

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2009年3月10日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 王 春霞 

指導責任者名： 堀田 喜裕 職名： 教授

所属機関名： 浜松医科大学
〒431-3192

所在地： 静岡県浜松市東区半田山1-20-1

電話： 053-435-2256 内線： 2256

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ
新規緑内障原因遺伝子の探索と変異・機能解析
－家系の収集、リンケージ解析、変異スクリーニング－

3. 成果の概要（100字程度）
高齢化社会で失明原因の上位を占める緑内障の発症機序解明を目指した分子生物学的解析を行った。基盤材料となる家系性症例の検体を多数収集し、既知原因遺伝子WDR36の塩基配列を解析したところ、疾患原因変異は見つからなかった。それら収集症例は新規原因遺伝子の探索に役立つことが期待できる。一方、既知原因遺伝子OPTNタンパクの機能解析を行い、ラットの視細胞の細胞質及び核における発現を初めて検出し、視細胞の核でOPTN とNRL（網膜色素変性の原因遺伝子）が相互作用することを強く示唆した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (学会名・演題)

第31回日本分子生物学会年会・オプチニューリンとNRL蛋白の相互作用の解析

(2) 発表した論文 無 ・ (雑誌名・題名)

臨床眼科・分子遺伝学的検査により確定診断し得たBest病の一例

新規緑内障原因遺伝子の探索と変異・機能解析 — 家系の収集、リンケージ解析、変異スクリーニング —

研究者氏名	王 春霞
中国所属機関	中国医科大学附属第四病院眼科
日本研究機関	浜松医科大学眼科
指導責任者	教授 堀田 喜裕
共同研究者名	朝岡 亮、大石健太郎、細野克博、 大坪正史、蓑島伸生

要 旨

緑内障は、高齢化社会における失明原因として最も重要な眼疾患のひとつである。緑内障は、多因子性と言われているが、遺伝要因が非常に大きく、その主要な病型である原発開放隅角緑内障 (POAG) の場合、患者の数%~約半数の頻度で家族性であることが報告されている。POAG の原因遺伝子はこれまでに、ミオシリン (MYOC)、オプチニューリン (OPTN)、WDR36 の 3 種類が、他に先天性緑内障の原因遺伝子 CYP1B1 が同定されたが、これらの遺伝子に変異が見られるのは、家族性症例の数パーセント程度である。筆者の所属研究室では、緑内障の発症機構の理解と臨床への応用のために、より多くの症例の原因となる新規原因遺伝子の探索と発症機序の追究を行っている。筆者は、それらの研究の一環として、重要な研究資材となる家族性症例の収集と検体調製を行うとともに、実際の遺伝子変異探索、原因遺伝子の機能解析を行った。緑内障症例については、日本人 69 家系 (患者 166 人) のうち、116 人 (患者 111 人、非発症者 5 人) の血液から DNA を抽出し、株化もほぼ全例成功した。また、収集した症例を新規原因遺伝子探索に用いるために、既知原因遺伝子に変異のある症例は除外する必要があるため、まず WDR36 遺伝子についてプレスクリーニングを行った。その結果、エクソン上には塩基変化は見つからなかったが、イントロンで IVS12+90C>T、IVS13+89G>A、IVS17-30A>G の 3 つの多型と思われる変化を認めた。そのうち、IVS17-30A>G は新規の多型であった。さらに、既知原因遺伝子 OPTN の機能解析の一つとして、OPTN タンパクと bZIP 転写因子 NRL (Neural Retina Leucine zipper) タンパクとの相互作用の検討を行った。その結果、ラットの視細胞の細胞質および核における OPTN の発現を初めて検出し、視細胞の核において OPTN と NRL (網膜色素変性の原因遺伝子) が相互作用することを強く示唆することができた。

Key Words 緑内障, 原因遺伝子, WDR36, 変異

緒 言 :

緑内障は、中国、日本を含めた高齢化社会における失明原因として症例数が非常に多い重要な眼疾患のひとつであり、治療法、治療薬の開発は喫緊の課題である。緑内障は多因子性と言われているが、遺伝的要因が大きく、患者の数%~約半数の頻度で家族性を示すことが報告されている。一方、遺伝的要因以外の要因にも発症が左右されることが知られており、総括すれば多因子性・多遺伝子性疾患と考えられる。原因遺伝子については、緑内障の主要な病型である原発開放隅角緑内障 (POAG) と正常眼圧緑内障 (NTG) の場合、ミオシリン (MYOC)、オプチニューリン (OPTN)、WDR36 の 3 種類が現在までに同定された。他に、先天性緑内障では CYP1B1 が同定された。しかし、これらの遺伝子に変異が見つかるのは家族性症例全体の数%でしかなく、他の大多数の症例の発症を説明できる未知の原因遺伝子が存在すると考えられる。既知の原因遺伝子の機能、変異による発症の分子機序も不明である。

