

博士論文

MGST2 遺伝子欠失マウスにおける磁気共鳴画像法による
眼の形態学的解析

2024 年 9 月

朝木力格

岡山大学大学院

ヘルスシステム統合科学研究科

要旨

斜視 (Strabismus) は、両眼の視線 (視軸) が同じ目標に向かっていない眼疾患で、両眼の偏位角が視線の方向で変化しない共同性斜視と、視線の方向に応じて偏位角が変化する非共同性斜視とに分けられる。斜視は、両眼視や立体視などの視覚機能に影響を及ぼすだけでなく、心理的、社会的な影響をもたらすことも知られている。斜視家系があること、一卵性双生児での表現型の一致から、斜視の発症は遺伝的要因とも関連しているが、その具体的な遺伝背景はまだ解明されていない。斜視の遺伝的基盤を研究することは、その発症機序を解明し、個別化治療に向けた新たな方向性を提供することになると期待される。これまでの先行研究で、*MGST2* (microsomal glutathione S-transferase 2) 遺伝子を日本人における斜視関連遺伝子の一つとして同定した。*MGST2* 遺伝子は、膜関連タンパク質の一種を規定し、炎症性メディエータの生成および酸化ストレスからの防御に重要な役割を果たす酵素で、細胞の炎症応答や酸化障害の緩和に重要な役割を担っており、さまざまな疾患の病態生理に関与していると考えられている。本研究では、眼球形態、眼球視軸の方向性 (眼軸角度) における *MGST2* 遺伝子の役割を調べるため、*MGST2* 遺伝子のエクソン 2 を標的とするガイド RNA を用いて CRISPR/Cas9 を介した遺伝子編集を行い、*MGST2* ノックアウト (KO) マウスを作製した。KO マウスの眼球形態は、小動物用磁気共鳴画像装置 (MRI) から得られた高解像度画像に基づいて計測した。形態計測の結果、*MGST2* KO マウスのホモ接合体では眼球の高さ、幅、体積が野生型マウスに比べて統計学的に有意に大きくなっていることが明らかになった。眼軸長および眼軸角度には有意差はなかった。これらの形態変化によって、眼球外壁に付着する外眼筋の効力に変化をきたし、眼球運動に影響して斜視を発症するのではないかと推論された。この研究によって斜視発症の分子機序の一端が明らかになり、斜視の治療法を考える上での新たな手がかりになると期待される。

目録

第一章 序論.....	6
1.1 研究背景.....	6
1.1.1 斜視の概要.....	6
1.1.2 <i>MGST2</i> 遺伝子の概要.....	8
1.2 本研究の目的.....	13
1.3 本論文の構成.....	13
第二章 材料と方法.....	14
2.1 実験動物.....	14
2.2 <i>MGST2</i> 遺伝子 KO マウスの作製.....	14
2.3 遺伝子型の解析.....	16
2.4 シーケンシング解析.....	19
2.5 <i>MGST2</i> 遺伝子のノックアウトホモ接合体 <i>MGST2</i> ^{-/-} マウス系統の確立.....	22
第三章 結果.....	27
3.1 <i>MGST2</i> ノックアウトマウスの作製.....	27
3.2 マウス眼の磁気共鳴画像法.....	31
第四章 考察.....	40
4.1 研究結果の考察.....	40
4.2 研究の限界.....	43
第五章 結論と今後の発展.....	45
謝辞.....	46
引用文献.....	47

略語の一覧

略語	全表記
LOD scores	Logarithm-of-odds scores
NPL	Nonparametric linkage analysis
TDT	Transmission Disequilibrium Test
TDTae	Transmission Disequilibrium Test, Allele-Environment interaction
MGST2	MGST2 stands for Microsomal Glutathione S-Transferase 2
MAPEG	Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione Metabolism
GST	Glutathione S-Transferase
GSH	Glutathione
LTC4	Leukotriene C4
ER	Endoplasmic Reticulum
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9
KO	Knockout
DBs	Double-Strand Breaks
gRNA	guide RNA
NHEJ	Non-Homologous End Joining
HR	Homologous Recombination
PAM	Protospacer Adjacent Motif
crRNA	CRISPR RNA
tracrRNA	Trans-activating CRISPR RNA

MRI	Magnetic Resonance Imaging
WT	Wild Type
Hetero	Heterozygous
Homo	Homozygous
G0	Generation 0
NOX4	NADPH Oxidase 4
ROS	Reactive Oxygen Species

第一章 序論

1.1 研究背景

1.1.1 斜視の概要

定義

斜視とは、眼球の位置異常を伴う疾患であり、患者の目が同時に同じ物体物に焦点を合わせることができない目のズレの状態を指す。正常な場合、両眼は複雑な神経調節と筋肉運動により同じ目標に焦点を合わせる。しかし斜視の患者ではこのバランスが損なわれ、片目または両目が正常な位置からずれ、視覚のずれが生じる¹⁻⁵。

病因

斜視は遺伝的要因、神経筋系の異常、屈折異常（遠視や近視など）、外傷、視覚障害、全身疾患（ダウン症や脳性麻痺など）、環境要因（早産や母体の生活習慣不良など）など多様な要因によって引き起こされる複合的な疾患である。これらの要因は互いに相互作用することが多く、結果として眼球の正常なアライメントや運動機能が損なわれ、斜視が発症する^{2,6,7}。

分類

斜視は通常、共同性斜視と非共同性斜視の二つの主要なタイプに分類されている¹⁻⁵。

1. 共同性斜視

共同性斜視では、どの方向を固視しても眼位異常の程度や角度が一定である。これは、眼筋の異常や眼球運動の神経制御の問題が左右の目で均等に現れているためであり、斜視の角度が固視の方向に依存しないという特徴がある。共同性斜視は、特に内斜視や外斜視の形でよく見られる。

2. 非共同性斜視

非共同性斜視では、固視の方向によって眼位異常の程度や角度が変化する。これは、片目の運動に制限がある場合や眼筋の異常が左右非対称に現れる場合によく見られる。非共同性斜視は、外傷や神経疾患によって引き起こされることが多く、固視の方向によって大きく症状が異なる点が特徴である。

臨床表現

斜視の臨床表現は多様であり、患者の年齢、斜視のタイプ、症状の重症度などの要因によって異なる。一般的な症状には以下が含まれる^{8,9}：

- 両眼が同時に同じ点に焦点を合わせることができない。
- 視覚がぼやける、または重複して見える。
- 眼精疲労や不快感を覚える。
- 頭痛やめまいが発生する。

治療方法

斜視の治療方法には、保存療法と手術療法の2つがある。

1. 保存療法

主な方法には眼鏡、コンタクトレンズ、視力トレーニング、ボツリヌス毒素などが含まれている。これらの方法は、視覚システムを調整し、眼外筋を訓練することによって、斜視の症状を改善する^{10,11}。

2. 手術療法

手術療法、保存的治療がうまくいかなかった、症状が重い患者さんにとって、より直接的で効果的な選択肢である。この種の手術は、眼球外筋の位置を変えて、その機能を改善する

