

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700437

研究課題名(和文) Foxe3 下流活性化制御遺伝子を標的とした新規白内障モデルマウスの樹立と応用

研究課題名(英文) Establishment of novel cataractous mouse models generated by mutagenesis of FOXE3 downstream genes

研究代表者

和田 健太 (Wada, Kenta)

東京農業大学・生物産業学部・助教

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、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者が rct マウスの白内障発症原因遺伝子として同定した Foxe3 を標的として、その下流活性化制御因子の同定、ならびにそれら遺伝子に突然変異を有する新規白内障モデルマウスの樹立を目的とした。下流活性化制御因子の候補となった Fgfbp1、Capns2、Aim1 および Gsta2 の4種の遺伝子について理研 ENU based gene-driven mutagenesis による突然変異スクリーニングを行った結果、Fgfbp1 では2箇所、Capns2 で1箇所、および Aim1 で4箇所の変異を有する DNA を見出した。今後はこれら突然変異を有する個体を復元し、その表現型解析を行う。

研究成果の概要(英文)：The Foxe3 has a crucial role on lens development, since genetic mutations lead to ocular defects in both humans and mice. Recently, we have identified a deletion in a cis element of Foxe3 as a causative mutation in rct mice that show congenital cataract and microphthalmia. Moreover, the rct mutant showed lens-specific reduction of Foxe3 transcripts. The aims of this study is identification of genes regulated by FOXE3, and is establishment of novel cataractous mouse model which has mutation of these genes. We have obtained four candidate genes for FOXE3 downstream molecules by microarray and quantitative RT-PCR analysis. This study firstly screened mutant DNA using Riken ENU based gene-driven mutagenesis system. As result, two, one and four missense mutations were detected in Fgfbp1, Capns2 and Aim1, respectively. Generation of mice individuals which has mutation of these genes are in process, and phenotypic profiles of these mutant strains will be defined by our future study.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：モデルマウス 白内障 Foxe3

1. 研究開始当初の背景

白内障はヒト集団に極めて高頻度で出現する眼疾患であり、世界の盲目患者の約半数が白内障を発端とし、視力を失うことが報告されている (Asbell et al. *Lancet* 2005)。我国においても先天性および老年性を含めたヒト白内障は、約 34 万人の眼科疾患患者のうち約 10 万人を占める極めて発症率の高い疾患である (厚生労働省, 2005)。そのため白内障は、QOL 向上の面からも眼科領域において有効な治療法開発が望まれる重要な疾患の一つである。しかしながら、いまだにその発症メカニズムは十分に理解されておらず、その治療法は外科的手術のみに限定されている。特に先天性白内障では、外科的治療の難易度が高い上に、術後の継続的な治療を要すること、発症診断の遅れにより視覚の発達に重大な障害をもたらすことが大きな問題となっている。

最近、我々はヒト先天性白内障モデルマウス Rinsyoken cataract (*rct*) の白内障発症の原因となる突然変異をポジショナルクローニングによって同定し、その *rct* マウスの白内障発症は Forkhead box E3 (*Foxe3*) 遺伝子上流に存在するエンハンサー領域の 22-bp の欠失が原因であることを明らかにした (Wada et al. *Mamm. Genome* 2011)。また、この欠失を保持する *rct* マウスは野生型に比べて *Foxe3* の発現量が最大 8 倍以上の減少を示し、さらにそれは水晶体に限定されていた。このことから、申請者は *Foxe3* の上流に生じた 22-bp の欠失領域が *Foxe3* のエンハンサーエレメントとして機能し、その領域を欠失した *rct* マウスは *Foxe3* の発現量が減少することにより白内障を発症することと結論づけた。

Foxe3 は、角膜と水晶体前極の融合、すなわちヒト前眼部発育不全症 (Anterior segment dysgenesis: ASMD) 様の深刻な形態異常を示すモデルマウス *dyl* ミュータント (*Foxe3^{dyl}*) の原因遺伝子としてクローニングされ、また *Foxe3^{dyl}* と同様の表現型を示すノックアウトマウス (*Foxe3^{-/-}*) も作製されている (Blixt et al. *Genes & Dev.* 2000; Medina- Martinez et al. *Mol. Cell. Biol.* 2005)。これらマウス突然変異体の解析から、*Foxe3* は胎児期の眼球形成に重要な役割を果たしており、特に水晶体胞の閉鎖に強く作用することが明らかとなっている。

一方、Blixt et al. (2000) による *Foxe3^{dyl}* のポジショナルクローニングを足がかりに、ヒトにおいて *FOXE3* の突然変異が優性の ASMD および白内障の原因遺伝子として同定されて以来、多数の突然変異アレルが報告されている (Semina et al. *Hum. Mol. Genet.* 2001; Valleix et al. *Am. J. Hum. Genet.* 2006; Iseri et al. *Hum. Mutat.* 2009)。

