

称号及び氏名	博士(獣医学)	小西 静香
学位授与の日付	2022年3月31日	
論文名	Analyses of genetic and retinal lesions in <i>Ccdc85c</i> knockout rats: a rat model of genetic hydrocephalus (新規水頭症モデル <i>Ccdc85c</i> ノックアウトラットの遺伝および網膜病変の解析)	
論文審査委員	主査	桑村 充
	副査	岡田 利也
	副査	長谷川 貴史

## 論文要旨

### 緒言

水頭症は脳脊髄液が脳室内に貯留して脳内の圧力が高まり、脳室の拡張と脳の萎縮、それらに伴う脳の機能や発達障害を引き起こす疾患である。また、ヒトの先天性水頭症は、出生異常の中でも発症頻度が高く、新生児の約 1000 人に 1 人の割合で見られる。モデル動物が病理発生の解明に貢献すると期待されている。

**Hemorrhagic hydrocephalus (*hhy*)** マウスは、大阪府立大学理学部の動物施設にて発見された出血を伴う先天性水頭症を示すミュータントマウスであり、第 12 番染色体上に存在する **coiled-coil domain-containing 85c (*Ccdc85c*)** 遺伝子の欠損が原因であることが明らかになった。*hhy* マウスにおいて、脳では水頭症に加えて脳出血、異所性灰白質が、眼球ではロゼット形成を特徴とした網膜異形成が認められた。

**CCDC85C** 蛋白の機能を解析するためには、複数の動物種を用いて多面的な機能解析が必要である。そこで、当研究室の先行研究で、**Transcriptional activator like effector nuclease (TALEN)** を用いたゲノム編集によって **F344** 系統を背景系統とする *Ccdc85c* ノックアウト (**KO**) ラットを作製した。先行研究によって、*Ccdc85c* **KO** ラットにおいても水頭症が確認され、*hhy* マウスと類似した水頭症モデル動物となることが示された。

本研究では、**CCDC85C** 蛋白の詳細な機能を解析することを目的とし、この *Ccdc85c* **KO** ラットの欠損遺伝子配列を明らかにし、脳と同じく中枢神経系である網膜の形態発生を正常ラットおよび *Ccdc85c* **KO** ラット (ホモ型) において詳細に観察した。

## 第1章 *Ccdc85c* KO ラットの病態・遺伝子解析

### 第1節 *Ccdc85c* KO ラットの一般状態

*Ccdc85c* KO ラットは生後 14 日齢頃から頭部の腫大がみられ始め、生後 30 日齢ほどで死亡した。これらの表現型はホモ型ラットのみが発症し、ヘテロ型ラットでは発症しなかった。ヘテロ型ラット同士の交配によりこれまでに 319 匹の産子が得られ、その遺伝子型の内訳は、ホモ型が 50 匹 (15.7%)、野生型 91 匹 (28.5%)、ヘテロ型 178 匹 (55.8%) であった。潜性 (劣性) 遺伝と期待されるホモ型の割合 25% よりも低値であった。

### 第2節 *Ccdc85c* KO ラットの脳の組織学的異常

HE 染色により脳を病理組織学的に解析したところ、側脳室のみが拡張した水頭症、側脳室背側面の上衣細胞の欠損が確認され、さらに上衣細胞の欠損部位の直上の脳実質に帯状の異所性灰白質が認められた。

### 第3節 *Ccdc85c* KO ラットの遺伝子解析

生後 2-3 週齢前後に行う個体識別のために切除した耳介組織を使用して、PCR 産物を直接 DNA シークエンスした。野生型では約 900、ホモ型では約 550 bp の PCR 産物が得られ、ホモ型の欠損部位は、第 6 染色体のエクソン 1 を含む 355-bp (g. 132,183,075 - 132,183,429del1355; NCBI NC\_005105.4) であることが判明した。

以上より、*Ccdc85c* は常染色体潜性 (劣性) 遺伝であり、メンデルの法則に従っていないことから、一部は胎生致死の可能性がある。*Ccdc85c* KO ラットの大脳では、水頭症と上衣細胞の欠損を伴う異所性灰白質の形成がみられ、ラットの大脳の発生においてもマウスと同様に CCDC85C 蛋白が重要な役割を果たしていることがわかった。