ことで斜視を矯正し、最終的に目の位置と動きを正常化する^{8,10}。

1.1.2 *MGST2* 遺伝子の概要

斜視は、目の形態異常やその他の視覚的な問題を引き起こすだけでなく、患者の社会生活にも影響を及ぼすため、早期の診断と治療が非常に重要である。遺伝的および環境的要因は、斜視の併発に強く関連している。遺伝的要因は、斜視の家族歴がある場合、または双子で一対率が高い場合、斜視のリスクを増加させる。環境因子（早産や妊娠中の不健康など）も発症リスクを高める。遺伝因子と環境因子は相互作用して、斜視の発症や症状に影響を及ぼしている^{12,13}。Hippocrates による家族性斜視の最初の観察以来、遺伝的リスク因子への関心が高まっている⁴。様々なアプローチを用いて遺伝的原因を調査する多くの研究により、共同性斜視の要因についての理解が深まっている¹⁴。しかし、正確な原因は複雑で不明なことが多いため、様々なアプローチが必要である。近年、斜視の候補遺伝子や染色体座に関する研究が増加しており、この傾向は斜視の発症メカニズムにおける遺伝子の重要性を反映している¹⁵⁻¹⁷。

我々の 2003 年の研究では、共同性斜視の染色体感受性領域を特定するために、30 家系の日本人家庭の末梢血からゲノム DNA を分離した。400 のマイクロサテライトマーカーを用いて PCR 増幅を行い、全ゲノムスキャンを実施した。各マーカーについて、多家系の非パラメトリック影響兄弟姉妹対解析と非パラメトリック連鎖解析を用いて、マルチポイントの LOD スコアと非パラメトリック連鎖（NPL）スコアを計算した。兄弟姉妹対解析では、すべての染色体の LOD スコアはほぼ平坦で、0.25 の箇所いくつかのピークが見られた。非パラメトリック連鎖解析では、NPL スコアが染色体 1、2、4、7、10、15、16 において高いピークを示し、染色体 3、9、11、12、18、20 には複数のピークが見られた。しかし、家庭数が少なかったため、統計的に有意な結果は得られなかった¹⁸。2009 年には、前回の研究に 25 家系を追加し、合計 55 家系の日本人家庭を対象にパラメトリックおよび非パラメ

リック連鎖 (NPL) 解析を実施した。全ゲノム連鎖解析により、斜視に関連する複数の感受性領域を報告し、特に 4q28.3 と 7q31.2 染色体上に重要な遺伝子座を特定した^{19,20}。2017 年には、これらの染色体領域を特定の遺伝子に絞り込むため、日本とアメリカのデータベースから 4q28.3 領域の 24 個の SNP を選択し、58 家系の原発性および非症候群性共同性斜視家庭の 108 人の影響者と 96 人の非影響者に対してジェノタイピングを行った。伝達不均衡検定 (TDT)、誤差を許容した TDT (TDTae)、顕性および劣性遺伝の下での連鎖解析により、有意な p 値が得られた SNPs は染色体 4q28.3 領域の Microsomal glutathione S-transferase 2 (*MGST2*) 遺伝子上に限定された²¹。この結果は、*MGST2* 遺伝子が日本人における共同性斜視の潜在的な候補遺伝子であることを示唆している。

MGST2 遺伝子は、MAPEG (プロスタグランジンおよびグルタチオン代謝に関与する膜関連タンパク質) ファミリーに属する膜貫通タンパク質である。このファミリーは、前列腺素やロイコトリエンなどの生物活性脂質の代謝に関与し、抗炎症薬や抗がん薬の開発において重要な役割を果たす複数のターゲットを含む^{22,23}。*MGST2* 遺伝子は、非造血細胞に広く発現しており、特に腎臓、盲腸、皮膚などの器官で顕著に見られる。

MGST2 遺伝子は、いくつかの重要なドメインから成り立っている。まず、4 つの膜貫通 α ヘリックス (α H1- α H4) があり、これらのヘリックスは膜内で安定した三量体を形成し、各単量体の間に 3 つの潜在的な活性部位を作り出す [図 1]。次に、*MGST2* 遺伝子にはグルタチオン (GSH) 結合部位があり、GSH が結合すると、顕著なコンフォメーション変化が起こり、酵素の触媒活性を調節する。また、*MGST2* 遺伝子の中央チャネルは α H2 ヘリックスによって形成され、酵素の細胞質部分と管腔分を接続する。GSH の結合によりチャネル内の残基が再配置され、反応条件が最適化される。さらに、Pro61 残基によって形成された疎水性のポアがあり、溶媒や基質の進入を制御し、反応環境を調整する。最後に、*MGST2* 遺伝子三量体は非対称性を示し、いかなる時点でも 1 つの活性部位だけが触媒作用を行う²⁴。

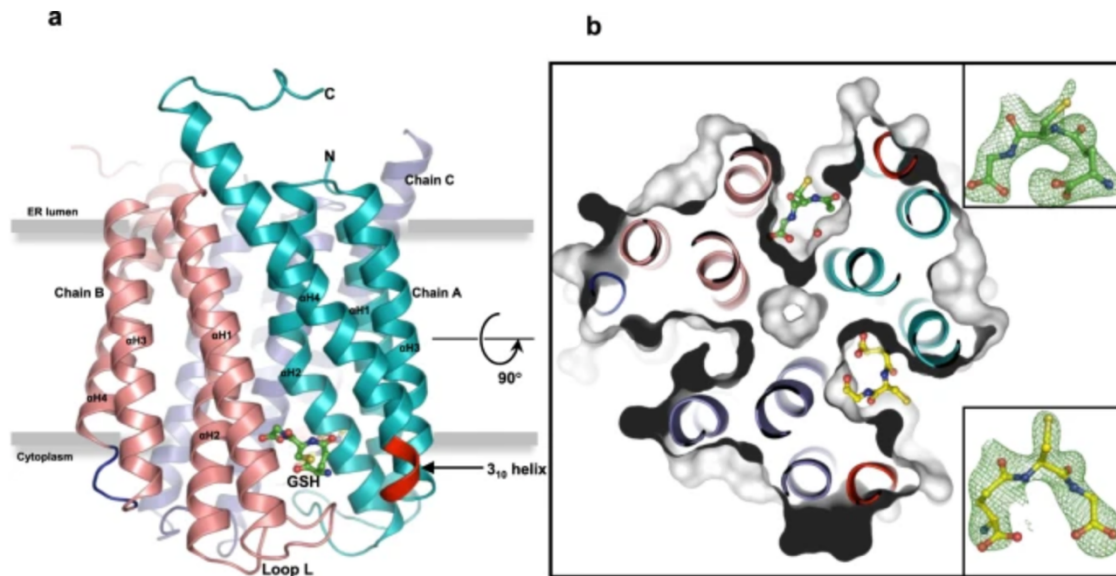


図 1. 膜平面から見た三量体ホロ *MGST2* 遺伝子構造の概略図²⁴。三量体のモノマーは、ティール(鎖 A)、サーモン(鎖 B)、スレート(鎖 C)で色分けされている。b 細胞質からの断面は、表面レンダリングで二量体界面での GSH の非対称結合を示す。ポルダー-OMIT マップに示された GSH の完全な占有状態(黄色のボールと棒)と部分的な占有状態(緑色のボールと棒)を 3σ にコンターしたものを挿入図に示す。

