

雑誌 新潟医学会雑誌
題名 Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations (RVCL-S)変異ヒト Trex1 発現ショウジョウバエの樹立
著者 加藤 怜
Rei Kato
所属 新潟大学医歯学総合研究科 分子細胞医学専攻 脳神経内科学
住所 〒951-8585
新潟市中央区旭町通 1-757 新潟大学脳研究所臨床神経科学部門
脳神経内科学分野
Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University,
1-757, Asahimachi-dori, Chuo-ku, Niigata 951-8585, Japan.
主任教授 小野寺理 教授 (脳神経内科学)

要旨

Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations (RVCL-S)はエキソヌクレアーゼ活性を持つ three-prime repair exonuclease 1 (TREX1) の遺伝子変異による常染色体優性遺伝疾患である。成人期に脳小血管病変を来し、10年ほどで致命的な転機をたどる。RVCL-Sを引き起こす変異ではエキソヌクレアーゼ活性を維持しているが、野生型で細胞質中の小胞体膜に局在している TREX1 が核の内部にも存在することが知られている。今までに RVCL-S の動物モデルとして複数の試みがされているが、TREX1 の変異が RVCL-S の分子病態にどのように関与しているのかは不明である。そこで、RVCL-S の病態機序解明のためには、より扱いやすい動物モデルの構築が望ましい。今回、RVCL-S で頻度の多い p.Val235GlyfsTer6 (*hTREX1 V235fs*)変異 TREX1 を発現させるためのショウジョウバエモデルを作製した。*hTREX1 V235fs* を発現したハエでは、TREX1 タンパク質は核を含む細胞全体でびまん性の局在を示した。また、野生型と比較して複眼の形態異常が有意に生じた。さらに、ハエ全神経細胞やハエグリア細胞に *hTREX1 V235fs* を発現した場合と比べてハエ気管に発現した際に毒性が高く、変異型 TREX1 の細胞毒性は組織特異性を有する可能性が示唆された。以上の実験によって、RVCL-S 変異ヒト TREX1 発現ショウジョウバエモデルを樹立した。本モデルは RVCL-S 病態解析のための遺伝子スクリーニングや薬剤スクリーニングに利用することが期待できる。

キーワード :

RVCL-S (Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations), TREX1, *Drosophila*

諸言

Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations (RVCL-S)はエキソヌクレアーゼの一種である three-prime repair exonuclease 1 (TREX1) 遺伝子の C 末端側のフレームシフト変異による常染色体優性遺伝疾患である。進行性の視覚障害を引き起こす血管網膜症と、神経学的巣症状を呈す脳小血管病変を引き起こす。現時点で、世界中で報告されているのは40家系¹⁾であり極めて希な疾患である。

神経症状として、片頭痛、認知機能障害、精神障害、けいれん発作を呈する。全身症状としては、肝疾患、腎症、高血圧、貧血、軽度のレイノー現象、胃腸出血、無症候性甲状腺機能低下症が報告されている²⁾。初期症状として20代以後に血管網膜症を、35歳頃から腎機能障害が顕在化、軽度の脳機能障害は50歳ごろから始まると報告されており、最終的に10年ほどで致命的な転機をたどる³⁾。脳画像所見として、MRIで40歳未満から点状の白質病変をテント上に生じ、40歳を超えると造影効果または拡散制限を伴う病変が出現し、そのコントラスト増強は長期間持続する⁴⁾。

脳組織においては、白質の虚血および壊死、石灰化を伴うフィブリノイド血管壊死や肥厚したヒアリン化血管が特徴である⁵⁾。また、腎生検による糸球体所見からは内皮下腔の拡大と毛細血管壁の二重化から内皮細胞障害が示唆されている⁶⁾。さらに、末梢神経、筋、腸管においても微小血管における内皮の変化が報告されている^{7,8)}。

TREX1 遺伝子変異がどのように RVCL-S の発症に関与しているかは明らかとなっていない。同遺伝子は RVCL-S のほかに Aicardi-Goutières 症候群、家族性凍傷状狼瘡、全身性エリテマトーデスの3つの自己免疫疾患との関与が報告されている^{9,10)}。これらの自己免疫疾患では、TREX1 エキソヌクレアーゼ活性を消失する変異が認められる^{9,11)}。一方で、RVCL-S を引き起こす変異ではエキソヌクレアーゼ活性を維持しているが、小胞体につなぎとめる膜貫通ドメインまたはその上流に変異をもっている。この事によって、野生型では細胞質中の小胞体膜に局在している TREX1 が核の内部にも存在することが知られている¹²⁾。このことから、核内の DNA を損なう毒性機能獲得が仮定されている。TREX1 は正常なヒトの脳内においては主に灰白質のミクログリアに発現し微小血管系に隣接しているが、RVCL-S 患者では白質に優位に発現し、虚血性脳病変によって発現が増加することが報告されている¹³⁾。

RVCL-S の動物モデルとして、B.E. O'Bryhim らはヘテロ接合型マウス Trex1 T235fs を作製し酸素誘発網膜症モデルでの無血管領域の増加、胚性線維芽球の γ H2AX のリン酸化の減少¹⁴⁾を、I.A. Mulder らはホモ接合型ヒト V235fs KI マウスを作製し死亡率増加、血管機能の変化、脳梗塞モデルでの梗塞体積の増加を報告してい

