

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293377

研究課題名(和文) 霊長類モデルを用いたドルーゼン生成機序の解明と予防薬の開発

研究課題名(英文) Primate model to study drusen formation and development of therapeutics

研究代表者

岩田 岳 (IWATA, Takeshi)

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・部長

研究者番号：90374157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：霊長類医科学研究センターで維持されている、遺伝性の若年性ドルーゼン・カニクイザルについて、遺伝学的解析による原因遺伝子変異の特定と組織・細胞生物学的な解析を行った。ドルーゼン生成機序の根本原因となる遺伝子変異を明らかにするためにカニクイザルゲノムを用いた全エクソン配列解析と全ゲノム配列解析を利用して連鎖解析および1塩基多様性の分離を行い、染色体1番の3遺伝子に原因候補が絞り込まれた。また免疫組織染色によりドルーゼン・サルでは上皮性マーカーの一部の発現が落ちていることを確認した。より詳細な解析のためにサル網膜色素上皮初代培養細胞から単層上皮の形成を行った。

研究成果の概要(英文)：Early onset cynomolgus macaque monkey with macular drusen was characterized to identify disease-causing mutation and pathological change at tissue and cellular level. The affected monkeys with dominant inheritance develop drusen at two years after birth. Whole genome and whole exome analysis were performed to narrow the disease locus to a small region on chromosome 1. Three candidate genes were identified to cosegregate with macular drusen. The retinal pigment epithelial (RPE) cells in the fovea of affected monkeys were identified to lose the characteristic of the epithelial cells, Epithelial-Mesenchymal Transition-like phenomenon, leading to change of cell morphology, decreased of autophagy and phagocytosis activities. Complement inhibitors were administered to affected monkey to suppress formation of drusen. Potential inhibitors are being developed.

研究分野：眼科学

キーワード：医歯薬学 外科系臨床医学 眼科学 眼性化学・分子生物学 ドルーゼン

1. 研究開始当初の背景

黄斑は視細胞が集中する重要な部位であり、ここが障害されると著しい視力低下を招く。黄斑が障害される疾患の中でも最も患者数の多い加齢黄斑変性は委縮型と滲出型に大別され、前者については初期病態としてドルーゼンが網膜色素上皮 (RPE) とブルッフ膜の間に蓄積する。ドルーゼンのタンパク質成分にはアミロイドβ、補体関連分子、Clusterin、Vitronectin、Crystallin、さらに酸化関連分子等が含まれ (Crabb et al., PNAS 2007)、ドルーゼンの電顕像によってコレステロールやアポリポタンパク質などの脂質関連分子も検出されている (Curcio et al., IOVS 2006, Exp Eye Res 2007)。ドルーゼンの蓄積が進行すると、視細胞、RPE 細胞と脈絡膜間の分子輸送が低下し、ドルーゼン内のアミロイドβの蓄積やドルーゼン周辺の補体の活性化によって細胞死が起こる。ドルーゼンの蓄積には RPE 細胞の機能低下が最も大きな要因として考えられ、機能維持のための予防法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

加齢黄斑変性症は中心視野が障害される難治性の眼疾患である。病態初期にドルーゼンが蓄積する網膜の環境や分子メカニズムは明らかにされていない。我々は生後2年でドルーゼンが黄斑部に観察される遺伝性のカニクイザルと加齢によるドルーゼン生成個体の比較を行ってきた。病理学的解析によってヒトに類似するドルーゼン組成であることが明らかとなり、網膜色素上皮細胞の形態、貪食能、タンパク分解能などが著しく低下していることも明らかになった。さらに全遺伝子を対象としたエクソーム解析によって2つの遺伝子変異 (ダイジェニック変異) によって発症していることが明らかになった。本研究はドルーゼンが生成される黄斑部の環境を分子レベルで解明し、ドルーゼンの生成を遅延あるいは抑制する方法を考案することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は霊長類医科学研究センターで発見された若年性のドルーゼン・カニクイザルをモデル動物として利用し、黄斑に蓄積して視機能を低下させるドルーゼンの生成機序を明らかにする。2つの遺伝子変異 (細胞接着因子、TRIM タンパク質) による RPE 細胞の形態、増殖能、貪食能、接着機能、タンパク質分解機能、基底膜への排除機能への影響を解析する。また、原因タンパク質の RPE 細胞での局在、相互作用するタンパク質、代謝機能を明らかにする。ドルーゼン個体の眼球を有効に利用して、網膜組織切片 (光学用、電顕用)、RPE 細胞、ドルーゼン等の実験試料を得る。2 遺伝子が関与する代謝機能が明らかに