MGST2 遺伝子の主要な機能は以下の通り：

1. GSH (Glutathione) 結合反応の触媒

GSH は細胞内に還元型および酸化型として存在し、細胞の酸化還元平衡を維持している。*MGST2* 遺伝子の主な機能の一つは、GSH と親電子化合物の結合反応を触媒することである。このプロセスは、細胞の解毒機能にとって非常に重要である。GSH と有害な親電子化合物を結合させることで、*MGST2* 遺伝子はこれらの毒性物質を中和し、細胞外への排出を促進する。これにより、*MGST2* 遺伝子は細胞を毒性化合物から保護する上で重要な役割を果たしている²⁵。

2. LTC4 (Leukotriene C4) の合成

LTC4 は、ロイコトリエンという一群の生物活性脂質分子の一つだ。これらの分子は、アラキドン酸から生成されるエイコサノイドの一種であり、特に炎症反応やアレルギー反応において重要な役割を果たす。LTC4 は、白血球（特に好酸球や肥満細胞）によって産生される。*MGST2* 遺伝子は LTC4 の合成にも重要な役割を果たす。LTC4 は、5-リポキシゲナーゼがアラキドン酸を代謝して生成する中間体である LTA4 と GSH が結合して生成される。*MGST2* 遺伝子はこの反応を触媒することで、ロイコトリエンの生成と機能を調節する^{26,27}。

3. ER (Endoplasmic Reticulum) ストレス反応の調節

MGST2 遺伝子は ER ストレス反応の調節にも重要な役割を果たす。特に、内質網ストレスや酸化 DNA 損傷の場合、*MGST2* 遺伝子は LTC4 の生成を調節することで、細胞のストレス反応と細胞死を媒介する^{27,28} (図 2)。

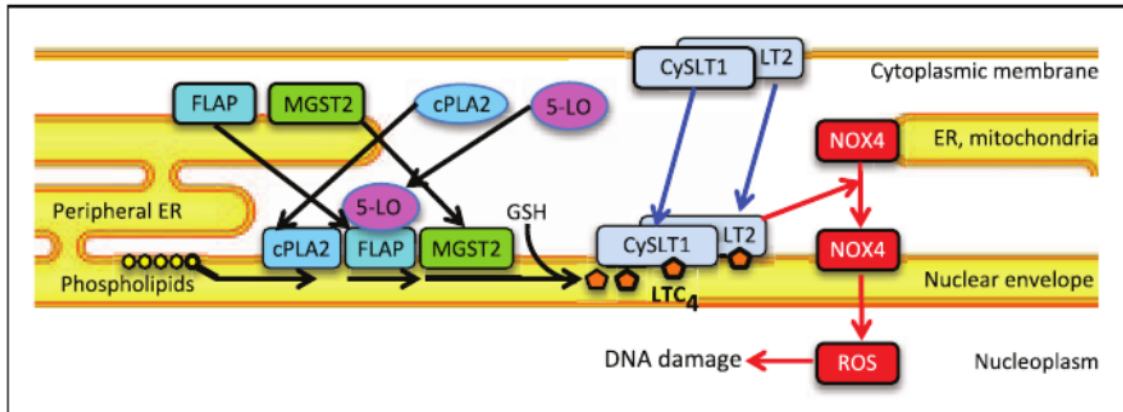


図 2. ER ストレスにより誘発される DNA 酸化損傷のメカニズム²⁸。内質網ストレスと細胞毒性因子が *MGST2* 遺伝子に基づく LTC₄ の生合成を引き起こし、核膜への移行と組み立てを促す（黒い矢印）。LTC₄ 受容体の CysLT1 と LT2 も細胞膜（および内質網）から核膜へ移行する（青い矢印）。LTC₄ が受容体に結合すると、NOX4 が内質網やミトコンドリアから細胞核へ移行し、核内で活性酸素が蓄積して DNA の酸化損傷が引き起こされる（赤い矢印）。

眼球や眼組織の正常な形態は視覚機能において重要である。眼の球形構造は、光が角膜、レンズ、硝子体を通過し、網膜に正確に焦点を合わせることが可能にしている。眼球やその関連組織の形態が変化した場合、例えば眼軸長の異常や角膜やレンズの曲率の異常により、屈折異常や乱視が引き起こされる。これにより、光が眼内に入っても焦点を結ばず、視覚機能に重大な影響を与える。最近の研究では、特定の遺伝子変異や異常な発現が眼球や眼組織の形態変化を引き起こし、それが視覚機能に影響を与えることが示されている^{29,30}。

1.2 本研究の目的

本研究では、*MGST2* 遺伝子が眼球の発達、配置、全体的な形態に与える影響を調べることを目的とした。この目的を達成するために、CRISPR/Cas9 技術 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins) を使って *MGST2* 遺伝子ノックアウト (KO) マウスモデルを作成した。そして、*MGST2* 遺伝子 KO マウスと野生マウスの眼球の三次元画像を比較分析することで、*MGST2* 遺伝子が眼球の発生過程で具体的に果たしている役割や、眼球の解剖学的構造や形態に与える影響を詳しく理解できる。

1.3 本論文の構成

本論文において、第一章「序論」では、研究背景として斜視の概要と *MGST2* 遺伝子の概要を述べ、研究の目的も明記している。第二章「材料と方法」では、実験動物、*MGST2* 遺伝子 KO マウスの作製、遺伝子型の解析、シーケンシング解析、*MGST2* 遺伝子の KO ホモ接合体 *MGST2*^{-/-} マウス系統の確立、磁気共鳴画像法解析、統計解析について詳細を記載している。第三章「結果」では、*MGST2* 遺伝子 KO マウスの作製とマウス眼の磁気共鳴画像法の結果を示している。第四章「考察」では、研究結果の考察と研究の限界を議論している。第五章「結論と今後の発展」では、研究の結論と今後の発展に関してまとめている。

第二章 材料と方法

2.1 実験動物

本研究において行われた動物実験は、岡山大学大学動物実験倫理委員会の承認を得て施行され、岡山大学大学動物実験ガイドラインを遵守した（動物実験計画書承認番号：OKU-2021324）。実験で使用した C57BL/6J マウスは、市販動物飼育業者のチャールズリバー研究所（日本、横浜市）から購入した。*MGST2* 遺伝子KOマウスの作製は群馬大学動物実験倫理委員会の承認を得て施行され、群馬大学動物実験ガイドラインを遵守した（動物実験計画書承認番号：17-033）。また、全ての実験において、実験動物の苦痛軽減と使用動物数の低減に努めた。

2.2 *MGST2* 遺伝子 KO マウスの作製

本研究では、CRISPR/Cas9技術を用いて*MGST2* 遺伝子 KO マウスモデルを作成した。CRISPR/Cas9技術は、二本鎖DNAに二本鎖切断（DSBs）を引き起こすことにより、ゲノム内の特定の箇所を置換、挿入、または欠失させることができるゲノム編集技術である³¹。CRISPR/Cas9システムの基本的な仕組みは次の通りである。まず、標的とするDNA配列に相補的な配列を持つgRNA（guide RNA）と、Cas9タンパク質を発現するベクターを受精卵に注入する。次に、gRNAはターゲットDNA配列に結合し、Cas9がその二本鎖を切断してDSBsを導入する。そして、DSBsが発生すると、非相同末端結合（NHEJ）や相同組換え修復（HR）により修復が行われるが、その際の修復エラーを利用してインデル（挿入または欠失）を誘導することができる。Cas9が標的DNAに結合するためには、PAM（Protospacer Adjacent Motif）と呼ばれる短い特定の配列が必要である。このため、CRISPRシステムを設計する際には、標的となるDNA配列がPAM配列を含む位置にあるように配慮する必要がある。