る¹⁵⁾。しかし、これらの研究でも *Trex1* の変異が *RVCL-S* の分子病態にどのように関与しているのかについては明らかとなっていない。

そこで、*RVCL-S* の病態機序解明のためには、より扱いやすい動物モデルの構築が望ましいと考えた。世代サイクルが2週間と短く、低コストで多数の個体を管理しやすいショウジョウバエを用いた。ショウジョウバエでは、大規模な変異系統および RNAi 系統が国内外のストックセンターに維持され容易に取得可能となっている。これらのことから、遺伝子スクリーニングをより簡便に行うことが可能である。そこで我々は、ヒト *Trex1* (*hTREX1*) を発現するショウジョウバエモデルを作製し、*RVCL-S* 変異がショウジョウバエでも毒性を発揮しているのか検証を行った。

材料と方法

1. ハエ系統

ハエは標準的なハエ餌を与え 25°C で維持した。

GMR-Gal4 (#1104)：発生中からハエ眼に発現する *Gal4* 系統

Tub-Gal4 (#5138)：全細胞で発現する *Gal4* 系統

c739-Gal4, UAS-CD8GFP (#64305)：kenyon cell の α/β ローブで発現する *Gal4* と *CD8GFP* を発現させる *UAS* 配列を同時に有している系統

repo-Gal4 (#7415)：全グリア細胞で発現する *Gal4* 系統

nSyb-Gal4 (#58763)：全神経細胞で発現する *Gal4* 系統

btl-Gal4, UAS-actinGFP (#8807)：気管で発現する *Gal4* と *actinGFP* を発現する *UAS* 配列を同時に有している系統。

UAS-Lucif.RNAi：*Luciferase* 遺伝子に対する *Inverted Repeat* 系統。ネガティブコントロールとして利用した。

上記は Bloomington Drosophila Stock Center (Bloomington, IN, USA) から入手した。

2. ウェスタンブロッティング

GMR-Gal4 によって視神経にタンパク質を発現させた。各 *hTREX1* を交配したハエを 29°C で飼育し、新たに産卵され羽化したメス個体 (n = 15) を Protease Inhibitor Cocktail set III (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) を添加した Lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% DDM) 中でソニケーションしサンプルを得た。ウェスタンブロッティングには、iBlot2 (Invitrogen, Waltham, MA, USA), iBlot2 PVDF Mini Stacks (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) を用いた。シグナル検出には、ECL Prime Detection System (Cytiva, Washington, D.C., USA) を説明書通り用いた。ゲル撮影には、Multi image II chemibox (BioTools, Gunma, Japan) を用いた。抗原抗体反応には、1次抗体としてマウス抗 myc 抗体 (9B11, 1:10000, Cell Signaling

Technology, Danvers, MA, USA)およびマウス抗 α -tubulin (T9026, 1:10000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)抗体を用い, 2次抗体として抗マウス抗体(SA00001-1, 1:10000 ; Proteintech, Rosemont, IL, USA)を用いた.

3. hTREX1 の UAS 系統の樹立

hTREX1 の UAS 系統を作製する為, 変異 TREX1 遺伝子¹⁶⁾を PCR で増幅したインサート断片を DNA Ligation Kit Mighty Mix キット(TakaraBio, Shiga, Japan)を用いて 20 × UAS-IVS-P10 ベクター¹⁷⁾に組み込んだ. この時, 挿入した各 TREX1 遺伝子には N 末端に myc tag (EQKLISEEDL) と 6His tag (HHHHHH) を付加した. 作製した組み換えベクターはショウジョウバエ胚にインジェクションし, ZH86Fb ランディングサイトに挿入した. この工程は Wellgenetics (Taipei, Taiwan) のインジェクションサービスに外注した.

4. 羽化率

各 hTREX1 をホモ接合で有する系統と, バランサー染色体とヘテロの各 Gal4 ドライバー系統を交配させた. これを, 25°Cで飼育し羽化した個体をバランサーのマーカの有無でカウントした. このとき, バランサーのマーカを有している個体は hTREX1 非発現個体であり有していない個体が hTREX1 発現個体となる. そして hTREX1 発現個体数を羽化総数で除算し比率を出した.

5. 免疫組織染色

hTREX1 タンパク質の局在パターンを調べるために, 各 hTREX1 を c739-Gal4 で kenyon cell に発現させた. 新たに羽化したメス個体を解剖し, 全脳を採取した. 4%ホルムアルデヒド/PBS 溶液を用いて 1 時間室温で固定し, PBT(0.3% Triton X-100/PBS)溶液で 3 回洗浄した. 1% Fatal Normal Donkey Serum : FNDS/PBT 溶液を用いて 1 次抗体としてマウス抗 myc 抗体(9B11,1:2000)を希釈し 4 °Cで一晩置いた. PBT 溶液で 3 回洗浄し, FNDS/PBT 溶液で 2 次抗体として anti-mouse Alexa Fluor 633 (1:400; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を希釈し, この時同時に DAPI(#1351303, 1:200; BIO-RAD, Hercules, CA, USA)を希釈し 4 °Cで一晩置いた. PBT 溶液で 3 回洗浄し, Vectashield mounting medium(Vector Laboratories, CA, USA)を用いて包埋した. 標本は FV3000 共焦点顕微鏡(Olympus, Tokyo, Japan)を用いて観察・撮影した. Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland) を用いて三次元構築画像を作製した.