ヒトにおいては *FOXE3* の突然変異部位や遺伝的背景の差異によって多様な眼球異常

を引き起こすことが報告されていることから、*FOXE3* が眼球形成時において重要な役割を持つと同時に、そのカスケードには正常な眼球形成および維持に關与する多数の遺伝子群の存在が予測される。

また、*Foxe3^{-/-}* の解析からいくつかの *Foxe3* 下流活性化制御遺伝子が同定されており、その一つ、水晶体の透明性維持に重要な *Dnase2b* は、水晶体線維細胞の脱核に關与することが明らかとなっている。我々の解析においても、*rct* マウスにおいて *Dnase2b* の発現量の有意な減少が認められており、*rct* マウスの水晶体核の局在変動を示し、*rct* マウスの水晶体混濁の原因の一つとなることが示唆された (Wada et al. *Mamm. Genome* 2011)。

しかしながら、2 種の *Foxe3* ミュータントマウスでは角膜と水晶体前極の形態異常が認められているのに対して、*rct* マウスでは角膜に異常が認められずヒト前極および皮質白内障に類似した白内障を発症し、極めて軽度の小眼球症を示す。このように、同一の遺伝子の突然変異であるにもかかわらず、その表現型に大きな差異が認められていることから、*Foxe3* の下流には眼球形成に重要な役割をもつ多数の下流活性化制御遺伝子が存在しているものと考えられる。

そこで我々は、*Foxe3* の下流活性化制御遺伝子の多くが潜在的な白内障発症原因遺伝子であると推測し、*Foxe3^{rct}* における DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、48 種類の発現変動遺伝子および 34 種類の発現消失遺伝子をスクリーニングし、そのうち特に白内障発症との關連が推測される *Fgfbp1*、*Cebpa*、*Ctnnb1*、*Capns2*、*Gsta2* および *Aim11* の 6 つの遺伝子を見出した。

2. 研究の目的

本研究はこれまで我々が *Foxe3^{rct}* マウスを基盤として蓄積したデータを最大限に生かし、網羅的遺伝子発現解析に基づき同定した *Foxe3* 下流活性化制御遺伝子群の詳細な発現解析によって、それらの眼球組織における発現変動のバリデーションを第 1 の目的とした。次に、それら遺伝子に突然変異をもつミュータントマウスを ENU 突然変異マウスライブラリーよりスクリーニングし、それらの眼球発生における機能の証明と、新規白内障モデルマウスの樹立を主要な目的とした。

3. 研究の方法

本研究では胎齢 14.5 日の眼球由来トータル RNA におけるマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析から、機能的に *Foxe3* の下流活性化制御遺伝子の有力な候補と考えられた遺伝子の定量的 RT-PCR を

行い、明確な発現量の減少が確認された *Fgfbp1*、*Capns2* および *Aim11* の3種の遺伝子について、理研 ENU-based gene-driven mutagenesis による変異スクリーニングを行った。

また上記に加え、マイクロアレイ解析において発現変動を示した多数の遺伝子群における定量的 RT-PCR を行い、さらなる候補遺伝子のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

マイクロアレイ解析によって候補となった *Cttnb1*、*Fgfbp1*、*Capns2*、*Aim11*、*Cebpa* および *Gsta2* の6種の遺伝子群について、定量的 RT-PCR 解析を行った結果、6種すべての遺伝子において有意な発現量の低下が認められた(図1)。

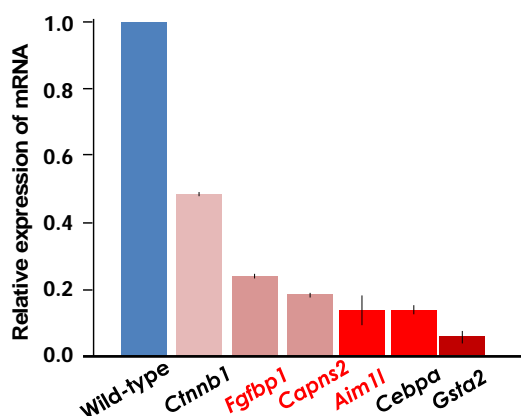


図1. FOXE3下流活性化制御因子の候補遺伝子における定量的RT-PCR.