## 第2章 正常ラットの網膜における CCDC85C 蛋白発現と関連蛋白の発現

### 第1節 正常ラット網膜の経時的な形態的発生

ラットの正常な網膜の形態発生における CCDC85C 蛋白の発現を F344 ラットで確認した。胎齢 19 日から生後 4 日齢までは分厚い神経芽細胞層が見られ、生後 6 日齢から内顆粒層と外顆粒層にわかれ、生後 13 日齢以降で桿体錐体層が認められた。

### 第2節 正常ラット網膜の免疫組織化学的解析

網膜発生における主要な蛋白発現を免疫組織化学法によって解析した。CCDC85C 蛋白は、タイトジャンクションが存在する領域である外境界膜 (外顆粒層と桿体錐体層の間; ミュラー細胞と視細胞内節の接続部位) に胎齢 19 日から生後 12 週齢まで持続的に発現していることを確認した。ZO-1 (タイトジャンクションマーカー) は胎齢 19 日から生後 12 週齢まで持続的に CCDC85C 蛋白と共局在していた。視細胞の内節および外節の形成に重要な網膜線毛の発生時期を確認するために  $\alpha$ -tubulin (線毛マーカー) と CROCC (線毛の根元 rootlet マーカー) の免疫組織化学法で解析した。CROCC は胎齢 19 日から外境界膜付近に発現しており、生後 13 日齢から桿体錐体層に伸長し、 $\alpha$ -tubulin は生後 6 日齢から桿体錐体層に伸長し始めて、生後 20 日齢で成獣での発現領域である内節と外節の間に発現していた。GS (glutamine synthetase、ミュラー細胞マーカー) は生後 6 日齢までは外境界膜のみに発現し、生後 13 日齢以降で外境界膜から神経線維層にかけて発現が認められた。

### 第3節 正常ラット網膜の超微細構造

正常ラット網膜における CCDC85C 蛋白の免疫電子顕微鏡観察において、CCDC85C 陽性像は外顆粒層と視細胞内節の間に帯状に認められ、タイトジャンクションと類似した構造形態を示した。

以上より、正常ラット網膜において、CCDC85C 蛋白は胎齢 19 日から生後 12 週齢まで持続的に外境界膜に ZO-1 と共局在しており、タイトジャンクションに関連することが示された。

## 第3章 *Ccdc85c* KO ラットにおける網膜病変

### 第1節 眼科検査

組織的に網膜病変が認められる日齢に相当する生後 24 日齢のホモ型、野生型、ヘテロ型の眼球を眼底カメラで撮影した結果、3つの遺伝子型間における違いは認められなかった。生後 26 日齢の光干渉断層撮影 (OCT) 像において、ホモ型では内顆粒層に高輝度の帯状構造がみられ、外境界膜と桿体錐体層の輝度の低下がみられた。

### 第2節 *Ccdc85c* KO ラットの網膜の組織形態

*Ccdc85c* KO ラットの生後 13 日齢から網膜病変が認められた。網膜病変は、外顆粒層の核が巣状に桿体錐体層に認められる網膜異形成と、内顆粒層の二層化であった。免疫組織化学法によって、*Ccdc85c* KO ラットの網膜異形成領域では、CCDC85C、CROCC、 $\alpha$ -tubulin、ZO-1、Sopsin (外節の光受容タンパク質マーカー) の発現が欠如していた。*Ccdc85c* KO ラットの網膜異形成が認められない領域においては、CROCC、 $\alpha$ -tubulin、ZO-1 が発現しているものの、CROCC、 $\alpha$ -tubulin 陽性の線毛数が少なく見えた。さらに、生後 20 および 30 日齢の *Ccdc85c* KO ラットでは、網膜異形成領域か否かにかかわらず、内顆粒層において GS の発現が層に平行にみられ、ミュラー細胞の発達・走行異常が示唆された。

### 第3節 線毛の超微細構造

電子顕微鏡観察において *Ccdc85c* KO ラットの網膜異形成領域では、視細胞内節および外節が全く形成されておらず、タイトジャンクションも認められなかった。網膜異形成がない領域では、視細胞内節、外節および線毛を認めたものの、視細胞外節の配列異常が観察された。*Ccdc85c* KO ラットの線毛の微細構造を確認するために、*Ccdc85c* KO ラットの気管上皮細胞を電子顕微鏡で観察したが、線毛の形態的な異常は認められなかった。

以上より、*Ccdc85c* KO ラットにおいて、視細胞の内節・外節・線毛形成が進行中の時期である生後 13 日齢以降で網膜病変がみられ、その形態的特徴は、外顆粒層の核が巣状に桿体錐体層に認められる網膜異形成と内顆粒層の二層化であった。*Ccdc85c* KO ラットの網膜において、部分的なタイトジャンクション欠損により、二次的に部分的な視細胞の内節・外節・線毛形成不全とミュラー細胞の走行異常を生じる可能性が示された。