6. Rough Eye phenotype の評価

各 hTREX1 は GMR-Gal4 ドライバーで発現させ 29°Cで新たに羽化した成体を-

80°Cで冷凍保存して用いた。Olympus DP23(Olympus)を Olympus BX53 顕微鏡(Olympus)に接続し 20 倍で 1 日齢のハエを撮影した。1.87 μm ごとにフォーカスをずらして複眼を含む範囲を撮影した。各スライスを深度合成し、Flynotyper¹⁸⁾を用いて表現型スコアを算出した。表現型スコアは複眼の構造異常を反映しており、スコアが高いほど複眼の配列が乱れていることを意味する。

7. 局在の計算方法

各 kenyon cell 細胞体ごとに *mCD8GFP* を発現している細胞領域 14.5 μm x 14.5 μm 四方の領域でスライスを撮影し、Image J¹⁹⁾を用いて、核内の *myc* 強度と核外の強度の比をとった。この時、核は DAPI によって定義した。

8. 統計解析

全ての統計解析は、Microsoft Excel の分析ツールを使用した。定量的なデータは平均±標準偏差として表した。*hTREX1* の局在と REP における野生型 *hTREX1* および変異型 *hTREX1* 発現群の比較には、Student's t-test を用い、REP の多重解析は Bonferroni 法を行なった。羽化率の比較では独立性の検定を用い多重解析には Bonferroni 法を行った。全ての検定は、 p 値 < 0.05 で有意差があると判定した。

結果

1. RVCL-S 変異ヒト *Trex1* 発現ショウジョウバエの樹立

まず、RVCL-S 変異を有するヒト *Trex1* を発現するショウジョウバエ系統の樹立を試みた。ショウジョウバエにおいて特定遺伝子を組織特異的に発現する方法として、酵母由来の転写因子である Gal4 とその認識配列である Upstream Activating Sequence (UAS) を用いた Gal4/UAS システムを用いた²⁰⁾。この系では、特定の組織で発現する事が知られている遺伝子のエンハンサーやプロモーターによって Gal4 の発現が誘導される系統と、UAS の下流に目的遺伝子を組み込んだ系統を交配する事により、次世代において目的組織に目的遺伝子を発現させられる。

この系で、ショウジョウバエ pUAST ベクターに野生型 *hTREX1* (*hTREX1 WT*) および変異型 *hTREX1* を導入した。RVCL-S 変異型 *TREX1* には、RVCL-S 変異で最も頻度が多い膜貫通ドメイン (Trans Membrane Domain: TMD) 直前にフレームシフト変異を持つことで TMD を欠損した p.Val235GlyfsTer6 (*hTREX1 V235fs*)を用いた¹⁶⁾。挿入した各 *TREX1* 遺伝子には N 末端に *myc-tag*(EQKLISEEDL) と 6His tag (HHHHHH) を付加した (図 1 a)。作製したベクターはインジェクションサービス(Wellgenetics, Taipei, Taiwan)に委託し遺伝子組換えショウジョウバエを得た。この際、ショウジョウバエへの遺伝子導入には *phiC31* インテグララーゼを用いた²¹⁾。

phiC インテグラーゼ存在下で、標的ゲノム上の attP site 類似配列を持つ部位を、ドナープラスミドを含んだ attB によって、ゲノム上の全く同じ位置に組み換え遺伝子を導入することができ、位置効果による組み換え遺伝子の発現量の違いが生じなくなる。作製した各ショウジョウバエにおける挿入遺伝子の発現を確認するために、これらの系統と、視神経特異的な Gal4 ドライバーである *GMR-Gal4* 発現系統を交配し、羽化後の成体ハエからタンパク質サンプルを抽出した。その後、抗 myc 抗体によるウェスタンブロット法を実施し、想定された分子サイズ(37 kDa)にバンドを得た (図 1b)。こ

2. TREX1 発現パターンの確認

既報ではヒト培養細胞で TREX1 の局在が変化している¹²⁾。このことから今回作製したショウジョウバエモデルでも同様の局在変化が存在するか確認した。hTREX1 の局在を確認するために、軸索、樹状突起、神経細胞体の領域が分離しており一度にこれらを観察できる *kenyon cell* に特異的に発現する *c739-Gal4* を用い、各 hTREX1 遺伝子を発現させた。この際に細胞膜局在シグナルである CD8GFP を共発現させ *kenyon cell* を可視化した。羽化後の成体から脳を解剖し、共焦点顕微鏡で撮影した。hTREX1 WT を発現した個体では核内に myc は局在せずに細胞質に留まっていたが、hTREX1 V235fs を発現した個体では核内を含めて細胞全体に一様に局在していた (図 2a,b)。

3. ラフアイによる hTREX1 毒性の検証

次に変異型 hTREX1 の毒性の有無を検証した。ショウジョウバエの複眼は外来遺伝子の毒性を評価するために幅広く利用されており (rough eye phenotype : REP), 毒性を有する場合には個眼の構造もしくはその配列が乱れ複眼の形態に異常が生じることが知られており、この形態異常を数値的に定量化する方式が広く利用されている²²⁾。そこで本研究では *GMR-Gal4* を用いてショウジョウバエの複眼に各 hTREX1 アリルを発現させ形態異常を定量化することによって、各 hTREX1 の毒性の評価を試みた。

その結果、hTREX1 WT および hTREX1 V235fs を複眼に発現したところいずれでも肉眼的に REP の悪化が見られた(図 3a)。これを REP 定量化ソフトウェアである Flynotyper¹⁸⁾で定量を行なった。hTREX1 WT, hTREX1 V235fs のいずれにおいてもネガティブコントロールと比較して有意に高いスコアを示した。さらに、hTREX1 V235fs は hTREX1 WT より有意にスコアが高くなった (図 3b)。

