

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890100

研究課題名(和文)近視マウスの網膜細胞種別発現プロファイリングとヒト遺伝子多型データとの相関

研究課題名(英文)Mouse experimental myopia model and cell-type specific NGS profiling

研究代表者

後藤 謙元 (GOTOH, NORIMOTO)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20632095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：近視は日本人の4割を占める状態であり、特に強度近視は成人失明の原因になっている。近視発生には網膜内層の寄与が大きいことが報告されてきたが、どの細胞種による寄与が中心であるかは不明である。本研究では、従来生理的に近い状態で単離が難しかった網膜内層の細胞のうち、マウス視神経細胞に焦点をしばってパピイン酵素による処理、フローソーターによる細胞の単離を行ったうえで、次世代シーケンサーにより RNA Seq を行うことで遺伝子発現プロファイルを作成することができた。今後、同実験法をマウス近視モデルにて実施することにより、近視発生のメカニズムの解明、予防・治療法の解明に寄与していくと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Myopia is a common ocular status in Japanese population, whose prevalence seems to be more than 40%. High myopia, also known as pathologic myopia, is one of the top vision threatening diseases in Northeastern Asian countries. It was reported that the neural signal enhancing myopia is originated at the inner layer of retina, but it is not clear which cell type has a largest contribution for the myopic signal. In this study, mouse ganglion cell was dissociated and enriched with flow-cytometry (FACS), and the extracted RNA was optimized for RNA Seq, performed with next generation sequencer (NGS). This approach can be applied for experimental myopic mice for revealing the pathomechanism of myopia.

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：眼細胞生物学 眼生化学・分子生物学 眼遺伝学

1. 研究開始当初の背景

近年日本を含む東アジア地域では近視は増加の一途をたどっており、罹患率は40%程度と報告されている。近視は眼鏡・コンタクトレンズの装用といった補助具の必要、不必要といった問題だけでなく、近視の5%程度をしめる屈折度の大きい強度近視(病的近視)患者では、網脈絡膜の変性および脈絡膜新生血管の進展が原因で、壮年、老年期に失明に至ることがある。しかし、現在の科学ではヒトにおける近視発症、進展をコントロールすることができない。

これまでに、近視発症、進展の原因については、動物を用いた実験近視からの知見に基づくものと、遺伝学的なアプローチに基づくものがある。

動物を用いた近視発生のメカニズムを明らかにする試みは1970年代に遡り、再現性のある近視動物モデルがヒヨコ、ツパイなどで確立されてきた。視覚遮蔽モデルと屈折変化モデルが代表的なもので、片眼に近視導入、僚眼を対照とすることで、個体差や生育環境をコントロールした研究を行うことができる。我が国からも先進的な研究が多数報告され、これまでにInsulin/Glucagon、TGF beta、Dopamine、Egr-1/ZENK1の系の近視発生への寄与が報告されているものの、病理組織学的検討にとどまっている。

遺伝学的なアプローチについては、過去には大家系を対象にした segregation analysis により TGFβ2 の寄与が報告されている。近年では全ゲノム関連研究により、15q14 領域に Odds 比 1.4 の寄与アレルが報告されており、他にも米国の商業系遺伝情報会社より複数の寄与アレルが報告されている。2013年 SLITRK6 遺伝子が近視と難聴の合併症を発症する家系の segregation analysis の結果として報告されるなど、少しずつ知見がふえているものの、大きくは生物学的な寄与は不明である。

近視研究にあたり、古くから網膜内層が近視発生に不可欠であることが、網膜内層の破壊研究などから分かっていた。網膜内層には主にアマクリン細胞、視神経細胞、双極細胞などの情報処理を行うニューロンがあり、不正確な融像の情報に対応している可能性が示唆されていた。また、臨床的には、mGluR6 を介した伝達系に異常がある完全型先天停止夜盲は、全例近視を発症する。このことから、網膜を構成する細胞間のシグナルに、近視発生に寄与する要素が含まれていると予想される。しかし近視発生のシグナルがすでに視細胞からうまれているのか否か、明らかでない。