された時点で、これらを抑制あるいは促進することによって RPE 細胞あるいは個体を用いてドルーゼン抑制・促進をコントロールできるか検討を行い、抑制する薬をドルーゼン促成薬として開発する。

4. 研究成果

(1) 疾患 (ドルーゼン) および正常個体の間の網膜色素上皮 (RPE) 細胞の比較

①疾患および正常およびドルーゼン個体から得られた RPE 細胞の網羅的遺伝子発現解析

遺伝子発現解析には、カニクイザルと近縁で、ゲノム配列レベルで相同性が極めて高いアカゲザルのマイクロアレイ (Rhesus Macaque (V2) Gene Expression Microarray) を用いた。このマイクロアレイチップには 22,000 個以上のアカゲザル既知遺伝子が載っている。疾患カニクイザル個体とドルーゼン・カニクイザル個体共々2頭から作成した RPE 初代培養細胞から RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析を行った結果、疾患個体由来の RPE 細胞 (疾患 RPE) と正常個体由来の RPE 細胞 (正常 RPE) の間で3倍以上の発現量の差があったプローブは 372 個であった。このうち疾患 RPE で3倍以上発現が上昇していた遺伝子が 175 個、3倍以下に発現が減少していた遺伝子が 178 個あった。特定の機能およびパスウェイに属する遺伝子の有意な濃縮は見られなかったが、疾患個体では DAB1、HGF、CCL26、CCL23、CD70 の発現量が 10 倍以上高くなっていた。一方、疾患個体で発現量が 1/10 以下になっている遺伝子には LUZP2、CD34、FBP1 があった。ドルーゼンの発生と加齢黄斑変性の進行に関連すると考えられている補体系と炎症系因子の発現量に大きな変化は見られなかったが、白血球の遊走を促進する CCL26、CCL23 の発現が疾患 RPE で高かったことは興味深い。また HGF は RPE 細胞に対して増殖促進・遊走促進作用があること、逆に疾患個体で発現量が下がっていた CD34 は細胞接着因子と考えられていることから、組織内での RPE の上皮性が維持されているかどうかを次に検討した。

②疾患及び正常ドルーゼン個体の網膜色素上皮に対する上皮マーカーの免疫組織染色

我々が先に行ったカニクイザル 26 個体に対するドルーゼンの原因遺伝子変異スクリーニングで、候補の1つに細胞接着分子が挙がってきたこと、また疾患 RPE で mRNA 発現量が 10 倍以上高くなっていた HGF には RPE 細胞自身の増殖と遊走を促進する作用があることから、ドルーゼン個体の RPE で上皮性が保たれているかどうかを免疫組織染色により検討した。その結果、正常個体に対して疾患個体では上皮細胞のマーカーである Cytokeratin-18 の染色がほとんど見られなかった。Fibronectin は疾患個体ではドルー

ゼン内部に染色が見られた。しかし細胞接着因子である E-Cadherin の染色には正常個体と疾患個体で顕著な差は見られなかった。

HGF の転写レベルが疾患個体では正常個体の 10 倍以上高かったこと、上皮性マーカーの一つである Cytokeratin-18 タンパク質の染色が疾患個体で薄くなっていたことから、疾患個体では RPE の上皮性が一部失われていると考えられた。この結果は以前に行なわれた RPE の貪食能の比較で疾患 RPE が正常 RPE に対して有意に低い貪食能を示したと矛盾しない。また CCL23、ccl26 の転写レベルが高かったことから、疾患個体では炎症応答が促進される可能性が考えられた。しかしドルーゼン生成と加齢黄斑変性の進行に関わると考えられている補体系因子や他のサイトカインの転写量に大きな変化が見られなかったことから、2 次的な反応と考えられ、より詳細な解析が必要である。

(2) 疾患個体に得意的な変異遺伝子の解析

本研究の開始時点では、ドルーゼン家系内の 26 個体を用いた全エクソン配列解析からヒト染色体 6 番に存在する 230KDa の細胞接着分子とヒト染色体 11 に存在する 52KDa のユビキチン合成に関与する TRIM タンパク質をコードする遺伝子に疾患個体特異的なアミノ酸置換を伴う変異が見いだされていた。しかし、新たに生まれた若齢疾患個体とその正常な母親を加えて再解析したところ 2 つの遺伝子変異と疾患とが必ずしも分離されず、疾患個体特異的な変異の再解析が必要となった。先の解析では初代ドルーゼン・カニクイザルから交配によって生じた第 1 世代由来の 6 家系から広く疾患個体・正常個体を選択して原因遺伝子変異の選別を行なったが、若齢疾患個体が含まれる 1 家系 (5 世代) とドルーゼン家系外のカニクイザルを対象として、34 個体 (疾患 13 個体、正常 10 個体、不明 11 個体) を用いた全エクソン配列解析 (単一塩基変異 (SNV) および短い欠失・挿入を検出) に加えて 7 個体 (疾患 4 個体、正常 3 個体) を用いた全ゲノム配列解析 (大規模な欠失・挿入・重複を検出) を行なった (図 1)。今回の解析では疾患は 5 歳までにドルーゼンの蓄積が認められた個体、正常は 10 歳以上でドルーゼンが見られない個体としたため、ドルーゼンの蓄積が 10 歳以降でのみ確認された個体は不明と分類した。

全エクソン配列解析にはヒトと同じキャプチャーキット (SeqCap ver. 3.0、SureSelect ver. 4.0+UTR、HiSeq 2500) を用い、同じマカク属であるアカゲザルのゲノム配列 (rheMac2) をレファレンスとしてマッピングした。全ゲノム配列解析には HiSeq X Ten を用い、同様に rheMac2 をレファレンスとしてマッピングした。

まず疾患と連鎖する染色体領域を検討する目的で、全エクソン配列解析の結果を用いて連鎖解析 (Merlin, non-parametric) を行

なった。その結果、染色体 1 番の約 20Mb の

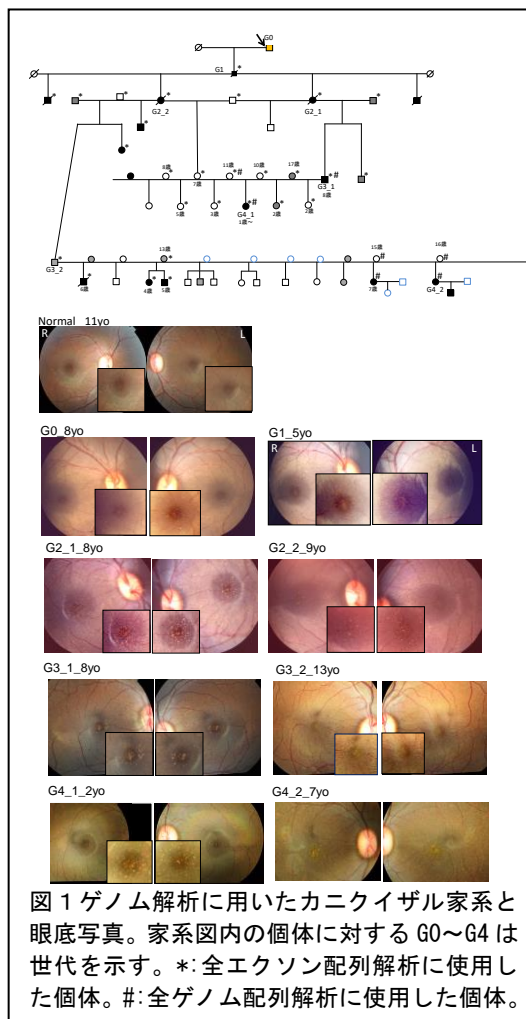


図 1 ゲノム解析に用いたカニクイザル家系と眼底写真。家系図内の個体に対する G0~G4 は世代を示す。*:全エクソン配列解析に使用した個体。#:全ゲノム配列解析に使用した個体。

領域にわたって高い LOD 値が得られた。また染色体 7 番、10 番、14 番 15 番、X 染色体にも LOD 値 2 以上のピークが見られた。これらのピークの近辺から疾患個体と共に分離される SNV を選別した結果、染色体 1 番の 9.6Mb から 28.6Mb の間に位置する 13 個の遺伝子が持つアミノ酸置換を伴う変異が選択された。これらの変異のうち、変異予測ソフト (Polyphen-2、Mutation taster) でタンパク質機能に影響を与える可能性が高いと予測された 3 つの変異について、さらに遺伝子の機能解析を進めることにした。