4. 異なる細胞種における *hTREX1* の毒性検証

次に、*hTREX1* 遺伝子を導入したハエについて細胞種ごとの毒性の差が存在するかどうかを検証した。各細胞種特異的な *Gal4* ドライバーをヘテロで有する系統と *UAS-hTREX1* をホモで有する系統を交配させた。本研究では全細胞で発現する *tub-Gal4*、グリア細胞特異的な *repo-Gal4*、全神経特異的な *nSyb-Gal4*、血管様の構造を持つ気管で発現する *btl-Gal4* を用いた。次世代において *hTREX1* を発現する個体数と全羽化個体との比を計測した(図 4a,b)。

まず、全細胞に *hTREX1* WT または *hTREX1 V235fs* を発現させたところ共に羽化することがほぼなかった(*hTREX1* WT, 0.56%; *hTREX1 V235fs*, 0.09%)。一方で全グリアに各遺伝子を発現させた場合にはいずれでも羽化率は低下せず 0.5 を超えた(*hTREX1* WT, 63.3%; *hTREX1 V235fs*, 59.4%)。次に、全神経に発現させた場合には *hTREX1* WT に比べて *hTREX1 V235fs* では羽化率が低下した(*hTREX1* WT, 49.8%; *hTREX1 V235fs*, 30.4%)。さらに、気管に発現させたところ *hTREX1* WT では 0.5 程度であったが、*hTREX1 V235fs* の発現では著しく羽化率が低下した(*hTREX1* WT, 52.0%; *hTREX1 V235fs*, 11.6%)。

考察

今回の実験では、ショウジョウバエに *hTREX1* を発現させることで変異 *hTREX1* の局在の変化、REP の変化による組織毒性を確認した。また、細胞種ごとに *hTREX1* の毒性への感受性に差があり中でも気管に対しての毒性が強いことを見出した。これらの結果から、今回作製したショウジョウバエが *RVCL-S* 変異 *Trex1* の毒性を調べるモデルとして利用できるかと判断した。

前述のように、*RVCL-S* は *hTREX1* 遺伝子の変異によって引き起こされる。変異型 *hTREX1* では、小胞体に局在するための膜貫通ドメインの直前にフレームシフト変異が生じている。このことから固定されていない *hTREX1* が、エキソヌクレアーゼ活性を保持したまま核内にも移動できると想定される。今回のショウジョウバエモデルにおいても、野生型 *hTREX1* が主に核外の細胞質に存在する一方で、変異型 *hTREX1* では核の内外での局在の差が減り一様に存在していることが確認できた。これは、既報のヒト細胞での局在変化と一致している¹²⁾。また、複眼に組織特異的に変異型 *hTREX1* を発現したショウジョウバエ個体では、複眼の配列の乱れが出現している。これは、変異型 *hTREX1* の発現が何らかの機序で組織障害的に機能していることを示している。可能性の一つとして、変異型 *hTREX1* がエキソヌクレアーゼ活性を保持したまま核内にも存在していることに関連があると考えられる。*hTREX1* 欠損細胞では *ssDNA* が小胞体に蓄積する²²⁾、このことから不要な *ssDNA* を分解する機能が想定される。核膜の破綻によって DNA 損傷マーカーである γ H2A の上昇が誘発され^{23,24)}、核膜の破裂後に *hTREX1*

が核に移行することによると報告されている²⁵⁾。そのため、核内に移行してしまつた変異型 *hTREX1* によって核内の DNA が分解されてしまい組織障害が生じている可能性が示唆された。

今回、変異型 *hTREX1* はショウジョウバエ気管に対しての毒性が強いことが示唆された。気管はショウジョウバエにおいて気門開口部から内部組織に酸素を運搬する重要な組織である。昆虫気管は上皮細胞とクチクラからなるチューブ構造をとり、ヒト血管は内皮細胞と平滑筋細胞からなるチューブ構造をとる。このように構成する要素は異なるが基本的な構造は類似している。気管系は外胚葉から生じ、線維芽細胞成長因子 (FGF) 受容体のショウジョウバエホモログ *breathless* を含む気管の分枝を促す遺伝子の発現を誘導する²⁶⁾。FGF は同様の分枝形成プロセスである血管新生の促進にも重要であり^{27,28)}、ショウジョウバエの気管系と脊椎動物における血管系の発達では、細胞移動による分枝パターン制御において類似性が指摘されている²⁹⁾。このように、ショウジョウバエ気管系と脊椎動物血管系には類似性があり、脳小血管病である *RVCL-S* の変異がショウジョウバエ気管への高い毒性を示したことに関与した可能性が考えられた。

RVCL-S 変異の毒性について変異型 *hTREX1* の局在変化による DNA 損傷を想定しているが、現時点で実際に DNA 損傷が引き起こされているかは明らかとなっていない。DNA 損傷によって誘導される γ H2Av を指標とすることで、*RVCL-S* ショウジョウバエモデルでの DNA 損傷の存在が確認できるのではないかと予測している。また、今回作製した *RVCL-S* ショウジョウバエモデルを用いることでショウジョウバエの特性を利用して病態機序解明の一助になると期待される。豊富に維持されている遺伝子変異体や RNAi 系統を用いることでマウスモデルと比較してより多くの遺伝子スクリーニングを実施することが可能となり、*RVCL-S* 変異の毒性を緩和する遺伝子の候補を特定できる可能性がある。その上で、遺伝子スクリーニングによって得られた候補遺伝子についてヒト培養細胞を用いて検証し同様の有効性を確認することができれば、ショウジョウバエモデルを用いたヒト疾患研究への応用の有用性を支持することに繋がると考える。