## 第4章 ヒトの疾患との病態比較について総合考察

*Ccdc85c* KO ラットの脳および網膜病変の共通点は、病変形成部位が中枢神経系かつ

線毛関連領域であることから、線毛病が疑われた。ヒト網膜線毛病には、錐体桿体ジストロフィーも含め様々な症候群が報告されている。線毛病に関与する蛋白は、タイトジャンクション蛋白または他のジャンクション蛋白との複合体中に存在するか、または線毛形成前に基底側表面との関連を有することが報告されている。

以上のことから、*Ccdc85c* KO ラットの病態は、線毛形成あるいは機能不全に基づく線毛病の 1 種であり、網膜病変は網膜線毛病に相当すると考えられた。網膜病変の病態発生機序として、視細胞内節とミュラー細胞間のタイトジャンクションの部分的な欠如による細胞極性喪失が疑われた。CCDC85C 蛋白は、タイトジャンクション複合体の可能性が高い。

## 総括

本研究では、*Ccdc85c* KO ラットの遺伝子欠損配列を明らかにし、中枢神経系（大脳および網膜）の形態発生を詳細に観察することで、CCDC85C 蛋白の機能を解析し、以下の結論を得た。

1. 脳病変の特徴として、水頭症（側脳室の拡張）、異所性灰白質、側脳室背側面の上衣細胞の欠損が認められた。
2. 出生率は約 15.7% で常染色体潜性遺伝し、一部胎生致死の可能性はある。  
遺伝子欠損部位は、第 6 染色体のエクソン 1 を含む 355-bp (g. 132,183,075 - 132,183,429del355; NCBI NC\_005105.4) であることが明らかとなった。
3. 網膜病変の特徴として、網膜異形成（視細胞外節の配列異常、視細胞の内節・外節・線毛の形成不全、タイトジャンクションの欠如）、内顆粒層の二層化（ミュラー細胞の発達・走行異常）が認められた。
4. 正常ラット網膜において、CCDC85C 蛋白は、胎齢 19 日から生後 12 週齢まで持続的に外境界膜にタイトジャンクションマーカーである ZO-1 と共発現しており、免疫電顕による CCDC85C 蛋白の微細構造はタイトジャンクションと類似した構造形態であった。以上より、CCDC85C 蛋白はタイトジャンクション複合体の可能性が高い。
5. 線毛病の 1 種である線毛形成不全が疑われた。網膜病変は視細胞の内節・外節の形成不全であり、網膜線毛病に相当すると考えられた。

## 審査結果の要旨

水頭症は脳脊髄液が脳室内に貯留して脳内の圧力が高まり、脳室の拡張に伴う脳の機能や発達障害を引き起こす疾患である。ヒトの先天性水頭症は、出生異常の中でも発症頻度が高く、新生児の約 1000 人に 1 人の割合でみられる。水頭症の病理発生の解明には、モデル動物が貢献すると期待されている。

Hemorrhagic hydrocephalus (*hhy*) マウスは、大阪府立大学理学部の動物施設にて発見された出血を伴う先天性水頭症を示すミュータントマウスであり、coiled-coil domain-containing 85c (*Ccdc85c*) が原因遺伝子である。*Ccdc85c* 遺伝子の機能を解析す

るためには、複数の動物種を用いて多面的な機能解析が必要である。Transcriptional activator like effector nuclease (TALEN)を用いたゲノム編集によって F344 系統を背景系統とする *Ccdc85c* ノックアウト (KO) ラットが作製された。本研究では、*Ccdc85c* KO ラットの欠損遺伝子配列を明らかにし、脳と同じく中枢神経系である網膜の形態発生を正常ラットおよび *Ccdc85c* KO ラット (ホモ型) において詳細に観察した。