このうち、水晶体繊維細胞の分化に機能する Fibroblast Growth Factor (FGF) との相互作用が推測される *Fgfbp1*、同様に水晶体繊維細胞におけるオルガラの消失に關するカルパインのスマールサブユニットである *Capns2*、および水晶体を構成する主要なタンパク質であるクリスタリンと同様のモチーフを有する *Aim11* を、特に白内障発症および眼球形成への關連が予測される分子として、理研 ENU-based gene-driven mutagenesis による変異スクリーニングを行った結果、*Fgfbp1* では2箇所 (Asn291Ile、Ser42Pro)、*Capns2* で1箇所 (Arg79Asp) および *Aim11* で4箇所 (Asp864Glu、Asp869Gly、Leu938Pro、Tyr974Cys) のミスセンス変異を有する DNA が見出された。これらアミノ酸置換について、SIFT

(http://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_seq_submit2.html) によりタンパク質機能への影響を調査した。その結果、FGFBP1 の Asn291Ile、AIM1L の Asp864Glu、Asp869Gly および Tyr974Cys については、有意にタンパク質の機能を変化させる可能性が高いアミノ酸置換であった。現在、これら4つのミスセンス変異を有する個体の復元を進めており、今後は、それら ENU 変異体の眼球における表現型解析により、これら2種の遺伝子が FOXE3

の下流のカスケードに属し、眼球発生において重要な役割を担うことを証明したい。

さらに、上記以外の発現変動遺伝子、計85種について定量的 RT-PCR 解析を行った結果、複数の反復実験において共通に明確な遺伝子発現量の減少を示す22種の遺伝子を同定した(図2)。特に、*Sbsn*、*Calm4*、*Krt25*、*Sdr16c5*、

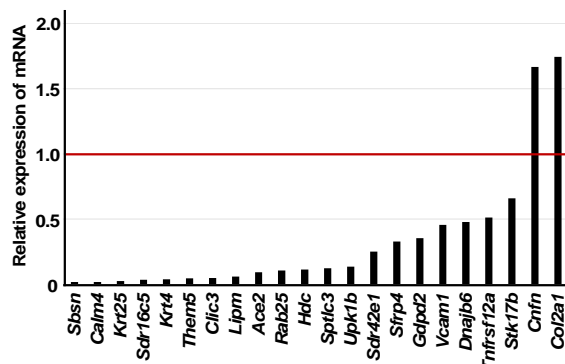


図2. 新たに明確な発現変動を示した遺伝子群

Krt4、*Them5*、*Clic3*、*Lipm*、*Ace2*、*Rab25*、*Hdc*、*Sptlc3* および *Upk1b* については、*rct* において劇的な発現量の減少を示しているため、*rct* マウスの眼球の表現型に關する有力な候補と考えられた。

現在のところ、これら遺伝子と白内障発症ならびに眼球形成との關連を示す報告はなく、水晶体の透明性および眼球形成への機能は不明であるものの、*Foxe3* の発現量の減少に伴ってその発現量を変動させる遺伝子であることから、今後はこれら遺伝子群について、ENU よりも迅速な突然変異個体の作成が可能と考えられる CRISPR/Cas9 システムなどを利用した突然変異体の作成を行う。

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)

[学会発表](計 7件)

奥本容子 他 *Foxe3^{rct}* マウスの白内障発症時期修飾因子 *Pde6b* の水晶体における発現とアレレル効果. 第36回日本分子生物学会年会. 2013年12月03日~2013年12月06日. 神戸国際会議場(神戸)

和田健太 他 *Foxe3^{rct}* マウスの白内障発症を修飾する遺伝子群の同定. 第60回日本実験動物学会総会. 2013年05月15日~2013年05月17日. つくば国際会議場(つくば)

Wada, K. et al. Gene expression profiling of the lens in *Foxe3*-deficient *rct* mice. The 26th International Mammalian Genome Conference. 2012年10月21日~2012年10月24日. The Tradewinds Resort, St. Pete Beach, Florida

高橋 剛 他. マウス *Foxe3* 突然変異体を用いた水晶体形成に關する遺伝子のスクリーニング. 第9回北海道実験動物研究

会学術集会．2012年07月14日～2012年07月14日．江別市酪農学園大学（江別）
和田健太，吉川欣亮．水晶体における
FOXO3 下流活性化制御因子の探索．シン
ポジウム3「水晶体の分化と白内障に関する
遺伝子の最新情報」第51回日本白内障
学会総会（招待講演）．2012年06月15日
～2012年06月17日．東京国際フォー
ム（東京）

和田健太 他 *Foxe3^{ret}* マウスの水晶体にお
ける遺伝子発現プロファイルの変化．第
59回日本実験動物学会総会．2012年05
月24日～2012年05月26日．別府国際コ
ンベンションセンター（大分）

斉藤潤一 他 *Foxe3^{ret}* マウスの白内障発症
時期修飾遺伝子の同定．第59回日本実験
動物学会総会．2012年05月24日～2012
年05月26日．別府国際コンベンションセ
ンター（大分）

6．研究組織

(1)研究代表者

和田 健太（WADA KENTA）
東京農業大学・生物産業学部・助教
研究者番号：20508113

(2)研究分担者

(3)連携研究者