

## 角膜内皮組織の標準的な遺伝子発現情報基盤の構築

～深刻な視力障害を引き起こす眼疾患研究に有用な新たな標準基盤情報の提供～

京都府立医科大学大学院医学研究科ゲノム医科学の 徳田雄市 プロジェクト研究員、中野正和 准教授、田代啓 教授は、同志社大学生命医科学研究科ティッシュエンジニアリング研究室の 小泉範子 教授、奥村直毅 教授らの研究グループと共同で、次世代シーケンサーを用いて取得した角膜内皮細胞の包括的な遺伝子発現情報についてまとめ、本件に関する論文が2020年11月20日付で国際的な学術雑誌出版社Springer Natureの出版するオンラインジャーナル「Scientific Data」に掲載されました。

本研究では、眼疾患の無い7名の白人ドナー由来の角膜内皮細胞について、本学大学院中央研究室・次世代シーケンサー室にて、網羅的な遺伝子発現情報の取得と解析を実施しました。その結果、従来の研究データに比べてより網羅的かつ高精度な角膜内皮組織の新たな標準データを国際的なバイオデータベースに提供することができました。本研究成果は、日本国内では各種法令等により研究試料として供されることが比較的困難な健常者の角膜内皮組織における遺伝子発現の基盤情報として有用であるため、フックス角膜内皮ジストロフィー※1 など深刻な視力障害を引き起こす眼疾患の病態解明や創薬研究への応用が期待されます。

※1 フックス角膜内皮ジストロフィー (Fuchs endothelial corneal dystrophy、FECD) : 角膜内皮の直下に「Guttae (グッター)」と呼ばれる特有の滴状の構造物が形成されていくと同時に、角膜内皮細胞が障害され重度の視力障害を生じる進行性の難治性疾患。角膜移植が唯一の治療法であり、薬物治療等の開発が待たれる。

### 【論文基礎情報】

掲載誌情報	雑誌名 : Scientific Data 発表媒体 : <input checked="" type="checkbox"/> オンライン速報版 <input type="checkbox"/> ペーパー発行 <input type="checkbox"/> その他 雑誌の発行元国 : 英国 オンライン閲覧 : <input type="checkbox"/> 不可 <input checked="" type="checkbox"/> 可 (URL) <a href="https://www.nature.com/articles/s41597-020-00754-1">https://www.nature.com/articles/s41597-020-00754-1</a> 掲載予定日 現地時間2020年11月20日
論文情報	論文タイトル (英・日) Transcriptome dataset of human corneal endothelium based on ribosomal RNA-depleted RNA-Seq data (リボソームRNA除去済RNA-Seqデータに基づくヒト角膜内皮の網羅的な転写産物データセット)

	<p><b>責任著者</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 京都府立医科大学大学院医学研究科ゲノム医科学 准教授 中野 正和</li> </ul> <p><b>共筆頭著者</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 京都府立医科大学大学院医学研究科ゲノム医科学 プロジェクト研究員 徳田 雄市</li> <li>・ 同志社大学生命医科学研究科ティッシュエンジニアリング研究室 教授 奥村 直毅</li> </ul> <p><b>共同著者</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 同志社大学生命医科学研究科ティッシュエンジニアリング研究室 大学院生 小森 裕也</li> <li>・ 同志社大学生命医科学研究科ティッシュエンジニアリング研究室 大学院生 花田 尚也</li> <li>・ 京都府立医科大学大学院医学研究科ゲノム医科学 教授 田代 啓</li> <li>・ 同志社大学生命医科学研究科ティッシュエンジニアリング研究室 教授 小泉 範子</li> </ul>
<p>研究情報</p>	<p><b>研究課題名</b></p> <p>私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性角膜疾患に対するトランスレーショナル研究の推進と国際的研究拠点の形成」</p> <p><b>代表研究者</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 同志社大学生命医科学研究科ティッシュエンジニアリング研究室 教授 小泉 範子</li> </ul>

**【論文概要】**

**1 研究分野の背景や問題点**

角膜は眼球の最前部に位置する透明な組織で、レンズのように光の屈折を調節しています。この角膜は非常に薄い5層の組織でできており、中でも角膜の一番内側に位置する「角膜内皮細胞」の層は、角膜を透明に維持するための重要な役割を担っています。(図1)しかし、「フックス角膜内皮ジストロフィー」などの眼疾患で角膜内皮の障害が進むと、その機能が回復しないため視力に深刻な障害をきたします。このような疾患の多くは未だに病因・病態が不明なものが多く、有効な治療法が角膜移植以外に存在しません。