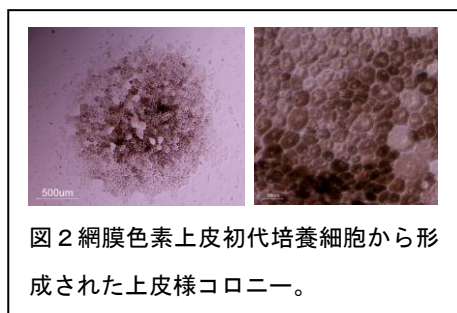
3 つの変異はアクチン結合タンパク質である ESPN、様々な細胞内シグナル伝達に関わるリン酸化酵素である mTOR、詳細な機能が不明な Clorf167 に落ちていた。細胞株に正常型と変異型タンパク質を発現させて違いを検討した結果、ESPN 野性型タンパク質と変異型タンパク質はどちらもアクチンと共局在しており大きな違いは認められなかった。一方で mTOR タンパク質は正常型が可溶化画分に抽出されるのに対して変異型は可溶化画分と不溶化画分から検出され、変異がタンパク質の凝集または局在に影響することが予想された。mTOR および Clorf167 の変異体については培養細胞株と、下に述べる疾患 RPE と正常 RPE 初代培養細胞を用いて RPE 機能へ

の影響を引き続き検討する。

(3) カニクイザル RPE 初代培養細胞からの単層上皮シート作製

近年行なわれている RPE の解析では RPE の初代培養細胞または iPS 細胞・ES 細胞から分化誘導した RPE 細胞を用いた単層上皮が使われている。カニクイザルから単離したドルーゼン RPE と正常 RPE の比較を、より生体内に近い条件で行なうために RPE 初代培養細胞からの単層上皮シート作製を試みた。一般的に初代培養細胞は胎児または幼若個体から分離した細胞を用いる。しかし本研究で用いているドルーゼン・カニクイザルは、眼底写真からドルーゼンの蓄積がはっきり確認できるのが 2 歳以降であること、家系の維持のためにドルーゼン個体からできるだけ繁殖によって子孫を得ることから、幼若疾患個体からのサンプリングが困難であった。そこでまず成体カニクイザルから単離した RPE 初代培養細胞から単層上皮が形成できるかどうかを検討した。

網膜色素上皮の初代培養は当研究室で以前行われた方法に従い、安楽殺されたサル眼球から前眼部を除いた後に網膜をピンセットで取り除き、露出した網膜色素上皮をピンセットで剥がしてコラーゲンコートされた培養皿に移した。DMEM・15%FBS 培地で維持すると、2、3 日後には底面に接着した網膜色素上皮塊から細胞が這い出し、メラニン顆粒を一部保持した状態で繊維状になって増殖した。細胞増殖は幅広い年齢のカニクイザルサンプル (10 歳~37 歳) で確認できた。このうち正常個体 (10 歳) 由来と疾患個体 (15 歳) 由来の RPE 初代培養細胞から、培養開始約 1 か月後に 6 角形の敷石状のコロニーの形成が確認された。さらに 1 か月培養する間に 6 角形の細胞は色素を持ち、上皮様の形態を示した (図 2)。



これらのコロニーをコラゲナーゼ処理によって培養皿から剥離し、別の培養皿に移してさらに培養を行うと (RPE_P1)、再び約 1 か月後に同様の上皮様コロニーの形成が見られた。また凍結保存した RPE_P1 細胞を培養すると、同様に約 1 か月後に上皮様コロニーを形成した。

今後各 2 個体以上の正常個体、疾患個体からそれぞれ RPE 初代培養細胞を樹立し、RPE マーカーの発現確認とともにドルーゼンの

成分や加齢黄斑変性との関連が示されている補体系因子・炎症系サイトカインの発現が正常個体と疾患個体で異なるかどうかを検討する。また (2) で同定された 3 遺伝子の発現と、これらの遺伝子がかかわるシグナル経路に違いがあるかどうかを検討する。

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 11 件)

1. Ueno S, Nakanishi A, Kominami T, Ito Y, Hayashi T, Yoshitake K, Kawamura Y, Tsunoda K, Iwata T, Terasaki H. In vivo imaging of a cone mosaic in a patient with achromatopsia associated with a GNAT2 variant. *Jpn J Ophthalmol.* 2017; 61:92-98.

2. Minegishi Y, Nakayama M, Iejima D, Iwata T. Significance of Optineurin Mutations in Glaucoma and Other Diseases. *Prog Ret Eye Res* 2016; 55:149-181.

3. Shim MS, Takihara Y, Kim K-Y, Iwata T, Yue BYJT, Inatani M, Weinreb RN, Perkins GA, and Ju W-K. Mitochondrial pathogenic mechanism and degradation in optineurin E50K mutation-mediated retinal ganglion cell degeneration. *Sci Rep* 2016; 6:33830.