筆者の所属研究室では、緑内障の発症機構の理解と臨床への応用、オーダーメイド医療の確立のために、より多くの症例の原因となる新規原因遺伝子の探索と発症機序の追究を行っている。筆者は、それらの研究の一環として、重要な研究資材となる家族性症例の収集と検体調製を行うとともに、実際の遺伝子変異探索、原因遺伝子の機能解析を行った。具体的には以下の3点に関して研究を遂行した。

1. 新規原因遺伝子同定に活用するための緑内障家族性症例の収集
2. 収集した症例における既知原因遺伝子変異のプレスクリーニング
3. オプチニューリンと網膜色素変性の原因遺伝子タンパク NRL の相互作用の解析

対象と方法：

1. 新規原因遺伝子同定に活用するための緑内障家族性症例の収集

対象疾患は、原発開放隅角緑内障 (POAG)、正常眼圧緑内障 (NTG)、高眼圧症 (OH) とした。浜松医科大学附属病院及び関連病院を受診したそれらの疾患の患者で、家族にそれらの疾患のいずれかを有する例について収集対象とした。インフォームドコンセント取得後、末梢血を 10ml 採取した。5ml の血液から分離したリンパ球に EB ウイルスを感染させ、不死化 B リンパ球株の確立を試みた。残り 5ml の血液からは DNA を抽出した。

2. 収集した症例における既知原因遺伝子変異のプレスクリーニング

前項で収集した緑内障症例は、新規原因遺伝子の探索に用いるため、既知原因遺伝子に変異のある症例はプレスクリーニングにより除外する必要がある。そこで、まず WDR36 遺伝子の変異をスクリーニングした。末梢血から抽出した DNA を鋳型として、WDR36 遺伝子のエクソン領域を PCR 法で増幅し、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を解析した。

3. オプチニューリンと網膜色素変性の原因遺伝子タンパク NRL の相互作用の解析

筆者の所属研究室では、緑内障の原因遺伝子の一つである OPTN の機能と緑内障の発症機序を解析するために、OPTN と相互作用するタンパクの酵母 2 ハイブリッド法によるスクリーニングが行われている。その過程で、bZIP 転写因子 NRL (Neural Retina Leucine zipper) タンパクが OPTN と結合する可能性が示唆された。NRL 遺伝子は、網膜色素変性の原因遺伝子としても知られている。筆者は、二つの重要な遺伝性眼疾患の原因遺伝子が相互作用する可能性に注目して、その実験的証明を以下のように行った。

- (1) NRL と OPTN の cDNA をそれぞれ HA タグ、FLAG タグ配列を含むベクターにクローニングし、HeLaS3 細胞に共導入してタグ抗体による共免疫沈殿の後、ウェスタンブロット法 (WB 法) で相互作用の検討を行った。
- (2) ラットの眼球を摘出し、ホルマリン固定パラフィン包埋の組織切片を作製し、抗 NRL 抗体と抗 OPTN 抗体で蛍光抗体染色を行った。
- (3) ラット神経網膜組織から核と細胞質の両画分を調製して、WB 法と共免疫沈殿法で両タンパクの相互作用を検討した。

結 果：

1. 新規原因遺伝子同定に活用するための緑内障家族性症例の収集

POAG、NTG、OH の日本人家系の収集および不死化 B リンパ球株の樹立を行った。現在までに、収集された日本人 69 家系 (患者 166 人) のうち、116 人 (患者 111 人、非発症者 5 人) の血液から DNA を抽出し、株化もほぼ全例 (114/116) 成功した。

2. 収集した症例における既知原因遺伝子変異のプレスクリーニング

WDR36 遺伝子のエクソンとエクソン近傍のイントロン領域を解析した結果、エクソン上には塩基変化は見つからなかったが、イントロンで IVS12+90C>T、IVS13+89G>A、IVS17-30A>G の 3 つの多型と思われる変化を認めた。そのうち、IVS17-30A>G は未報告の新規の多型であった。

