

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893018

研究課題名(和文) 無色素性網膜色素変性症の病因遺伝子と網膜自己抗原の探索

研究課題名(英文) Search for genetic causes and autoantibodies of retinitis pigmentosa sine pigmento

研究代表者

西口 康二 (Nishiguchi, Koji)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30447825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：無色素性網膜色素変性症の遺伝的背景を解明するために7名の患者で全エクソーム解析を行い、約150個の既知の網膜変性病因遺伝子を変異分析したが、1名も遺伝的原因を特定することができなかった。次に、患者の血清を用いて、すでに報告されている自己免疫網膜症の8種類の病因抗原に対する自己抗体の有無の判定とドットプロットによる抗網膜抗体の総量の定量を試みた。自己抗体の検索は現在解析中である。ドットプロットでは、無色素性網膜色素変性症ではコントロールの色素性網膜色素変性症と比べて有意に血清中の網膜自己抗体の総量が多いという結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Whole exome analysis was performed on 7 patients with retinitis pigmentosa (RP) sine pigmento. Genetic analysis of approximately 150 reported causative genes revealed no pathogenetic mutations in all patients. Next, we assessed the presence of 8 known antibodies against 8 known autoimmune retinopathy related antigens and quantified total anti retinal antibodies using patients' serum. The search for autoantibody is still underway. Dot blot revealed increased total retinal antibodies in RP sine pigmento compared to RP with pigments.

研究分野：視覚先端医療学

キーワード：網膜変性 視細胞 網膜色素変性症 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患である網膜色素変性症は厚生労働省に難病と指定されており、本邦において、成人中途視覚障害原因の第3位である。この病気の原因として、これまで100以上の病因遺伝子が同定されている (Retnet、<https://sph.uth.edu/Retnet/>)。しかし、これまで報告された病因遺伝子は主に欧米の患者を対象とした遺伝子研究で発見されたものである。異なった遺伝的背景を持つ日本人患者においては、欧米の知見があてはまらず、遺伝子レベルの原因説明はあまり進んでいない (Jin et al. JMG2007)。

無色素性網膜色素変性症は、眼底検査で網膜内色素沈着が軽微なこと以外は網膜色素変性症と似た臨床像を呈し、網膜色素変性症の subtype に分類される。日本では、その無色素性網膜色素変性を有する患者も少なくない。また、無色素性網膜色素変性と類似した臨床像は、腫瘍随伴網膜症をはじめとする自己免疫網膜症にも見られ、場合によっては、遺伝性無色素性網膜色素変性症と自己免疫網膜症の区別が難しいこともある (Heckenlively et al., Semin Immunopathol 2008)。一方、有効な治療法があまりない遺伝性網膜色素変性症に対して、自己免疫性の網膜症に対しては、免疫抑制療法が有効であるという報告もある (Heckenlively et al., Semin Immunopathol)。したがって、これらの病態の鑑別は患者の視力予後、遺伝カウンセリングに極めて重要な意味を持ちうる。

本研究の第一の目標は、いまだ明らかにされていない日本人の無色素性網膜色素変性症の遺伝的背景を、網羅的に解析し、明らかにすることである。第二の目標は、変異が同定されなかった患者の血清を用いて、自己免疫性機序による網膜症発症の可能性を明らかにすることにある。計画を進めていくうえで、申請者は以下に述べる準備を行い、次のような予備的な実験結果を得ている。

(1) 8人の日本人の網膜色素変性症の全ゲノム解析を行った結果、半数に病因変異・遺伝子が同定されたが、半数には変異が見つからなかった (Nishiguchi et al. PNAS 2013)

(2) さらに(1)の追加実験で、網膜色素変性症を有数する日本人20人の全ゲノム解析を行った結果、やはり約半数に病因変異が同定できなかった。一方、欧米人では20人中17人で病因変異が同定された(未発表)。

(3) 全エクソーム解析において、有効なデータ解析パイプラインをすでに構築している (Corton, Nishiguchi PLoS ONE 201, Nishiguchi et al. Ophthalmology 2014)

(4) 網羅的遺伝解析パイプラインを用いて、網膜色素変性症の新規病因遺伝子の同定に成功した (Nishiguchi PNAS 2013)。抗網膜抗体を有する患者の血清をマウスの眼に注入することにより、網膜電図 (ERG) の反応が低下し、自己免疫網膜症が in vivo で再現できることを証明した (Ueno, Nishiguchi et al. PLoS ONE 2013)

2. 研究の目的

上記で示した背景をもとに、無色素性網膜色素変性症の分子病態を、遺伝学的、電気生理学的、分子生物学的アプローチを用いて解析する。期間内には、以下のことを明らかにする予定である。