結論

ショウジョウバエへの *RVCL-S* 変異 *hTREX1* の発現によって、変異 *hTREX1* による複眼構造の変化を認めた。また、気管に強い毒性を示すことが示唆された。以上のことから、*RVCL-S* 変異ヒト *TREX1* 発現ショウジョウバエモデルを樹立した。

謝辞

本研究の計画・遂行にあたり、ご指導ご助言をいただきました、新潟大学脳研究所脳神経内科小野寺理教授、同分子神経疾患資源解析学分野加藤泰介准教授、

同脳病態解析分野杉江研究室杉江淳准教授, 同脳病態解析分野杉江研究室新田陽平特任助教に深謝申し上げます.

参考文献

- 1) Ford AL, Chin VW, Fella S, Binkley MM, Bodin AM, Balasetti V, Taiwo Y, Kang P, Lin D, Jen JC, Grand MG, Bogacki M, Liszewski MK, Hourcade D, Chen Y, Hassenstab J, Lee JM, An H, Miner JJ, Atkinson JP. Lesion evolution and neurodegeneration in RVCL-S: A monogenic microvasculopathy. *Neurology* 95(14): e1918-e1931, 2020.
- 2) Stam AH, Kothari PH, Shaikh A, Gschwendter A, Jen JC, Hodgkinson S, Hardy TA, Hayes M, Kempster PA, Kotschet KE, Bajema IM, van Duinen SG, Maat-Schieman MLC, de Jong PTVM, de Smet MD, de Wolff-Rouendaal D, Dijkman G, Pelzer N, Kolar GR, Schmidt RE, Lacey JA, Joseph D, Fintak DR, Grand MG, Brunt EM, Liapis H, Hajj-Ali RA, Kruit MC, van Buchem MA, Dichgans M, Frants RR, van den Maagdenberg AMJM, Haan J, Baloh RW, Atkinson JP, Terwindt GM, Ferrari MD. Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations. *Brain* 139(11): 2909-2922, 2016.
- 3) Pelzer N, Hoogeveen ES, Haan J, Bunnik R, Poot CC, van Zwet EW, Inderson A, Fogteloo A J, Reinders MEJ, Middelkoop HAM, Kruit MC, van den Maagdenberg AMJM, Ferrari MD, & Terwindt GM. Systemic features of retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations: a monogenic small vessel disease. *J Intern Med* 285(3) : 317-332, 2019.
- 4) Hoogeveen ES, Pelzer N, de Boer I, van Buchem MA, Terwindt GM, & Kruit MC. (2021). Neuroimaging findings in retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations. *AJNR* 42(9) : 1604-1609, 2021.
- 5) Kolar GR, Kothari PH, Khanlou N, Jen JC, Schmidt RE, & Vinters HV. Neuropathology and genetics of cerebroretinal vasculopathies. *Brain Pathol* 24: 510–8, 2014.
- 6) Tsubata Y, Morita T, Morioka T, Sasagawa T, Ikarashi K, Saito N, Shimada H, Miyazaki S, Sakai S, Tanaka H, Saito R, Toyoshima Y, Nozaki H, & Narita I. Renal histopathological findings of retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy. *CEN Case Rep* 7 : 83–89, 2018.
- 7) Rambaud JC, Galian A, Touchard G, Morel-Maroger L, Mikol J, van Effenterre G, Leclerc JP, le Charpentier Y, Haut J, Matuchansky C, & Zittoun R. Digestive tract and renal small vessel hyalinosis, idiopathic nonarteriosclerotic intracerebral calcifications, retinal ischemic syndrome, and phenotypic abnormalities. A new familial syndrome. *Gastroenterology* 90(4): 930–938, 1986.
- 8) Winkler DT, Lyrer P, Probst A, Devys D, Haufschild T, Haller S, Willi N, Mihatsch MJ, Steck A J, & Tolnay M. Hereditary Systemic Angiopathy (HSA) with cerebral

calcifications, retinopathy, progressive nephropathy, and hepatopathy. *J Neurol* 255(1): 77-88, 2008.