ある³²。

本研究の実験では、*MGST2* 遺伝子の機能を喪失させるための具体的な手順が実施された^{33,34}。まず、*MGST2* 遺伝子の特定部位をターゲットとする2つのガイドRNA (gRNA) が選定された。gRNAのターゲット配列は、ACGACATTCCGGTCCCTTGTAGG (*MGST2L2*) およびAGGGGAAAGCGTAATACAGAAGG (*MGST2R2*) であり、PAM配列は下線を引いた部分である。次に、2つのgRNA (各1.5 μ MのcrRNA/tracrRNA混合物; Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) を組換え、Cas9タンパク質 (100 ng/ μ L; GeneArt Platinum Cas9 Nuclease, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) とOpti-MEM I (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) に混合した。この混合物を用いてエレクトロポレーションを行うために、CUI21EDITエレクトロポレーター (BEX) と電極 (LF501PT1-10; BEX, Tokyo, Japan) が使用された。エレクトロポレーションは、細胞に遺伝物質を導入するための一般的な方法であり、電場を利用して細胞膜に一時的な孔を形成し、遺伝物質が細胞内に移行できるようにする技術である。エレクトロポレーションの具体的な操作として、まず胚を電極の間に並べ、5 μ LのCas9/gRNA混合物を胚に満たした。次に、30 Vの電圧で3 msec ON、97 msec OFFの設定で7回の電気パルスを加えた。この電圧とパルス設定は、細胞に最適な遺伝物質導入効率を達成するために最適化されている。エレクトロポレーションの実施中、胚の操作は実体顕微鏡下で行われ、正確な位置調整と混合物の均等な分布が確保された。この方法により、DSBsが修復される。この過程で起こるエラーにより、欠失 (indel) が導入され、*MGST2* 遺伝子の機能を喪失させることができた。

2.3 遺伝子型の解析

1. DNA 抽出

材料準備

KANEKA Easy DNA Extraction Kit version 2 (KN-T110005, フナコシ, Japan)

プロトコル

- マウスの尾を3 mm切断し、組織片を0.2 mlのPCRチューブに移して再び氷上で保持した後、サンプルを-80 °Cで20分間凍結した。
- 次に、KANEKA Easy DNA Extraction Kit version 2を用いて、以下のステップを実行する。
- サンプルチューブに50 μ Lの溶液Aを加え、優しくタッピングしてよく混ぜる。
- 遠心機でサンプルチューブをスピンのし、サンプルを収集する。
- サンプルチューブを98°Cで15分間インキュベートする。
- サンプルを取り出し、室温に5分間戻す。
- サンプルに7 μ Lの溶液Bを加え、優しくタッピングしてよく混ぜる。
- 4°Cで10,000rpmで5分間遠心分離する。
- 上澄みを新しい0.5mlのチューブに移し、使用するまで氷上で保持する。

2. PCR 反応

材料準備

1) Primers (5 uM):

Name	Sequence	T _m (°C)
Forward primer	5' -TTCTAGTAGATAGTCCTGGTACCCAAC-3'	62.5
Reverse primer	5' - CCACCATGCTGAAGAGACAA-3'	64

2) 5x Q5 reaction Buffer (B9027S, NEB, New England)

3) dNTP Mixture (2.5 mM, BL301B, TakaraBio, Japan)

4) Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerase (M0493S, NEB, New England)

5) aMQW: Invitrogen Ultra pure™ distilled water (10977015, Thermo Fisher Scientific, USA)

反応液

PCR反応液の調製	x1 (μL)	Final concentration
aMQW	4.1	-
5 μM MGST2-forward primer	1	500 nM
5 μM MGST2-reverse primer	1	500 nM
2.5 mM dNTP Mixture	0.8	200 nM
5x Q5 reaction buffer	2	1x
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerase	0.1	0.02 U/μL
1/10x genomic DNA	1	-
Total	10	-

3. PCR増幅

サーマルサイクリング

ステップ	温度 (°C)	時間	サイクル数
初期変性	98	30 sec	1
変性	98	5 sec	30
アニーリング	66	10 sec	30
延長	72	10 sec	30
最終延長	72	2 min	1
保持	4	無限	-

4. ゲル電気泳動

材料準備

- 1) アガロース (100 g, D00347, FastGene™, Japan)
- 2) Atlas ClearSight DNA Stain (50 μ L, BHS0018, BIOATLAS, Denmark)

プロトコル

- 2%アガロースゲルを準備する。
- PCR産物の各チューブに2 μ LのNovel Juiceを追加する。
- PCR産物をゲルのウェルにロードする。
- ゲルを100Vでゲルの先端が十分に移動するまで電気泳動する。
- UVライト下でDNAバンドを可視化する。

2.4 シーケンシング解析

材料準備

材料	備考
PCR産物	遺伝子型解析で得られたもの
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, Germany
oligonucleotide primer	5' -TTCTAGTAGATAGTCCTGGTACCCAAC-3'
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA
ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA
NCBIリファレンスシーケンス	NM_174995.3

プロトコル

- PCR産物のゲル精製

遺伝子型解析で得られたPCR産物を用いて、QIAquick Gel Extraction Kitのプロトコルに従って、ゲル精製を行う。

- シーケンシング反応

精製したPCR産物は、オリゴヌクレオチドプライマー（5' -TTCTAGTAGATAGTCCTGGTACCCAAC-3'）とBig Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いて、シーケンシングを行った。

反応液

Big Dye	8 μ L
PCR products	3 ng
Primer	3.2 pmol
Deionized water	up to 20 μ L
Total	20 μ L

サーマルサイクリング

ステップ	温度 (°C)	時間	サイクル数
初期変性	96	1 min	1
変性	96	10 sec	25
アニーリング	50	5 sec	25
延長	60	4 min	25
保持	4	無限	-

• エタ沈精製

ステップ	詳細
エタノール/EDTA/酢酸ナトリウム精製	反応済みサンプル 20 μ L 125 mM EDTA 2 μ L 3 M 酢酸ナトリウム 2 μ L 100% エタノール 50 μ L
室温放置	15 min
遠心	室温 2000 g $\times$ 45 min
遠心	液をピペティングで除去後、 裏返して遠心 185 gでフラッシュ

70% エタノール	70 μ L
遠心	室温 2000g $\times$ 15min
遠心	液をピペッティングで除去後、 裏返して遠心 185 g x 1 min
Dry up	-

- キャピラリー電気泳動

精製したシーケンシング反応産物をABI PRISM 3130 Genetic Analyzerにロードする。

- データ解析

得られたシーケンスデータをNCBIリファレンスシーケンス (NM_174995.3) と比較し、
シーケンシングを解析する。

2.5 *MGST2* 遺伝子のノックアウトホモ接合体 *MGST2*^{-/-}マウス

系統の確立

ヘテロ接合体のF1マウスは、ヘテロ接合体のG0マウス系統 (#5、#11) と野生型C57BL/6Jを交配することで作出した。KO ヘテロ接合体の*MGST2*^{+/-}マウス系統は、ヘテロ接合体のオスと野生型のメスを交配することで3世代にわたって維持した。KO ホモ接合体の*MGST2*^{-/-}マウス系統は、ヘテロ接合体の兄弟姉妹を交配することで次世代にわたって維持した [図 3]。