(1) 無色素性網膜色素変性症の遺伝的背景を解明する

全エクソーム解析を行い、約150個の既知の網膜変性病原因遺伝子を変異分析する。

で病因変異が見つからなかった検体に対して、解析対象を広げて、全遺伝子変異解析を行う。新規遺伝子が同定された場合は、新規遺伝子の発現解析・機能解析を行う。

(2) 無色素性網膜色素変性症の原因として自己免疫性機序の関与の有無を明らかにす

る。

(3)(2)で病因変異が見つからなかった患者の血清をマウスに硝子体内投与し、網膜症の発症の有無を判定する。判定は、マウスに対して網膜電図、網膜切片の染色を行い、検討する。

(4)(3)で網膜症を誘発した血清検体を用いて、代表的な網膜抗原である Recoverin とマウス網膜を対象にウェスタンブロットを行い、網膜自己抗原の有無を調べる。

3. 研究の方法

平成26年度

(1) 無色素性網膜色素変性患者から採血を行い、DNAを精製後、全エクソーム解析を行う。

解析対象となる無色素性網膜色素変性症患者20名(20家系)と網膜色素変性症患者10名(10家系)とその家族を対象に採血を行い、ゲノムDNAを精製する。精製したDNAをアガロースゲルで電気泳動し、DNAのクオリティチェックを行う。チェックをパスしたDNAに対してエクソーム解析を行う。得られたデータをマッピング・アノテーションし、変異を抽出する。(Corton, Nishiguchi et al. PLoS ONE 2013)

(2) 全エクソン遺伝情報に対して、約150個の既知の網膜変性病因遺伝子の変異解析を行う。

既知の網膜変性遺伝子(Retnet、<https://sph.uth.edu/Retnet/>)を対象に変異解析を行う。データのハンドリングは、主にPERL(LINUXベース)を用いた自作プログラムで行う(Nishiguchi et al. PNAS 2013)。候補にあがった遺伝子・変異はダイレクトPCRで確認する。また、種々のデータベースと95名の正常者DNAを用いて、同定された変異が正常者に存在しえるかを調べる。また、家族のDNA検体を用いて、調べる。

(3) データ解析対象を全遺伝子に広げて変異解析を行い、新規病原因遺伝子を探索する。

(2)で既知の網膜変性遺伝子に変異が見つからなかった場合、解析対象を全遺伝子に拡大し、すでに構築した解析パイプラインを用いて病原因遺伝子・変異を探索することを基本戦略とする(Nishiguchi et al. PNAS 2013)。候補にあがった遺伝子・変異はダイレクトPCRで確認する。また、種々のデータベースと95名の正常者DNAを用いて、同定された変異が正常者に存在しえるかを調べる。また、家族のDNA検体を用いて、genotypeとphenotypeの整合性を確認する。必要に応じて、in situ hybridization、免疫組織染色を用いて発現解析を行い、コードするタンパクの機能を解析する。

平成27年度

(4) 病因変異が同定されなかった患者の血清をマウスに硝子体内投与し、網膜症の発症の有無を判定する。

(2)で病因変異が同定されなかった患者の血清と正常者血清各2-4 μ lを成体C57BL6マウスの別々の眼の硝子体内に注入し、5日後に両眼の網膜電図(ERG)を測定し網膜機能の低下の有無を調べる。血清中に病原性の網膜自己抗体が存在する場合は、ERGは大きく低下する(Ueno, Nishiguchi et al. PLoS ONE 2013)。ERG測定後マウスの眼を回収し、凍結切片を作成し、免疫組織染色(IHC)を行い、網膜変性の有無と患者IgGの網膜内局在を調べる。また、網膜切片をトルイジンブルーで染色し、網膜形態を観察する。

自己免疫性網膜症が疑われる場合は、患者血清をマウス網膜に加え、in vitroでblockingし、再度血清を回収する。回収した血清とブロッキングしていない血清を上記同様マウス眼に注入し、網膜症の発症の有無をERGとIHCで両眼比較する。

以上の実験の結果、自己免疫性網膜症が疑わ

れた場合は、さらにCT、PET等を用いて腫瘍の全身検索を行う。

(5)(4)で網膜症の発症が確認された血清検体に対して、網膜自己抗原の有無を調べる。

患者血清のマウス硝子体内投与により、網膜症発症が確認された場合、診断が自己免疫網膜症の疑いとなる。残りの血清検体を用いて、代表的な網膜自己抗原である Recoverin や α -enolase などを対象にウェスタンブロットを行い網膜自己抗体の有無を調べる。