- 9) Lee-Kirsch MA, Chowdhury D, Harvey S, Gong M, Senenko L, Engel K, Pfeiffer C, Hollis T, Gahr M, Perrino FW, Lieberman J, & Hubner N. A mutation in TREX1 that impairs susceptibility to granzyme A-mediated cell death underlies familial chilblain lupus. *J Mol Med* 85(5): 531-537, 2007.
- 10) Lee-Kirsch MA, Gong M, Chowdhury D, Senenko L, Engel K, Lee YA, de Silva U, Bailey SL, Witte T, Vyse TJ, Kere J, Pfeiffer C, Harvey S, Wong A, Koskenmies S, Hummel O, Rohde K, Schmidt RE, Dominiczak AF, Gahr M, Hollis T, Perrino FW, Lieberman J, Hübner N. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 39(9): 1065-1067, 2007.
- 11) Rice G, Newman WG, Dean J, Patrick T, Parmar R, Flintoff K, Robins P, Harvey S, Hollis T, O'Hara A, Herrick AL, Bowden AP, Perrino FW, Lindahl T, Barnes DE, & Crow YJ. Heterozygous mutations in TREX1 cause familial chilblain lupus and dominant Aicardi-Goutières syndrome. *Am J Hum Genet* 80(4): 811-815, 2007.
- 12) Richards A, van den Maagdenberg AMJM, Jen JC, Kavanagh D, Bertram P, Spitzer D, Liszewski MK, Barilla-Labarca ML, Terwindt GM, Kasai Y, McLellan M, Grand MG, Vanmolkot KRJ, de Vries B, Wan J, Kane MJ, Mamsa H, Schäfer R, Stam AH, Haan J, De Jong, Paulus TVM, Storimans CW, van Schooneveld MJ, Oosterhuis JA, Gschwendter A, Dichgans M, Kotschet KE, Hodgkinson S, Hardy TA, Delatycki MB, Hajj-Ali RA, Kothari PH, Nelson SF, Frants RR, Baloh RW, Ferrari MD, Atkinson JP. C-terminal truncations in human 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause autosomal dominant retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy. *Nat Genet* 39(9): 1068-1070, 2007.
- 13) Kothari PH, Kolar GR, Jen JC, Hajj-Ali R, Bertram P, Schmidt RE, & Atkinson JP. TREX1 is expressed by microglia in normal human brain and increases in regions affected by ischemia. *Brain Pathol* 28(6) : 806–821, 2018.
- 14) O'Bryhim BE, Li S, Miner C, Santeford A, Smith A, You Z, Apte R, Miner J. A Mouse Model of Retinal Vasculopathy with Cerebral Leukodystrophy. *IOVS*, 59(9), 5453, 2018.
- 15) Mulder IA, Rubio-Beltran E, Ibrahimi K, Dzyubachyk O, Khmelinskii A, Hoehn M, Terwindt G M, Wermer MJH, MaassenVanDenBrink A, & van den Maagdenberg AMJM. Increased Mortality and Vascular Phenotype in a Knock-In Mouse Model of Retinal Vasculopathy With Cerebral Leukoencephalopathy and Systemic Manifestations. *Stroke* 51(1): 300-307, 2020.

- 16) 安藤昭一郎 : Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy (RVCL) 関連変異型 TREX1 の炎症誘導と細胞毒性. 新潟医学会雑誌 136 (2) : 57-67, 2022.
- 17) Nitta Y, Matsui S, Kato Y, Kaga Y, Sugimoto K, & Sugie A. Analysing the evolutionary and functional differentiation of four types of *Daphnia magna* cryptochrome in *Drosophila* circadian clock. *Sci Rep* 9: 8857, 2019.
- 18) Iyer J, Wang Q, Le T, Pizzo L, Grönke S, Ambegaokar SS, Imai Y, Srivastava A, Troisi BL, Mardon G, Artero R, Jackson GR, Isaacs AM, Partridge L, Lu B, Kumar JP, & Girirajan S. Quantitative assessment of eye phenotypes for functional genetic studies using *Drosophila melanogaster*. *G3: Genes, Genomes, Genet* 6(5), 1427–1437, 2016.
- 19) Schneider CA, Rasband WS, & Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7): 671–675, 2012.
- 20) Brand AH, & Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118(2) : 401-415, 1993.
- 21) Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F, & Basler K. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific ϕ C31 integrases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(9) : 3312-3317, 2007.
- 22) Yohei Nitta & Atsushi Sugie. Studies of neurodegenerative diseases using *Drosophila* and the development of novel approaches for their analysis. *Fly* 16(1): 275-298, 2022.
- 23) Raab M, Gentili M, de Belly H, Thiam HR, Vargas P, Jimenez AJ, Lautenschlaeger F, Voituriez R, Lennon-Duménil AM, Manel N, & Piel M. ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science* 352(6283): 359-362, 2016.
- 24) Hatch EM. Nuclear envelope rupture: little holes, big openings. *Curr Opin Cell Biol* 52:66–72, 2018.
- 25) Nader GP de F, Agüera-Gonzalez S, Routet F, Gratia M, Maurin M, Cancila V, Cadart C, Palamidessi A, Ramos RN, San Roman M, Gentili M, Yamada A, Williart A, Lodillinsky C, Lagoutte E, Villard C, Viovy J L, Tripodo C, Galon J, Scita G, Manel N, Chavrier P, Piel M. Compromised nuclear envelope integrity drives TREX1-dependent DNA damage and tumor cell invasion. *Cell* 184(20): 5230-5246.e22, 2021.
- 26) Metzger RJ, & Krasnow MA. Genetic control of branching morphogenesis. *Science* 284(5420): 1635-1639, 1999.

- 27) Cao R, Bråkenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, Leboulch P, & Cao Y. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med* 9(5): 604–613, 2003.
- 28) Folkman J, & Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 235(4787): 442-447, 1987.
- 29) Kotini MP, Mäe MA, Belting HG, Betsholtz C, & Affolter M. Sprouting and anastomosis in the *Drosophila* trachea and the vertebrate vasculature: Similarities and differences in cell behaviour. *Vasc Pharmacol* 112: 8-16, 2019.

Figure legends

図 1 1 hTREX1 を発現させる遺伝子組換え体の作製

(A) ショウジョウバエに組み込んだ hTREX1 の模式図. hTREX1 WT は N 末端側に 3 つの exonuclease domain を持ち, C 末端側に transmembrane domain (TMD) を有している. RVCL ショウジョウバエモデルに用いた V235fs 変異では TMD を欠損していると予想される. また, N 末端側に myc-His x 6 tag を挿入して標識した.

(B) RVCL ショウジョウバエモデルでの hTREX1 の発現. myc tag で標識された hTREX1 WT および V235fs のバンドを確認した. LuciferaseRNAi は陰性コントロール.