近年、網膜の細胞種に特異的、ないしやや特異的な遺伝子プロモータ配列が明らかになり、特定の細胞種を蛍光タンパク質で標識した遺伝子改変マウスを得ることが可能になった。例えば Nrlp-GFP マウス(桿体細胞)、mGluR6p-tdTomato マウス(ON型双極細胞)

細胞)、Thy1p-CFP マウス(視神経細胞)などがある。また核酸増幅技術が進歩し、数個の細胞から発現ライブラリーを作成することが可能になった。高速シーケンスとそのデータ解析の技術も進歩しつつある。

近視の罹患率は人種差が大きく、東アジア人に多く白人に少ない。高度な近視が失明の原因となることが国際的には過小評価されてきた。そのため近視の基礎研究は、国際的に取り組みが少なかったが、近年急速にシンガポール、中国、韓国、台湾からの研究報告が相次ぐようになった。

2. 研究の目的

本研究では、最近のニューロサイエンスの手法とゲノム学の手法を、歴史的に確立された実験系に応用することを目的に、以下の項目の実験手技を確立し、評価する。

- (1) 実験近視マウスの系を確立する。
- (2) ゲノム学的研究から得られた知見につき、実験近視マウスで評価する。
- (3) マウス視神経細胞を濃縮し、RNA を抽出する。
- (4) 次世代シーケンサーにより、RNA Seq を行い、生理学的な遺伝子発現プロファイルを作成する。

3. 研究の方法

(1) 実験近視マウスの系の確立

C57B6 マウスについて、Rd8 遺伝子の突然変異が含まれていないか確認したうえで実験を行った。

作成には Schmucker C and Schmucker F. *Vision Research*. 44;1857-1867;2004 を参考にした。

生後 21 日目で乳離れする直後に、片眼にコンタクトレンズを設置し、僚眼には処置を行わなかった。

(2) 実験近視マウスでの Wnt7B の評価

Wnt7B の発現を免疫組織染色法にて、マウス成体網膜で確認した。4%PFA で固定後、OCT コンパウンドに包埋した。10um 厚の切片を作成後、Bioss 社 Anti-WNT7B, Rabbit-Poly にて染色を行った。同時に Anti-Brn3b 抗体でも共染を行った。2 次抗体には Abcam 社の Alexa Fluor シリーズを用いた。撮影には Keyence 社 BZ-9000 を用いた。

Wnt7B の発現を、網膜および角膜よりタンパク質を抽出し、Western blot 法で確認した。抗体は上記 Bioss 社の抗体を 1 次抗体としてもちいた。

Wnt7B の発現の変化を、網膜および角膜より RNA を抽出し、RT-PCR 法および cybr グリーン法による Q-PCR 法で評価した。

(3) マウス視神経細胞の濃縮

Tabata et al. *Journal of Neuroscience Methods*. 104;45-53:2000 に報告された、マ

ウス小脳の細胞解離の方法に準拠して、網膜の細胞解離を行った。

Solution A (活性型パパイんに、SOD1、HEPES、グルコース を添加)に網膜を投入し、8 で 30 分 incubate。28 で 5-9 分 incubate。

Solution B (アンチパイんに、SOD1、HEPES、グルコース を添加)を加え、4 で wash。4 にて遠心し細胞を集める。

Solution C (アルブミンに HEPES、グルコース を添加)を細胞成分に加え、4 で wash。Ames' buffer に希釈。

Thy1p-CFP マウスを対象にした。BD 社 FACSarea を用いて、CFP の波長に対応してソーティングを行った。ソーティングされなかった分画は対照実験のために用いた。