3. オプチニューリンと網膜色素変性の原因遺伝子タンパク NRL の相互作用の解析

- (1) HeLaS3 細胞で NRL と OPTN を共発現させて、抗 FLAG 抗体で NRL を免疫沈殿したところ、WB 法で HA タグ付き NRL (33 kDa) のバンドが認められた。抗体を逆の順序で用いたところ、FLAG タグ付き OPTN (69 kDa) のバンドが認められた。即ち、両者は HeLaS3 の中で結合することが示された。
- (2) ラット眼組織において、NRL は外顆粒層（視細胞の核）に発現していた。一方、OPTN は、視細胞内節、外網状層に加え、外顆粒層にも発現していた。外顆粒層における OPTN は主として細胞質に蛍光染色が見られたが、核は染色の見られる細胞と見られない細胞が混在していた。この結果は、OPTN が視細胞に存在し、一部はその核にも存在することを示し、視細胞核内での NRL との相互作用の可能性を示唆した。
- (3) ラット眼組織から調製した神経網膜の核画分には細胞質画分に比して少量ではあるが OPTN が存在することが WB 法で確認できた。そこで、核画分から抗 OPTN 抗体で免疫沈殿を行い、抗 NRL 抗体で WB 法を行ったところ、NRL が検出された。

考 察 :

1. 家系性緑内障症例の検体の収集と不死化 B リンパ球株の確立は順調に行うことができた。失敗例は、いずれも末梢血の新鮮度が落ちていた例（採取後 5~7 日経過）であり、新鮮血での成功率は 100%であった。
2. 日本人緑内障家系の WDR36 遺伝子に、従来報告されていない IVS17-30A>G を含め、合計 3 種類の多型と思われる塩基変化を認めた。緑内障の原因遺伝子は 4 種類 (WDR36, OPTN, MYOC, CYP11B1) 知られているが、それらに変異が見つかる症例は数%にすぎない。緑内障原因遺伝子解析は、病態の正確な把握と確定診断に有用であるばかりでなく、治療法、治療薬開発にも直結する知見を得られる可能性も大きいので、今後も積極的に進める計画である。
3. 視細胞での OPTN の発現の報告は本研究が初めてである。培養細胞での実験で、OPTN は細胞に H₂O₂ 処理等のストレスにより核に移行することが報告されており、一部の視細胞のみで核に OPTN が存在する現象には、ストレスなどの細胞の状態が関与している可能性がある。これまでに OPTN と結合するタンパクは、Huntingtin, TFIIIA, Rab8 などが報告されたが、眼に特異的なタンパクとの相互作用は、本報告の NRL が最初である。OPTN は眼以外の組織でも機能するタンパクであるにも関わらず、その変異が緑内障のみを起す理由は、今後解明されねばならないが、眼に特異的なタンパクとの相互作用が、その糸口となる可能性は大きい。また、視細胞の核で OPTN が NRL と相互作用することの意味は不明であるが、OPTN の視細胞での機能とともに解析する必要がある。さらに、OPTN の変異が神経節細胞のみならず視細胞に与える影響をノックアウトマウス等を用いて解析することで、緑内障と網膜色素変性の病態とともに、神経網膜の細胞死に関しての新しい知見が得られる可能性がある。

参考文献 :

1. Monemi S, Spaeth G, DaSilva A, et al. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Hum Mol Genet.* 2005;14(6):725-733.
2. Kramer PL, Samples JR, Monemi S, et al. The role of the WDR36 gene on chromosome 5q22.1 in a large family with primary open-angle glaucoma mapped to this region. *Arch Ophthalmol.* 2006;124(9):1328-1331.
3. Stone EM, Fingert JH, Alward WL, et al. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science.* 1997;275:668-670.
4. Rezaie T, Child A, Hitchings R, et al. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science.* 2002;295:1077-1079.
5. Hauser MA, Allingham RR, Linkroum K, et al. Distribution of WDR36 DNA sequence variants in patients with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:2542-2546.

6. Bessant DA, Payne AM, Mitton KP, et al. A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* 1999;21:355-356.
7. Kroeber M, Ohlmann A, Russell P, Tamm ER. Transgenic studies on the role of optineurin in the mouse eye. *Exp Eye Res.* 2006;82:1075-1085.
8. De Marco N, Buono M, Troise F, Diez-Roux G. Optineurin increases cell survival and translocates to the nucleus in a Rab8-dependent manner upon an apoptotic stimulus. *J Biol Chem.* 2006;281:16147-16156.
9. Hattula K, Paranen J. FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis. *Curr Biol.* 2000;10:1603-1606.
10. Moreland RJ, Dresser ME, Rodgers JS, et al. Identification of a transcription factor IIIA-interacting protein. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:1986-1993.
11. Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, et al. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol.* 2005;169:285-295.

注：本研究は、2008年12月9日「日本分子生物学会年会」にてポスター発表。

作成日：2009年3月10日