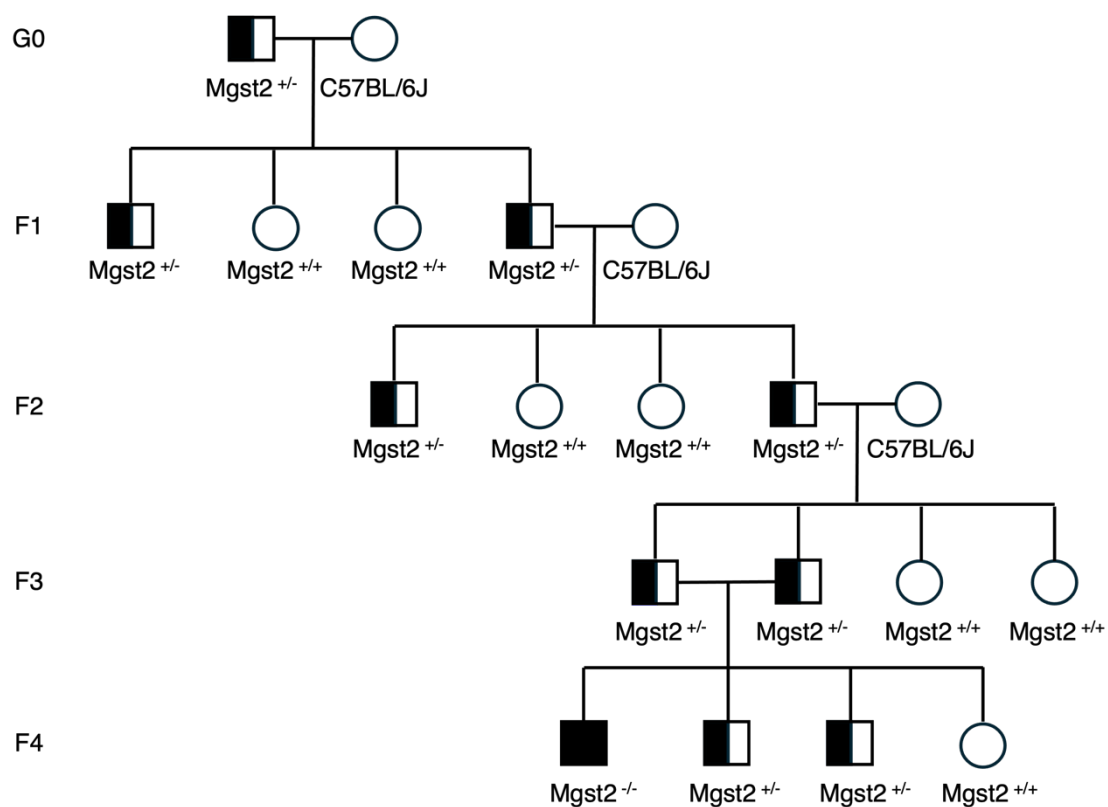


図 3. マウス交配過程（正方形：オス；円形：メス）。

2.6 磁気共鳴画像法解析

パイロット研究では、野生型 (WT) およびヘテロ接合体型 ($MGST2^{+/-}$) マウスの眼球形態の軸角および眼体積を測定した。測定は左眼 (n=4、それぞれ)、右眼 (n=4、それぞれ)、および両眼 (n=8) の以下のペアについて行った：F1 (1ペア、8ヶ月齢、オス)、F1 (1ペア、7ヶ月齢、オス)、F2 (1ペア、5ヶ月齢、オス、および F2 (1ペア、4ヶ月齢、オス)。詳細な実験条件および測定方法については、本研究の主な研究に記載している。

主な研究では、5ヶ月 (20週齢) 齢のWT マウス (n=5、オス) およびホモ接合体 $MGST2^{-/-}$ マウス (n=5、オス) の眼球形態を、ボクセルサイズ90ミクロンの高解像度小動物MRIにより分析した。MRI解析に用いたマウスは、F6世代 (1ペア)、F7世代 (2ペア)、およびF8世代 (2ペア) から取得した。これらのマウスはヘテロ接合体同士の交配から得られ、個別にWTおよびホモ接合体 $MGST2^{-/-}$ マウスとして確認した。比較はWTマウス (n=5) とホモ接合体 $MGST2^{-/-}$ マウス (n=5) の間で行った。各マウスは、4% 濃度のイソフルラン^{35,36}を空気と混合して麻酔をかけた後、MRIスキャフォールドにうつぶせの姿勢で配置した。マウスの生命徴候 (呼吸数と体温を含む) は、MRI手順の全体を通じて注意深く監視され、撮像セッション中に健康で安定していることを確認した。MRIデータの取得は、内径23 mmの1H送受信ボリウムコイルを装備した4.7 T小動物MRIシステム (BioSpec, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) を使用して行った。撮像シーケンス (水平取得) は、リラクゼーションエンハンスメント (TurboRARE) を伴うT2強調3Dターボラピッド取得であった。眼球の完全なビューを得るために、以下の撮像パラメータを設定した：反復時間1800 msec、エコー時間60 msec、エコートレイン長13、スライス厚0.09 mm、91スライス、視野20 × 20 mm、マトリックスサイズ222 × 278。水平面、赤道面、および矢状面を生成するために、マルチプレーナー再構築ツール (Horosソフトウェア (バージョン3.0、The Horos Project) の3D MAP) を使用した。再構築プロセスを実行するために、水平面を参照面とし

て利用した。初めのステップでは、前角膜表面からレンズの最大直径の中心を通り後極までを描く眼軸を示す画像を選択した。次に、水平面に垂直で眼軸を通過する矢状面を視覚的に分析しながら定義した。水平面と矢状面の両方に垂直な面を赤道面とした（図 4A）。眼の寸法は、水平、赤道、および矢状画像でImageJソフトウェア（バージョン1.53K, NIH, Bethesda, MD, USA）を用いて測定した。

眼球の形態解析を行うために以下の測定パラメータを定義した。これにより、WTマウスとホモ接合体*MGST2*^{-/-}マウスの眼球形態を比較した。軸長および軸角は、眼の水平面および矢状面の画像から測定した（図 4B,D）。眼軸長（線AP）は、前角膜表面（点A）からレンズの最大直径の中心を通り後極（点P）までの距離として記録した。この測定により、眼球の前後方向の長さを評価した。軸角（ $\angle$ APL）は、眼軸（線AP）と脳の縦裂に垂直な線（線PL）の間の角度として測定した。軸角の測定は、眼球の位置と方向を評価するために重要である。眼の幅（線TN）は、眼の水平面および赤道面で、眼軸に垂直な方向において、側頭側（点T）と鼻側（点N）の間の距離として測定した（図 4B,C）。眼の幅の測定は、眼球の横方向の広がり进行评估するために使用した。体積は、水平面のスライスに設定された関心領域（ROI）から測定し、特に画像の解像度に基づいて、眼全体のROIからのピクセル数を変換して計算した。これにより、眼球の全体的な大きさを評価した。眼の高さ（線DV）は、眼軸に垂直で赤道面上の矢状面で、背側（点D）と腹側（点V）の間の距離として定義した（図4C,D）。眼の高さの測定は、眼球の垂直方向の広がり进行评估するために行った。眼球の断面積は、水平面、赤道面、矢状面でそれぞれ測定した（図 4B-D）。すべての測定パラメータは、左眼（n = 5、それぞれ）、右眼（n = 5、それぞれ）、および両眼（n = 10）についてImageJで個別に評価した。

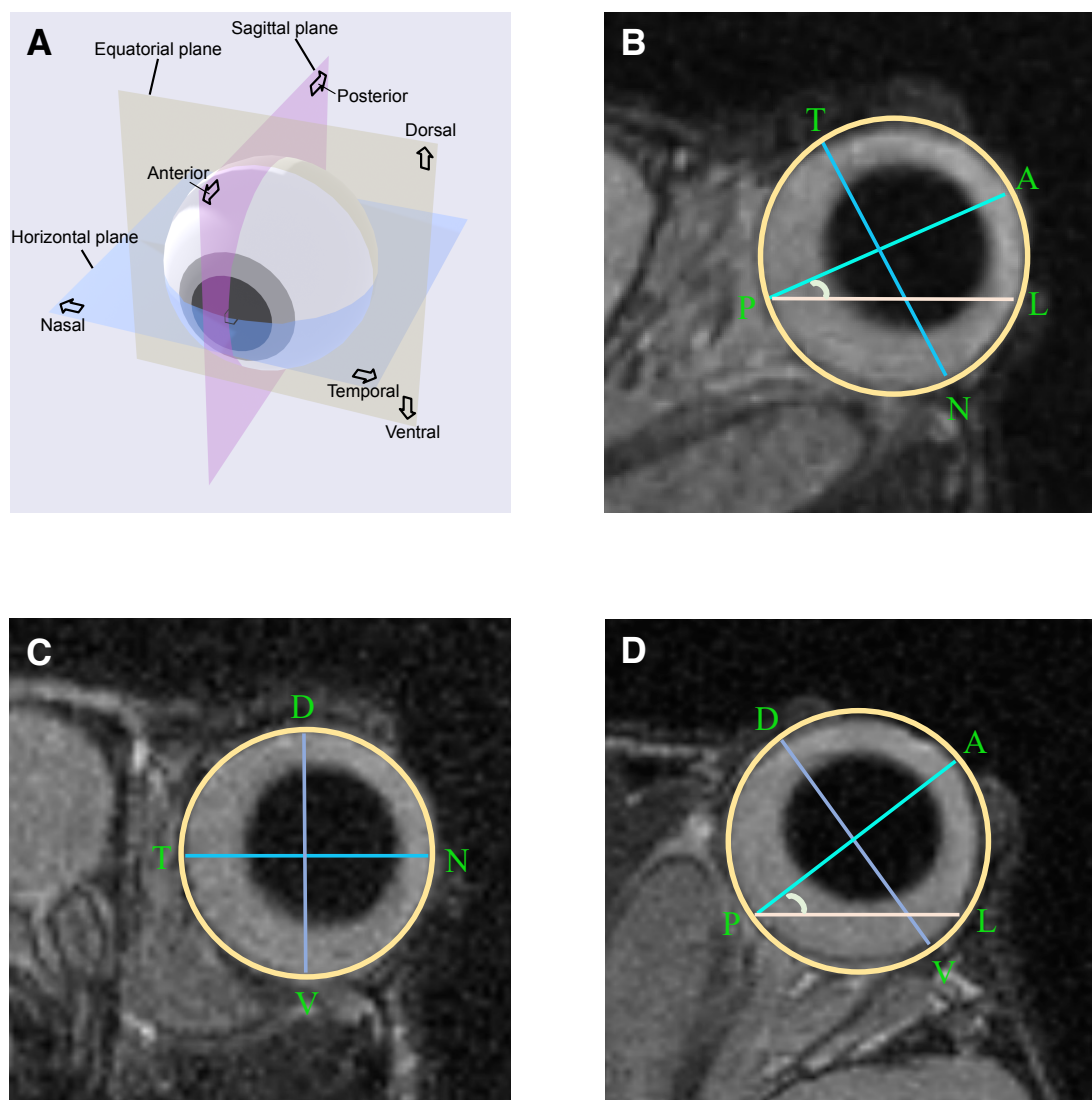


図4. 眼球のMRI測定法。 (A) マウスの眼の水平面、赤道面、および矢状面の図。(B) 水平面の代表的な画像（左眼）。軸長（線AP）：前表面（点A）から後極（点P）まで、レンズの最大直径の中心を通る距離。眼の幅（線TN）：眼の側頭側（点T）と鼻側（点N）の間の距離で、眼軸に垂直。軸角（ $\angle APL$ ）：眼軸（線AP）と脳の縦裂に垂直な線（線PL）の間の角度。眼球表面（薄黄色）。(C) 赤道面の代表的な画像（左眼）。眼の高さ（線DV）：眼の背側（点D）と腹側（点V）の間の距離。眼の幅（線TN）。(D) 矢状面の代表的な画像（左眼）。眼の高さ（線DV）。軸長（線AP）。軸角（ $\angle APL$ ）。スケールバー＝1 mm。

2.7 統計解析

両眼が視覚情報処理に果たす役割と、MRIにおける両眼間の磁場不均一性の可能性（第4節を参照）を考慮して、左眼と右眼のデータを統合し、左右眼の差異を解消することにした。左右眼のデータを統合することで、個々の被験者間の差異を減らし、より普遍的な結論を得ることができる。この方法により、データの一貫性と信頼性を確保し、両眼から得られる情報を統合して、より正確な結果を導き出すことができる。関連（眼軸長、軸角、眼の幅、体積、高さ、断面積）パラメータの測定に対する統計解析は、SPSS for Mac（バージョン28.0）を使用して実施した。Studentのt検定において、 $p < 0.05$ を有意とし、すべてのデータは平均値±標準偏差（SD）として示した。

第三章 結果

3.1 *MGST2* ノックアウトマウスの作製

MGST2 遺伝子が眼の形態発達にどのような役割を果たすかを決定するために、CRISPR/Cas9システムを使用し*MGST2* KO マウスを作製した。まず、CRISPR/Cas9システムを用いて、*MGST2* 遺伝子のDNA認識部位を標的とするgRNA (Mgst2L2およびMgst2R2) を設計し、これをマウス胚に導入した。導入方法としては、連続エレクトロポレーション技術を用い、胚に効率よくgRNAとCas9タンパク質を導入した。結果として、処理された149個の接合体のうち23個 (15%) が出生し、そのうち9個 (39%) が*MGST2* KO マウスであることが確認された (図 5A,B)。

続いて、G0世代の23匹のマウスのうち、10匹 (#2、#5、#6、#7、#8、#10、#11、#12、#19、および#23) を選び、これらのマウスからDNAを抽出した。抽出したDNAをPCR増幅し、その産物をアガロースゲル電気泳動にかけたところ、#8のマウスだけがワイルドタイプ (WT) 遺伝子型 (455 bp) を持ち、他の9匹のマウスはすべて KO 遺伝子型 (約273 bp) を示した (図 6A)。この結果は、選択したマウスのうち大部分が*MGST2* 遺伝子の変異を有していることを示している。