(4) 次世代シーケンサーによる RNA Seq

濃縮した視神経細胞を、特殊な buffer に直接投入し、細胞膜のみ溶解、核膜は障害させない形で、精製をせずに total RNAを得た。

Nugen 社の Ovation Kit を使用した。SPIA 増幅の効率の評価は、Agilent 社 Bioanalyzer を用いて行った。

ライブラリー作成および Illumina HiSeq による解析は、外注した。

解析方法としては Paired End とし、読み取り塩基長は 100 bps / リード とした。

配列の張り付け、GO 解析は、公共のソフトウェアを用いた。

4. 研究成果

(1) 実験近視マウスの系の確立

既報とほぼ同じ方法でマウスの飼育ならびに眼球摘出を行うことができた。

ヒト近視では眼軸長の伸長がみられるが、自験例では実験近視マウスでは眼軸長の伸長は統計的に marginal であった。よりヒト近視の表現型に近いモデル作成が将来の課題と考えられた。

(2) 実験近視マウスでの Wnt7B の評価

免疫染色法にて、多くの視神経細胞に、Wnt7B 抗体のシグナルの集積を認めた(図 1)。

網膜内層が近視形成に関与するという生理学的な実験成果を裏付けると考えられる。

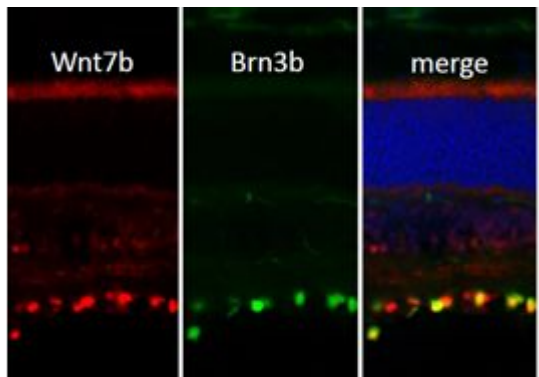


図 1 マウス網膜での WNT7B タンパクの局在

Western blot 法でも、マウス網膜での WNT7B タンパクの発現をみとめた。

RT-PCR 法でも、マウス網膜での Wnt7b 遺伝子の発現を認めた。さらに、実験近視の導入により、その発現が増加した。

(3) マウス視神経細胞の濃縮

マウス成体 1 眼からの網膜を解離することで、3-8 X10⁶ 個の細胞が得られた。

フローソーターで CFP シグナル陽性分画を得ると、100 個オーダーの細胞が得られることが多かった。これはマウス網膜における視神経細胞数の過去の報告を裏付けるものである。

(4) 次世代シーケンサーによる RNA Seq

SPIA 増幅後に作成した cDNA の質を Bioanalyzer により評価したところ、良好な増幅をえていた(図 2)。

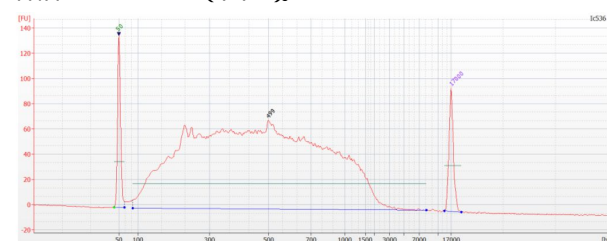


図 2 SPIA 増幅後の cDNA の模擬泳動像

解析のための遺伝子の定義としては、RNA Seq では従来の 3' アレイのように遺伝子の定義と、3' の配列が紐づいていないため、RPKM アルゴリズムをもとに推測した。

リードは半分以上が rRNA、さらにその半分以上が Exon 外に位置する結果が得られた。つまり遺伝子領域の解析としては、得られたリード数の 25-30%程度のみが遺伝子解析に利用できることが分かった。これは本研究を始めたときには意識されていなかった問題であるが、最近 rRNA を特異的に省いて増幅する商品が上梓されるようになった。