図 2 ショウジョウバエ生体内における hTREX1 の局在

(A) myc-tag で標識された hTREX1 WT および V235fs の細胞内局在を示した (magenta: myc で標識された hTREX1, cyan: DAPI, green: CD8GFP). hTREX1 は Kenyon cell という神経細胞種で発現させた. スケールバー : 10 μ m.

(B) hTREX1 の核内外比率.

Myc-tag で標識された hTREX1 の局在を定量的に評価するために, DAPI で染色される範囲を核内のシグナルとして核外のシグナルと比較し比率を求めた. 統計解析には student't-test を用いた. *** $p < 0.001$. エラーバーは標準偏差を示す.

図 3 複眼の構造異常を利用した RVCL 変異の毒性評価

(A) RVCL ショウジョウバエモデルの複眼写真

hTREX1 V235fs 発現個体と hTREX1 WT 発現個体を示す. Luciferase-RNAi を陰性コントロールとした.

(B) Rough Eye Phenotype の定量値

複眼の配列の乱れの程度を Flynotyper を用いて画像を解析し P score として定量化した. 統計解析には student't-test を, 多重解析には Bonferroni 法を用いた. *** $p < 0.001$. エラーバーは標準偏差を示す.

図 4 羽化立を指標とした RVCL 変異の毒性評価

(A) 羽化率実験の概念図

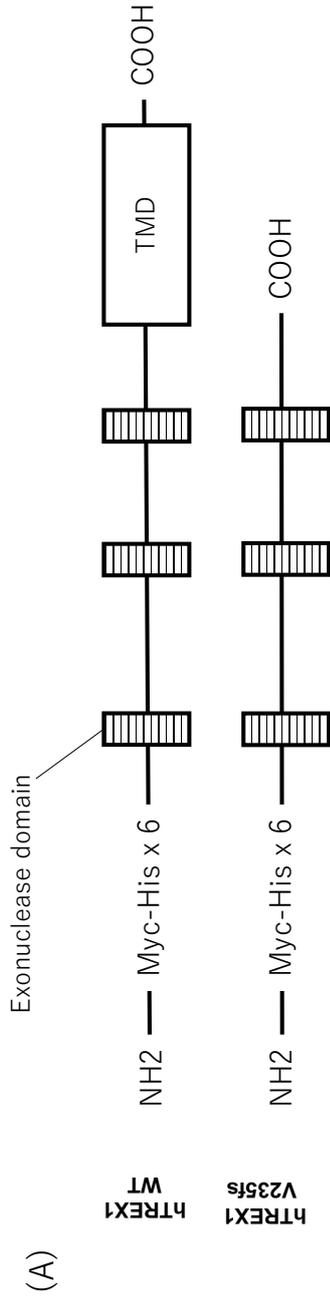
各 hTREX1 をホモ接合で有する系統と, マーカーでバランスされた各 Gal4 ドライバーを持つ系統を交配. 理論的に hTREX1 を発現する個体としない個体が 1 対 1 で発生する.

バランスのマーカータを持たない hTREX1 を発現する個体とマーカータを持つ hTREX1 を発現しない個体をカウントしその比率を評価する.

(B) 発現組織ごとの羽化率

発現組織を変えた場合の羽化率を示した. Tub, repo, syb, btl はそれぞれ全細胞, グリア細胞, 全神経, 気管構造細胞に特異的に発現させている.
統計解析には独立性の検定を行った. 多重解析には Bonferroni 法を用いた.*p<0.05, ***p<0.001.

图 1



(B)

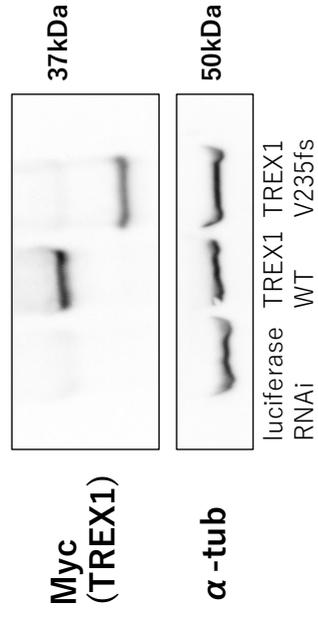


图.2

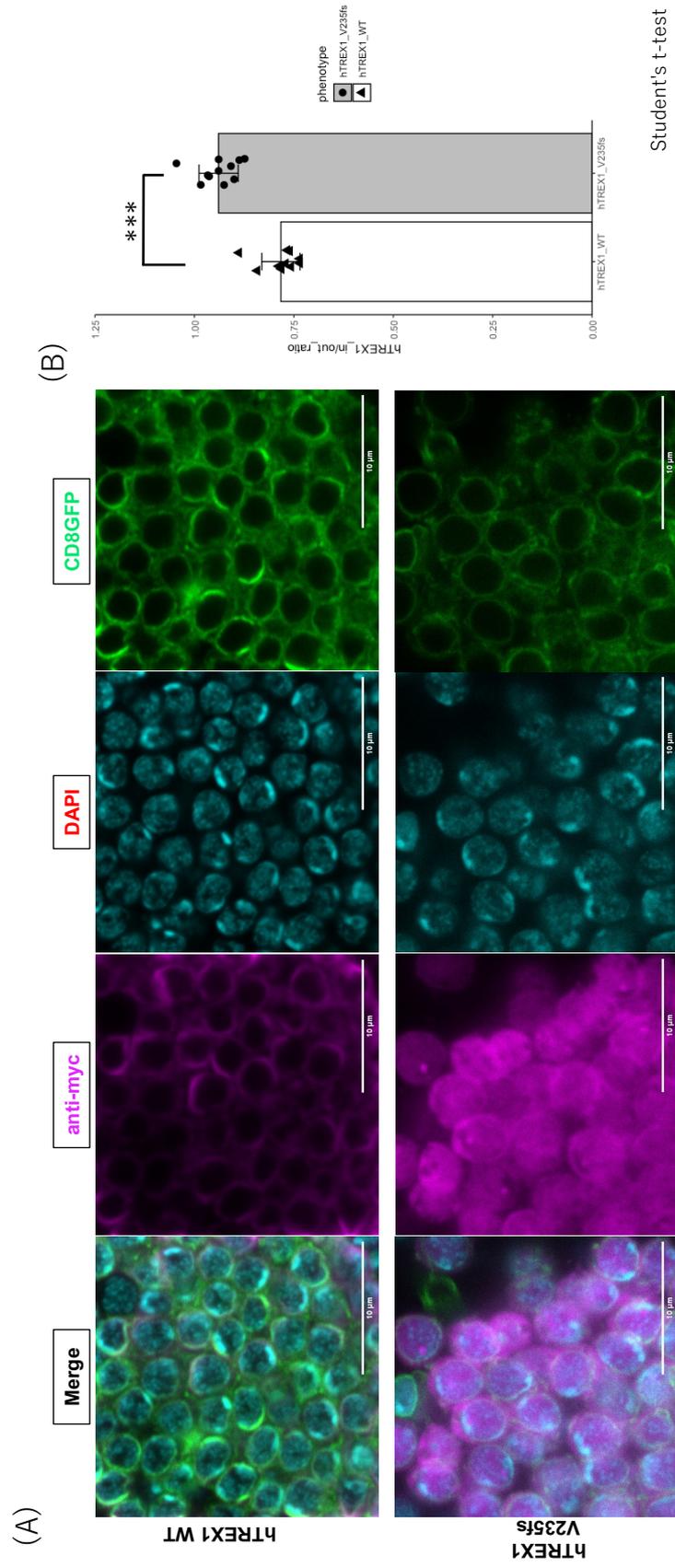


图.3

(A)

LuciferaseRNAi (control)



hTREX1WT



hTREX1 V235fs



(B)

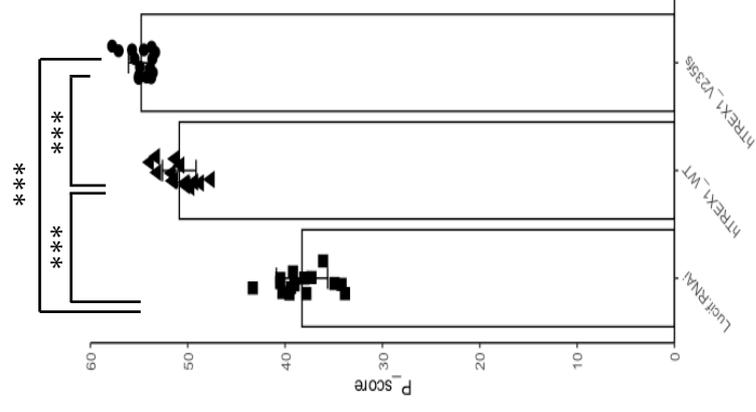
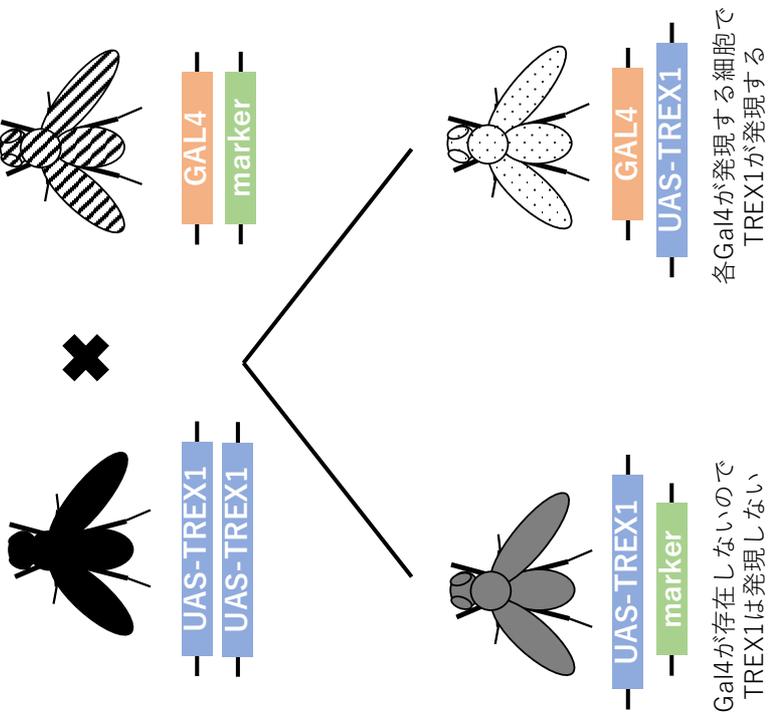


図.4



$$\text{羽化率} = \frac{\text{TREX1が発現するハエの数}}{\text{TREX1が発現するハエの数} + \text{TREX1が発現しないハエの数}}$$