さらに、上記の10匹のマウスのうち、#5 (♂)、#7 (♂)、#10 (♂)、#11 (♂)、#12 (♂)、#19 (♀)、および#23 (♀) の7匹については、得られたPCR産物を用いてDNAシーケンシングを実施した。シーケンシング結果により、これらのサンプルがすべてG0世代マウスにおいて*MGST2* 遺伝子のエクソン2が欠失していることが確認された。特に、これらのマウスは*MGST2* 遺伝子の KO であり、CRISPR/Cas9システムを用いた*MGST2* 遺伝子の編集が成功したことが明らかとなった (図 6B)。

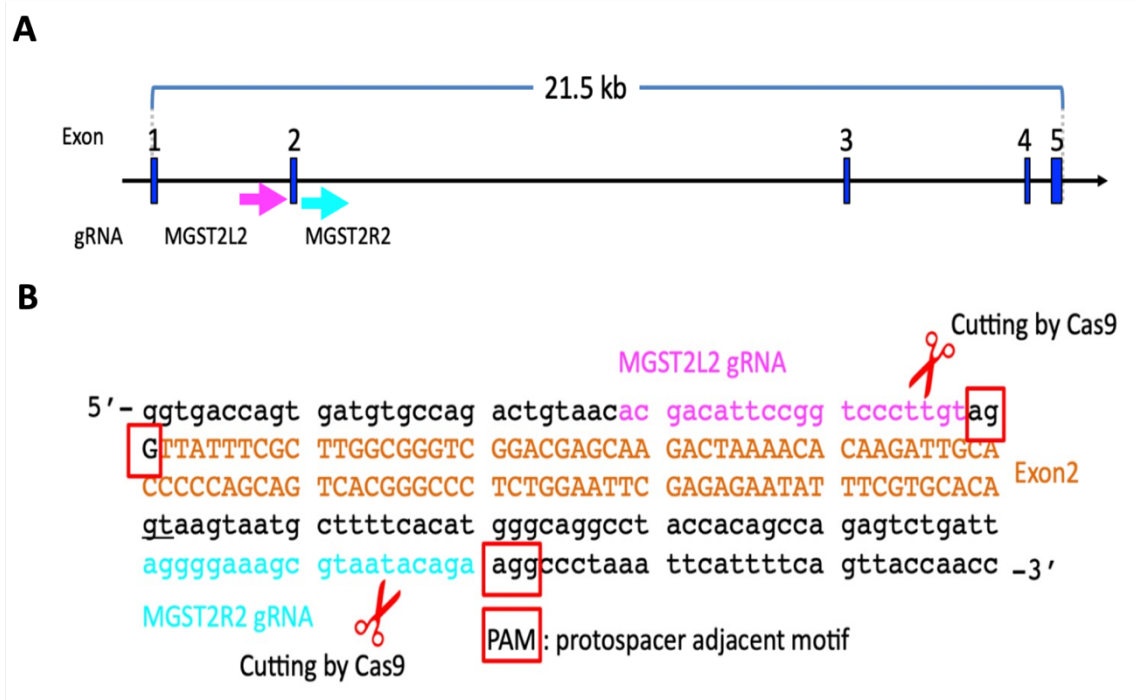


図 5. CRISPR/Cas9による *MGST2* KO マウスモデルの作製。(A) マウスの *MGST2* 遺伝子における gRNA 標的部位の模式図。エクソンは青いボックスで表されている。gRNA MGST2L2 はピンクで示され、gRNA MGST2R2 は蛍光青で示されている。(B) Cas9/gRNA 複合体による切断部位周辺の *MGST2* エクソン2のゲノム配列。プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列は赤い枠で示されている。エクソン2の配列は茶色で表されている。

A

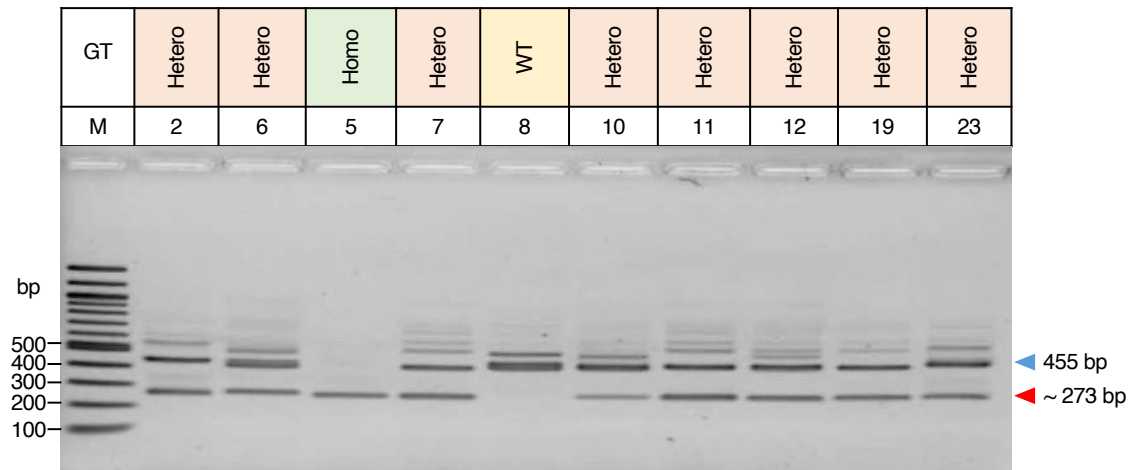


図 6. CRISPR-Cas9による *MGST2* 遺伝子標的のG0マウスの遺伝型。G0世代で生存した23匹のマウスのうち、#2、#6、#5、#7、#8、#10、#11、#12、#19、および#23の10匹のマウスを遺伝型解析に使用した。
(A) G0世代の *MGST2* 遺伝子PCR産物の電気泳動。455 bp (WT) および約273 bp (変異型) のアンプリコンが得られた。M：マーカー、bp：塩基対、GT：遺伝型解析、Hetero：ヘテロ接合体、Homo：ホモ接合体。