濃縮された細胞を代表している Thy1 遺伝子の発現を検討することで、実験系が適切に動いているか評価した(図 3)。なお、Thy1 は発現上位 4 位であった。検討した 8 検体 (Thy1p-CFP 陽性細胞 7 検体、CFP 陰性分画 1 検体)において、Thy1 は Thy1p-CFP 陽性細胞検体で、共通して高い発現量を示した。CFP 陰性分画では、Thy1 の発現はみられなかった。この結果から、実験系が、解析手法も含め適切に運用されていることが確認された。

Pilot study として行ったマウス成体の正常視神経細胞 2 検体においては、KPRM で 5 以上の発現を共通して示す遺伝子は、約 500 個であった。これらを対象に GO 解析を行うと、glycolysis, glucose metabolic process, cytoskeleton organization, ion transport, metal ion transport などが有意となった(図 4)。Function では、ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions

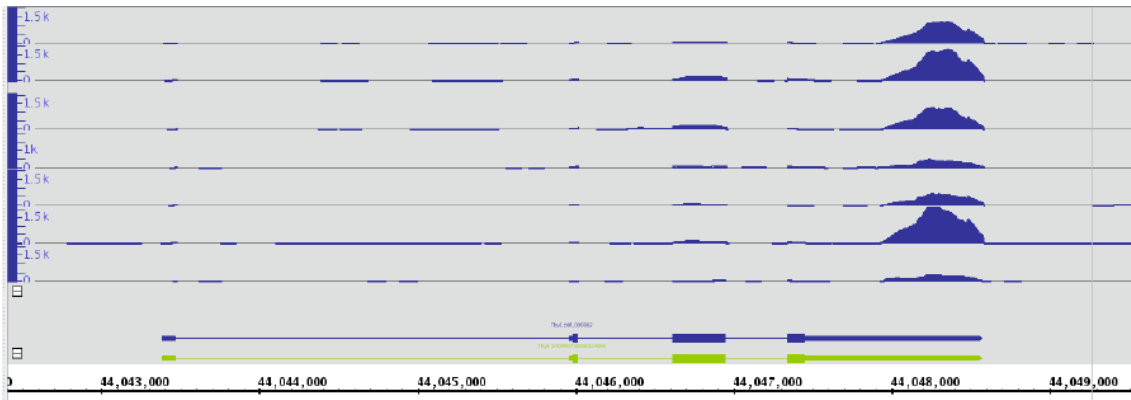


図3 Thy1p-CPM マウス由来 CFP 陽性細胞における Thy1 遺伝子発現

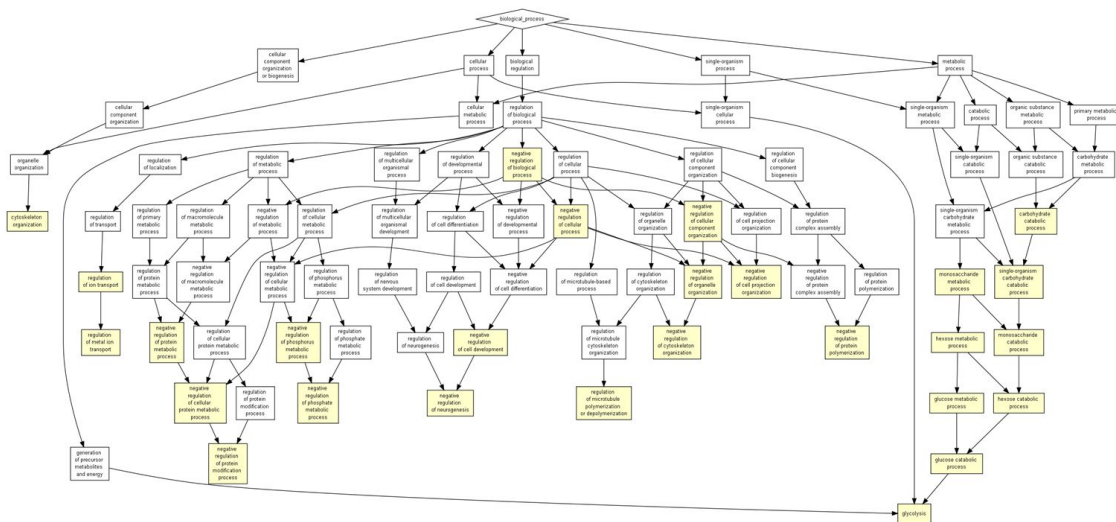


図4 Thy1p-CPM マウス由来 CFP 陽性細胞における GO パスウェイ解析

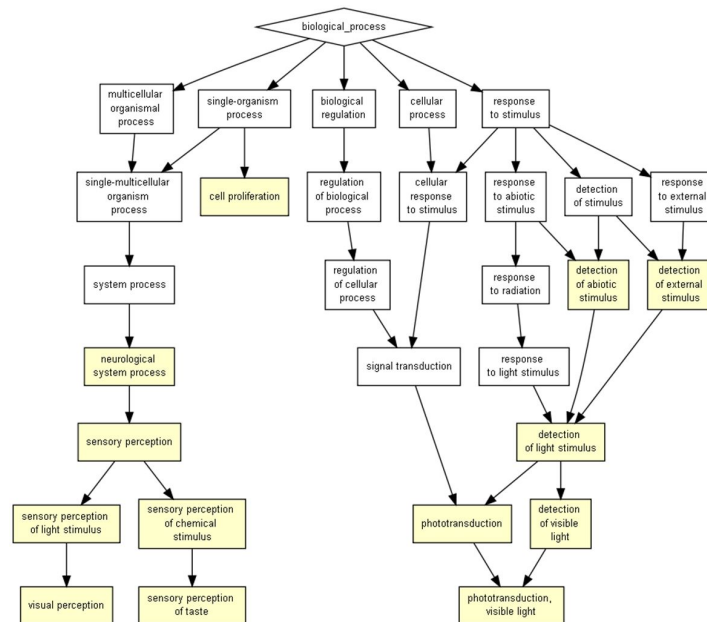


図5 Nr1p-GFP マウス由来桿体細胞における GO パスウェイ解析

などが有意であった。

そのうち特に発現量の多い上位 55 個の遺伝子をもとに GO 解析を行うと、ion transport が $P = 1.65E-4$ で有意であった。

これは別研究で得られたマウス成体由来の桿体細胞におけるパスウェイ解析の結果とは大きく異なるものであった(図5)。

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 2 件)

Oishi M, Yamashiro K, Miyake M, Akagi-Kurashige Y, Kumagai K, Nakata I, Nakanishi H, Yoshikawa M, Oishi A, Gotoh N, Tsujikawa A; Nagahama Study Group, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N.

Association between ZIC2, RASGRF1, and SHISA6 genes and high myopia in Japanese subjects.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 54:7492-7;2013.

(査読あり)

Miyake M, Yamashiro K, Tabara Y, Suda K, Morooka S, Nakanishi H, Khor CC, Chen P, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Gotoh N, Tsujikawa A, the Nagahama Study Group, Meguro A, Kusuhara S, Polasek O, Hayward C, Wright AF, Campbell H, Richardson AJ, Schache M, Takeuchi M, Mackey DA, Hewitt AW, Cuellar G, Shi YI, Huang L, Yang Z, Leung KH, KaoPY, Yap MK, Yip SP, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Mizuki N, MacGregor S, Vitart V, Saw M, Tin A, Tai ES, Wong TY, Cheng CY, Baird PN, Yamada R, Matsuda F, and Yoshimura N.

Identification of the WNT7B gene provides the mechanism underlying myopia development.

(査読中)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 謙元 (NORIMOTO GOTOH)

京都大学・大学院医学研究科附属ゲノム医学センター・准教授

研究者番号 : 20632095

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし