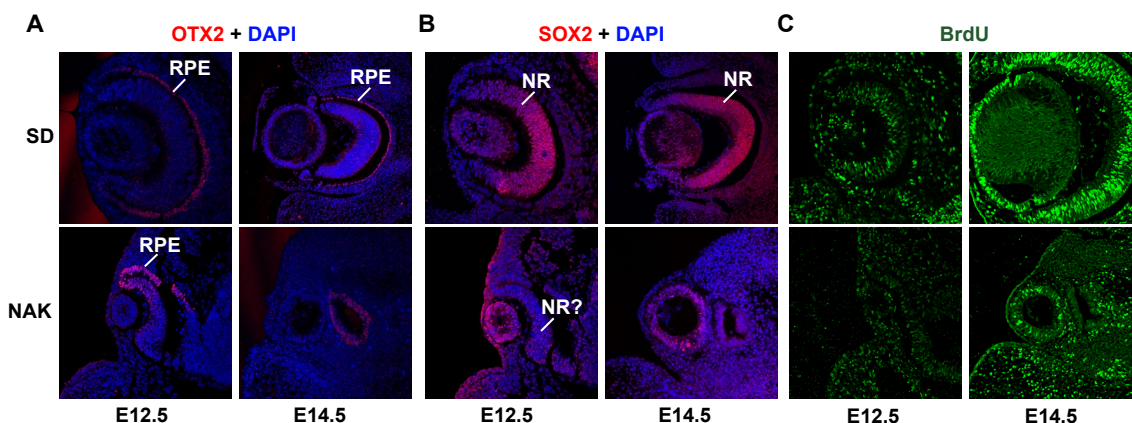


図2. NAKの神経網膜細胞の分化・増殖不全。胎齢12.5日 (E12.5) およびE14.5におけるA. *OTX2*, B. *SOX2*, および C. *BrdU*染色。RPE: 網膜色素上皮; NR: 神経網膜。

(3) *Cyp4v3* ゲノム編集マウスの表現型解析

本研究は *Cyp4v3* の欠失が NAK の神経網膜細胞の分化・増殖不全に関係すると推測してきた。そこで、*Cyp4v3* ゲノム編集マウスの E14.5 における病理切片を観察した結果、予測に反して正常な神経網膜、網膜色素上皮、および水晶体が確認された (図 3A)。また、成体における眼球組織は野生型と同様であった (図 3B)。従って、*Cyp4v3* を欠失したマウスは、NAK の表現型を再現しなかった。これは、① *Cyp4v3* は眼球発生に寄与しない、② *Cyp4v3* の欠失だけでは眼球発生に影響しない、③ ラット-マウス間の種差、のいずれかに起因すると推測された。

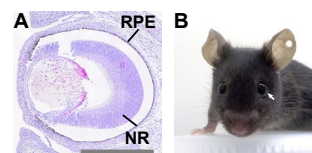


図3. *Cyp4v3*ゲノム編集マウスの眼球表現型。A. 胎齢14.5日における*Cyp4v3*ゲノム編集マウスの眼球組織像, B. 正常な*Cyp4v3*ゲノム編集マウスの眼球 (矢印)。RPE: 網膜色素上皮; NR: 神経網膜。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 草野奈央・鴻巣史織・許 亜美・下井 岳・亀山祐一・吉川欣亮・和田健太
2. 発表標題 NAK: 遺伝的背景および母体効果に修飾される自然発症無眼球症ラット
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 草野奈央・許 亜美・鴻巣史織・吉川欣亮・和田健太
2. 発表標題 NAKラットにおける眼球発生不全のメカニズムとCyp4v3のnakアレル効果の推定
3. 学会等名 第17回北海道実験動物研究会総会・学術集会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田健太・古屋薫実・神永峻弥・村山リナコ・植村実季・吉川欣亮
2. 発表標題 NAK/Nokhラットの小眼球症に関する複数の遺伝子変異
3. 学会等名 第66回 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 草野奈央・許 亜美・鴻巣史織・原 菜摘・清水開斗・下井 岳・亀山祐一・吉川欣亮・和田健太
2. 発表標題 NAKラットの小眼球症は神経網膜の欠失に起因し、それは遺伝的背景および母体効果によって修飾される
3. 学会等名 第69回 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 草野奈央・吉川欣亮・和田健太
2. 発表標題 NAKラットの小眼球症を修飾する遺伝的背景および母体効果
3. 学会等名 第18回北海道実験動物研究会総会・学術集会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wada K, Kusano N, Munakata H, Okubo S, Otoyama K, Hashizume R, Kikkawa Y
2. 発表標題 NAK: a new spontaneous rat mutation of microphthalmia with phenotypic heterogeneity through the genetic background and maternal effects
3. 学会等名 36th International Mammalian Genome Conference (国際学会)
4. 発表年 2023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	吉川 欣亮 (Kikkawa Yoshiaki)	公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医学研究分野・ プロジェクトリーダー	
	(20280787)	(82609)	

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