第 1 章では、*Ccdc85c* KO ラットの病態を解析した。ホモ型ラットは生後 14 日齢頃から頭部の腫大がみられ始め、生後 30 日齢ほどで死亡した。これらの表現型はホモ型ラットのみが発症し、ヘテロ型ラットでは発症しなかった。HE 染色により脳を病理組織学的に解析したところ、側脳室のみが拡張した水頭症、側脳室背側面の上皮細胞の欠損が確認され、さらに上皮細胞の欠損部位の直上の脳実質に帯状の異所性灰白質が認められた。耳介組織から抽出した DNA を用いて、PCR 産物を直接 DNA シークエンスした。野生型では約 900bp、ホモ型では約 550 bp の PCR 産物が得られ、ホモ型の欠損部位は、第 6 染色体のエクソン 1 を含む 355-bp (g. 132,183,075 - 132,183,429del1355; NCBI NC\_005105.4) であることが明らかになった。以上から、ラットの大脳の発生においてもマウスと同様に CCDC85C 蛋白が重要な役割を果たしていることがわかった。

第 2 章では、ラットの正常な網膜の形態発生における CCDC85C 蛋白の発現を F344 ラットで確認した。免疫組織化学法によって、CCDC85C 蛋白はタイトジャンクションが存在する領域である外境界膜 (外顆粒層と桿体錐体層の間; ミュラー細胞と視細胞内節の接続部位) に胎齢 19 日から生後 12 週齢まで持続的に発現していることを確認した。ZO-1 (タイトジャンクションマーカー) は胎齢 19 日から生後 12 週齢まで持続的に CCDC85C 蛋白と共発現していた。視細胞の内節および外節の形成に重要な網膜線毛の発生時期を確認するために  $\alpha$ -tubulin (線毛マーカー) と CROCC (線毛の根元 rootlet マーカー) の免疫組織化学法で解析した。CROCC は胎齢 19 日から外境界膜付近に発現しており、生後 13 日齢から桿体錐体層に伸長し、 $\alpha$ -tubulin は生後 6 日齢から桿体錐体層に伸長し始めて、生後 20 日齢で成獣での発現領域である内節と外節の間に発現していた。以上より、正常ラット網膜において、CCDC85C 蛋白は胎齢 19 日から生後 12 週齢まで持続的に外境界膜に ZO-1 と共発現しており、タイトジャンクションに関連することが示された。

第 3 章では、*Ccdc85c* KO ラットにおける網膜病変を解析した。眼球を眼底カメラで撮影した結果、3 つの遺伝子型 (ホモ型、野生型、ヘテロ型) 間における違いは認められなかった。生後 26 日齢の同腹子の光干渉断層撮影像において、ホモ型では内顆粒層に高輝度の線状構造がみられ、外境界膜と内節/外節の輝度低下がみられた。

*Ccdc85c* KO ラットの生後 13 日齢から網膜病変が認められた。網膜病変は、外顆粒層の核が巢状に桿体錐体層に認められる網膜異形成と、内顆粒層の二層化であった。免疫組織化学法による観察では、*Ccdc85c* KO ラットの網膜異形成領域では、CCDC85C、CROCC、 $\alpha$ -tubulin、ZO-1、Sopsin (外節の光受容タンパク質マーカー) の発現が欠如していた。*Ccdc85c* KO ラットの網膜異形成が認められない領域においては、CROCC、 $\alpha$ -tubulin 陽性の線毛数が少なく見えた。電子顕微鏡観察において *Ccdc85c* KO ラットの網膜異形成領域では、視細胞内節および外節が全く形成されておらず、タイトジャンクションも認められなかった。網膜異形成がない領域では、視細胞内節、外節およ

び線毛を認めたものの、視細胞外節の配列異常が観察された。内顆粒層の二層化部と一致して GS (Glutamine synthetase ; ミュラー細胞マーカー) 陽性像が認められた。以上より、*Ccdc85c* KO ラットの網膜においてミュラー細胞の発達・走行異常と部分的なタイトジャンクション欠損により、二次的に部分的な視細胞の内節・外節・線毛形成不全になる可能性が示された。

第 4 章で *Ccdc85c* KO ラットとヒト疾患の病態比較を行った。*Ccdc85c* KO ラットの病態は、線毛形成あるいは機能不全に基づく線毛病の 1 種であり、網膜病変は網膜線毛病に相当すると考えられた。網膜病変の病態発生機序として、視細胞内節とミュラー細胞間のタイトジャンクションの部分的な欠如による細胞極性喪失が疑われた。CCDC85C 蛋白は、タイトジャンクション複合体の可能性が高いことを明らかにした。

本研究は新たな水頭症原因遺伝子である *Ccdc85c* の欠損モデルラットの特徴を明らかにし、*Ccdc85c* 遺伝子の生物学的機能の一端を明らかにした。基礎獣医学ならびに基礎医学の発展・展開に貢献するものと考えられる。従って、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。