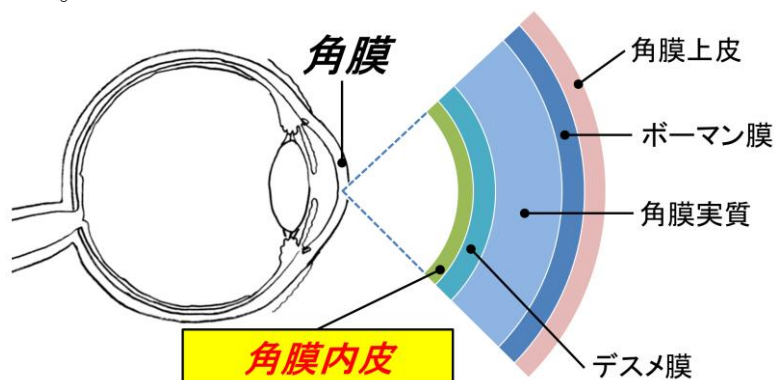


図1 角膜組織の模式図

一方、ヒトの角膜組織は日本国内では移植目的以外の研究利用が禁じられていることから、研究が進み難い状況にあります。もし、ヒトの正常な角膜内皮細胞に関する基本的な知見（例えばどのような遺伝子が特異的に発現しているか）が深まれば、疾患に関連する遺伝子の推定や、疾患モデル生物や細胞との比較研究が可能になります。

そこで本研究では、海外のアイバンクから入手したヒトの角膜内皮細胞の遺伝子発現情報について、次世代シーケンサーを用いたRNA-Seqデータとして新たな基盤を構築することを目指しました。

## 2 研究内容・成果の要点

本研究では、海外のアイバンクから入手した眼疾患の無い7名の白人ドナー（48～69歳、男性：3名、女性：4名）由来の角膜から角膜内皮細胞を丁寧に分離し、角膜内皮細胞から発現した遺伝物質である“RNA”を抽出しました。この微量なRNAから効率的に遺伝子発現情報を取得するため、タカラバイオ社の「SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2 - Pico Input Mammalian」という試薬を用いて、解析の妨げとなる「リボソームRNA」を除去した上で、より安定的な“cDNA”を合成しました。そしてこのcDNAをもとに、本学大学院中央研究室・次世代シーケンサー室に設置されたイルミナ社の「HiScanSQ System」を用いて、角膜内皮細胞内で発現している網羅的な遺伝子発現情報をRNA-Seqデータとして取得・解析しました。

本研究では、cDNAの各断片に対し両端から100塩基分ずつ配列を読み取ることで検体あたり約2,400万から4,500万個の遺伝子発現情報の取得に成功しました。従来の研究では、片側から50塩基分のみのデータ取得が多く、また一部では培養した角膜内皮を用いていたことから、培養などの人為的な操作の無い純粋な角膜内皮細胞から得られた遺伝子発現情報としては、これまでで最も網羅的かつ高精度なデータになります。

遺伝子発現の基盤情報として有用であるためには、“正常な角膜内皮細胞”としての均質性が求められますが、今回用いた検体は独立した7検体であるため個体差に起因する遺伝子発現のバラつきが危惧されました。そこで我々は、主成分分析（図2a）と相関係数（図2b）という2種類の方法でRNA-Seqデータの均質性を評価しました。主成分分析では、データに対して92.84%の寄与率を示す第1主成分（図2aの横軸方向、PC1）では各検体のバラつきはかなり小さく、逆に検体間のバラつきが大きい第2主成分（図2bの縦軸方向、PC2）の寄与率は2.86%程度でした。また相関係数に関しても、全体的的に0.9前後の高い正の相関を見せていることから、個人差を考慮しても“正常な角膜内皮細胞”として十分な均質性を確保出来ているものと考えられました。