4. Minegishi Y, Sheng X, Yoshitake K, Sergeev Y, Iejima D, Shibagaki Y, Monma N, Ikeo K, Furuno M, Zhuang W, Liu Y, Rong W, Hattori A, Iwata T. CCT2 Mutations Evoke Leber Congenital Amaurosis due to Chaperone Complex Instability. *Sci Rep* 2016; 6:33742.

5. Fujinami K, Kameya S, Kikuchi S, Ueno S, Kondo M, Hayashi T, Shinoda K, Machida S, Kuniyoshi K, Kawamura Y, Akahori M, Yoshitake K, Katagiri S, Nakanishi A, Sakuramoto H, Ozawa Y, Tsubota K, Yamaki K, Mizota A, Terasaki H, Miyake Y, Iwata T, Tsunoda K. Novel RP1L1 Variants and Genotype-Photoreceptor Microstructural Phenotype Associations in Cohort of Japanese Patients With Occult Macular Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016; 57:4837-46.

6. Suga A, Mizota A, Kato M, Kuniyoshi K, Yoshitake K, Sultan W, Yamazaki M, Shimomura Y, Ikeo K, Tsunoda K, Iwata T. Identification of novel mutations in the LRR-cap domain of C21orf2 in Japanese patients with retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57:4255-4263.

7. Kuniyoshi K, Hayashi T, Sakuramoto H, Mishima H, Tsuneoka H, Tsunoda K, Iwata T, Shimomura Y. New truncation mutation of the NR2E3 gene in a Japanese patient with enhanced S-cone syndrome. Jpn J Ophthalmol. 2016; 60:476-485.

8. Yagura K, Shinoda K, Matsumoto S, Terauchi G, Kawashima M, Watanabe E, Matsumoto H, Iwata T, Mizota A, Miyake Y. Electroretinographic evaluations of retinal function before, just after, and after intravitreal injections. Sci Rep 2016; 6:31104.

9. Nakanishi A, Ueno S, Hayashi T, Katagiri S, Kominami T, Ito Y, Gekka T, Masuda Y, Tsuneoka H, Shinoda K, Hirakata A, Inoue M, Fujinami K, Tsunoda K, Iwata T, Terasaki H. Clinical and genetic findings of autosomal recessive bestrophinopathy in Japanese cohort. Am J Ophthalmol. 2016; 168:86-94.

10. Kuniyoshi K, Muraki-Oda S, Ueyama H, Toyoda F, Sakuramoto H, Ogita H, Irifune M, Yamamoto S, Nakao A, Tsunoda K, Iwata T, Ohji M, Shimomura Y. Novel mutations in the gene for α -subunit of retinal cone cyclic nucleotide-gated channels in a Japanese patient with congenital achromatopsia. Jpn J Ophthalmol. 2016; 60:187-97.

11. Katagiri S, Hayashi T, Yoshitake K, Akahori M, Ikeo K, Gekka T, Tsuneoka H, Iwata T. RPE65 mutations in two Japanese families with Leber congenital amaurosis. Ophthalmic Genetics 2016; 37:161-169.

[学会発表] (計 3 件)

1. Iwata T.

Genetic factors and molecular mechanisms of early stage AMD:CNV mouse and drusen primate models.

XVII International Symposium on Retinal Degeneration 2016

Kyoto International Conference Center, 2016. 9. 19-24, Kyoto.

2. Prakash G., Iwata T.

Developing international research collaborations in eye diseases - Asian Eye Genetics Consortium.

XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research, 2016. 9. 25-29, Tokyo.

3. Suga A, Nakayama M, Chi Zai-Long, N Shimozawa, Yoshitake K, Iwata T. Characterization and whole genome analysis of cynomolgus monkeys with hereditary macular drusen.

XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research, 2016. 9. 25-29, Tokyo.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

発明者: 岩田、家島、野田
権利者: 岩田、家島、野田
番号: 特願 2016-244250 号
出願年月日: 2016.12.16
国内外の別: 国内

○取得状況 (無し)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://www.iwata-lab.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 岳 (IWATA, Takeshi)
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・部長
研究者番号: 90374157

(2) 研究分担者

溝田 淳 (MIZOTA, Atsushi)
帝京大学医学部・教授
研究者番号: 10239262

(3) 研究分担者

下澤 律浩 (SHIMOZAWA, Nobuhiro)
医薬基盤研究所・霊長類医学科学研究センター・主任研究員
研究者番号: 50300786