さらに、上記タンパクが自己抗原でないと判明した患者に関しては、2次元電気泳動(2D-PAGE)等にて、マウス網膜蛋白およびマウス大脳をそれぞれ泳動分離後、PVDF膜に転写し、1次抗体として患者血清を用いてウェスタンブロットを行う。マウスの網膜と大脳由来のスポットを比較することにより、網膜特異的抗原を抽出し、質量分析計(MALDI TOF MS/MS)にて抗原蛋白の同定を試みる。検出された抗原のうち、視細胞特異的なタンパクを病的抗原の候補と定める。大腸菌で組換えタンパク質を作製・精製し、それを用いて患者血清をブロッキングした後、マウス眼内投与し、網膜症の発症の有無をERGとIHCで検証する。さらに、組み換えタンパクと患者血清でウェスタンブロットも行う。

4. 研究成果

本研究では、遺伝学的、電気生理学的、分子生物学的アプローチを用いて主に無色素性網膜色素変性症の病態解明を試みた。

無色素性網膜色素変性症の遺伝的背景を解明するために7名の患者で全エクソーム解析を行い、約150個の既知の網膜変性病因遺伝子を変異分析したが、1名も遺伝的原因を特定することができなかった。このことは、無色素性網膜色素変性症の中には遺伝的な原因以外で病気が生じる場合があることを示唆していると考えられた。

そこで、計画を変更して、病因変異が見つ

らなかった患者の血清をマウスに硝子体内投与し、自己抗体による網膜症の発症の有無を判定することにした。しかし、いずれの症例の血清でも硝子体内投与では網膜変性は生じなかった。血清中の抗体が視細胞に届いてない可能性を念頭に、次に血清を網膜下投与した。しかし、今度は正常コントロールを含めた多数の症例で網膜症の発症が組織学的・電気生理学的に確認された。このことは、この実験方法が、自己抗体による網膜症の発症の有無を判定するのに適していないことを意味している。

そこで、今度は患者の血清を用いて、すでに報告されている自己免疫網膜症の8種類の病因抗原に対する自己抗体の有無の判定とドットプロットによる抗網膜抗体の総量の定量を試みることにした。しかし、病因抗原の1つである大型の膜タンパクである TRPM1 のタンパク精製が非常に困難であったため研究計画が予定よりも遅れる結果となった。現時点で、全ての病因抗原の精製とそれらを用いたプロット作成の成功を購入した polyclonal 抗体を用いて確認したところである。一方で、ドットプロットの方は完了し、無色素性網膜色素変性症ではコントロールの色素性網膜色素変性症と比べて有意に血清中の網膜自己抗体の総量が多いという結果が得られた。

無色素性網膜色素変性症の遺伝的背景を解明するために7名の患者で全エクソーム解析を行い、約150個の既知の網膜変性病因遺伝子を変異分析したが、1名も遺伝的原因を特定することができなかった。

次に、患者の血清を用いて、すでに報告されている自己免疫網膜症の8種類の病因抗原に対する自己抗体の有無の判定とドットプロットによる抗網膜抗体の総量の定量を試みた。自己抗体の検索は現在解析中である。ドットプロットでは、無色素性網膜色素変性症ではコントロールの色素性網膜色素変性症

と比べて有意に血清中の網膜自己抗体の総量が多いという結果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

Masayoshi Yukita, Kazuko Omodaka, Shigeki Machida, Masayuki Yasuda, Kota Sato, Kazuichi Maruyama, Koji M Nishiguchi, Toru Nakazawa, Brimonidine Enhances the Electrophysiological Response of Retinal Ganglion Cells through the Trk-MAPK/ERK and PI3K Pathways in Axotomized Eyes、Current eye research、査読有、in press 2016

Wang Z, Iida A, Miyake N, Nishiguchi KM, Fujita K, Nakazawa T, Alswaid A, Albalwi MA, Kim OH, Cho TJ, Lim GY, Isidor B, David A, Rustad CF, Merckoll E, Westvik J, Stattin EL, Grigelioniene G, Kou I, Nakajima M, Ohashi H, Smithson S, Matsumoto N, Nishimura G, Ikegawa S, Axial Spondylometaphyseal Dysplasia Is Caused by C21orf2 Mutations、PLoS ONE 査読有、Vol 11、No 3、2016、pp.e015055
doi: 10.1371/journal.pone.0150555.

Fujita K, Nishiguchi KM, Yokoyama Y, Tomiyama Y, Tsuda S, Yasuda M, Maekawa S, Nakazawa T, In vivo cellular imaging of various stress/response pathways using AAV following axonal injury in mice、Scientific Reports、査読有、Vol 5、2015、pp. 18141
doi: 10.1038/srep09965

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

西口康二(NISHIGUCHI, Koji)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30447825

(2)研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし
()

研究者番号：