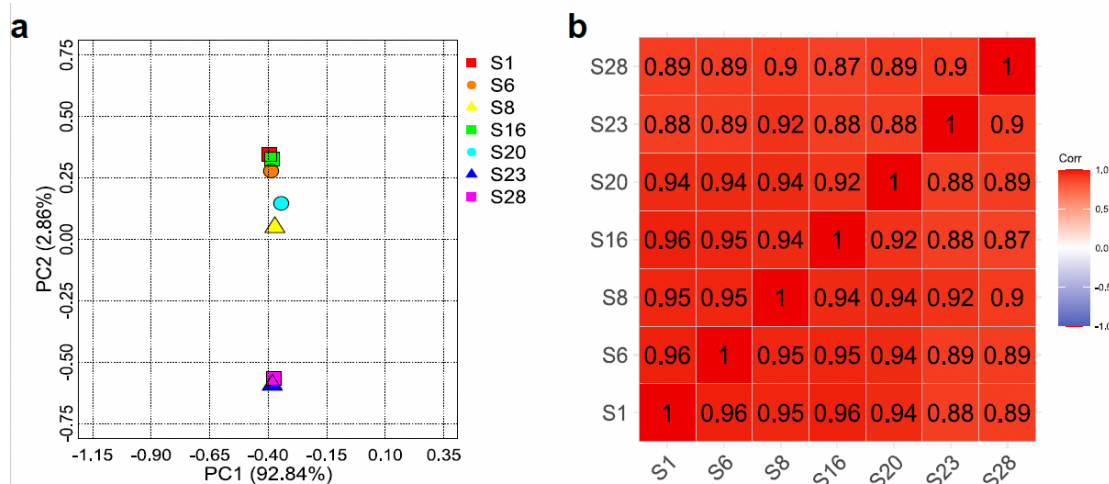


図2 検体間の均質性をみる主成分分析 (a) 及び相関係数 (b) の結果

最後に、本研究で取得したRNA-Seqデータにおいて角膜内皮細胞の特徴に合った遺伝子が発現しているかを先行研究の情報を参考にして調べました(図3)。ここでは今までに角膜上皮、角膜実質および角膜内皮の各組織に特異的に発現していることが報告されている遺伝子(組織特異的マーカー)が我々のRNA-Seqデータでどれくらい発現しているかを「ヒートマップ」としてまとめています。この結果より、角膜上皮と角膜実質のマーカーでは発現量が少ない事を示す青色、逆に角膜内皮マーカーでは発現量が多い事を示す赤色が表示されています(なお、角膜内皮マーカーの一つであるTJP1は、引用した論文がタンパク質の発現量について解析したものであったため、RNAの発現量が少なかった今回の結果と矛盾していません)。

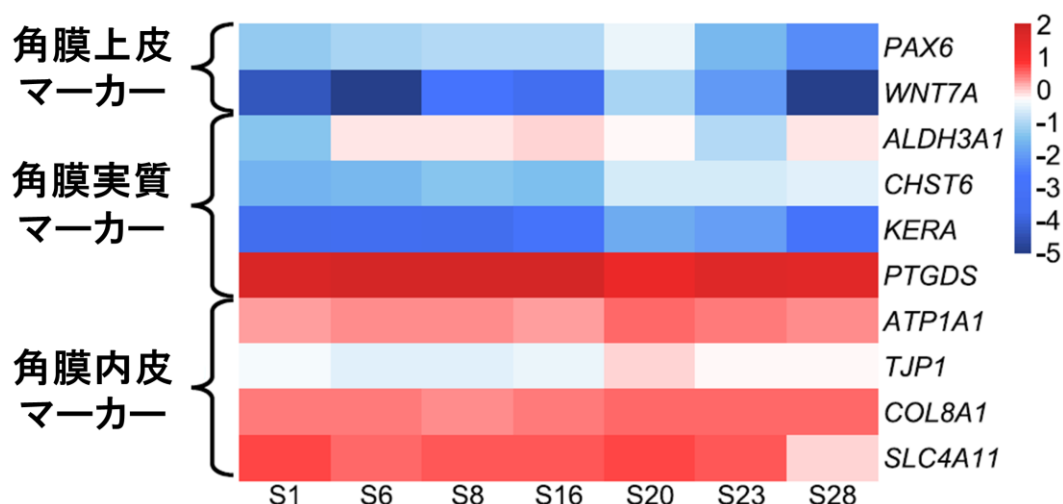


図3 角膜の各組織特異的マーカーにおける発現量

### 3 今後の展開と社会へのアピールポイント

本研究は、従来の研究に比べてより網羅的かつ高精度に角膜内皮細胞の遺伝子発現情報を次世代シーケンサーにより取得・解析したものであり、7人分の正常検体の全体像を捉えたことで、研究試料として使用に制限のある正常角膜内皮組織の新たな標準基盤となるデータセットが構築できたと考えられます。既に本研究の成果は、国際的なバイオデータバンクである「国際塩基配列データベース(International Nucleotide Sequence Database Collaboration、INSDC)」を構成する、国立遺伝学研究所が運営する「日本DNAデータバンク(Data Bank of Japan、DDBJ)」において公開されています(URL: <https://ddbj.nig.ac.jp/DRASearch/study?acc=DRP006678>)。

本データは、健常者における遺伝子発現情報の基盤として各種の視力障害を引き起こす眼疾患の病態解明や創薬研究への有効活用が期待されます。

<p>&lt;研究に関すること&gt;          京都府立医科大学大学院ゲノム医科学          准教授 中野 正和          電話：075-251- 5347          E-mail：manakano@koto.kpu-m.ac.jp</p>	<p>&lt;広報に関すること&gt;          広報センター [事務局：企画・研究支援課] 土屋          電話：075-251-5804          E-mail：kouhou@koto.kpu-m.ac.jp</p>
---	--