B

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

                                MGST2L1←
Wt      TTCTAGTAGATAGTCCTGGTACCAACTGTACTCACACTTCCCTGGTGACCAAGTGTGTG 60  #10      -----CCCTAAATTCATTTTCAGTTACCAACCACAAGT 118
#19     TTCTAGTAGATAGTCCTGGTACCAACTGTACTCACACTTCCCTGGTGACCAAGTGTGTG 60  #05      -----CCCTAAATTCATTTTCAGTTACCAACCACAAGT 116
#23     TTCTAGTAGATAGTCCTGGTACCAACTGTACTCACACTTCCCTGGTGACCAAGTGTGTG 60  #07      -----CCCTAAATTCATTTTCAGTTACCAACCACAAGT 117
#12     TTCTAGTAGATAGTCCTGGTACCAACTGTACTCACACTTCCCTGGTGACCAAGTGTGTG 60
#11     TTCTAGTAGATAGTCCTGGTACCAACTGTACTCACACTTCCCTGGTGACCAAGTGTGTG 60
#10     TTCTAGTAGATAGTCCTGGTACCAACTGTACTCACACTTCCCTGGTGACCAAGTGTGTG 60
#05     TTCTAGTAGATAGTCCTGGTACCAACTGTACTCACACTTCCCTGGTGACCAAGTGTGTG 60
#07     TTCTAGTAGATAGTCCTGGTACCAACTGTACTCACACTTCCCTGGTGACCAAGTGTGTG 60
*****
                                Exon2
Wt      CCAGACTGTAACACGACATTCCGGTCCCTGTAGGTTAATTCGCTTGGCGGGTCGGAAGA 120
#19     CCAGACTGTAACACGACATTCCGGT-----85
#23     CCAGACTGTAACACGACATTCCGGT-----85
#12     CCAGACTGTAACACGACATTCCGGT-----83
#11     CCAGACTGTAACACGACATTCCGGT-----85
#10     CCAGACTGTAACACGACATTCCGGT-----85
#05     CCAGACTGTAACACGACATTCCGGT-----83
#07     CCAGACTGTAACACGACATTCCGGT-----84
*****
Wt      GCAAGACTAAACACAAGATTGCACCCCGCAGTGCACGGCCCTCTGGAATTCGAGAGA 180
#19     -----
#23     -----
#12     -----
#11     -----
#10     -----
#05     -----
#07     -----

                                MGST2R1→
Wt      ATATTTCTGTGTCAGTAACTAATGCTTTTCACATGGGCAGGCGCTACACAGCCAGAGTCT 240
#19     -----
#23     -----
#12     -----
#11     -----
#10     -----
#05     -----
#07     -----

Wt      GATTAGGGGAAGCGTAATACAGAAGGCCCTAAATTCATTTTCAGTTACCAACCACAAGT 300
#19     -----CCTAAATTCATTTTCAGTTACCAACCACAAGT 117
#23     -----CCTAAATTCATTTTCAGTTACCAACCACAAGT 118
#12     -----CCTAAATTCATTTTCAGTTACCAACCACAAGT 115
#11     -----CCTAAATTCATTTTCAGTTACCAACCACAAGT 118

Wt      TGTCCTTGTCTCTTCAGCATGGTGG 445
#19     TGTCCTTGTCTCTTCAGCATGGTGG 262
#23     TGTCCTTGTCTCTTCAGCATGGTGG 263
#12     TGTCCTTGTCTCTTCAGCATGGTGG 260
#11     TGTCCTTGTCTCTTCAGCATGGTGG 263
#10     TGTCCTTGTCTCTTCAGCATGGTGG 263
#05     TGTCCTTGTCTCTTCAGCATGGTGG 261
#07     TGTCCTTGTCTCTTCAGCATGGTGG 262
*****

```

図 6. (B) 上記の遺伝型の PCR 産物を DNA シーケンシング解析に使用した。#19 (♀) マウスは 183 bp の欠失、#23 (♀) は 182 bp の欠失、#12 (♂) は 185 bp の欠失、#11 (♂) は 182 bp の欠失、#10 (♂) は 182 bp の欠失、#5 (♂) は 184 bp の欠失、#7 (♂) は 183 bp の欠失を示した。エクソン 2 の配列は赤で示され、gRNA (MGST2L2, MGST2R2) は青で示されている。アスタリスクは、すべての配列でヌクレオチドが一致する位置を示している。

3.2 マウス眼球の磁気共鳴画像法

パイロット研究では、WT マウスとヘテロ接合体 $MGST2^{+/-}$ マウスの眼の形態を測定した（表1参照）。具体的には、軸角度と眼体積を比較したが、これらのパラメータにおいて、ヘテロ接合体 $MGST2^{+/-}$ マウスとWT マウスの間に有意な差は見られなかった。この結果から、 $MGST2$ 遺伝子のヘテロ接合状態では眼の形態に影響を与えないことが示唆された。そこで、本研究では $MGST2$ 遺伝子の完全な欠失（ホモ接合体 $MGST2^{-/-}$ ）が眼の形態に与える影響を明らかにするために、ホモ接合体 $MGST2^{-/-}$ マウスとWT マウスを比較することにした。

図 7は、F6、F7、およびF8世代のマウス（WTおよびホモ接合体）の代表的な遺伝型を示しており、これらは KO マウスライン#5のヘテロ接合体の交配による子孫であり、MRI 実験に使用された。解剖学的概観において、ホモ接合体 $MGST2^{-/-}$ マウスおよびヘテロ接合体 $MGST2^{+/-}$ マウスの眼と脳のMRI画像は、Horosソフトウェアでの水平面、冠状面、および矢状面のいずれにおいても、WT マウスと比較して形態的に大きな変化は見られなかった（図 8）。

$MGST2$ 遺伝子の KO が眼の方向性の変化を引き起こすかどうかを調べるために、図 4Bおよび図 4Dに示すように、WTマウスおよびホモ接合体 $MGST2^{-/-}$ マウスの水平面および矢状面で軸角を測定した。左眼、右眼、または両眼の軸角には有意な差は見られなかった（表 2A）。次に、 $MGST2$ 遺伝子が眼の形態に影響を与えるかどうかを確認するために、マウスの眼の体積を比較した。解析計算の結果、ホモ接合体 $MGST2^{-/-}$ マウスの眼の体積は、WTマウスと比較して5.6%増加していることが示された（表 2A、図 9A）。

眼の体積増加の原因を理解するために、眼軸長、眼の高さ、眼の幅を測定した。測定の結果、ホモ接合 $MGST2^{-/-}$ マウスは、WT マウスと比較して、水平面および赤道面の両方で眼の幅が3%増加し（図4B,C；表 2A；図 9B,C）、赤道面および矢状面で眼の高さが2.4%増加した（図 4C,D；表2B；図 9D,E）。対照的に、眼軸の長さにはホモ接合 $MGST2^{-/-}$ マ

ウスとWT マウスの間に差は見られなかった（表 2A）。眼の幅と高さが増加したため、赤道面の面積も変化すると予想された。後続の分析により、ホモ接合 *MGST2*^{-/-} マウスの赤道面の面積がWTマウスより4.6%大きいことが示された（表 2B；図 9F）。結果の信頼性を確保するために、水平面および矢状面の面積も測定した。結果は、ホモ接合 *MGST2*^{-/-} マウスの水平面の面積がWTマウスより2.4%、矢状面の面積が3.6%大きいことを示した（表 2A；図 9G,H）。

全体として、ホモ接合 *MGST2*^{-/-} マウスとWTマウスの間で眼軸長および眼軸角には有意な差は見られなかった。しかし、形態測定解析により、ホモ接合 *MGST2*^{-/-} マウスの眼の高さ、幅、および体積がWTマウスよりも有意に大きいことが示され、*MGST2*^{-/-} マウスの眼が拡大していることが示唆された。

表 1. WT マウスおよびヘテロ接合体 *MGST2*^{+/-} マウスの異なる年齢ペアにおける眼形態の定量解析データ。

Horizontal plane						
Genotype	WT	<i>MGST2</i> ^{+/-}	<i>p</i>	WT	<i>MGST2</i> ^{+/-}	<i>p</i>
Volume (mm ³)			Axis Angle (°)			
L	21.88 ± 1.99	22.2 ± 0.97	0.63	28.42 ± 1.9	31.75 ± 4.5	0.24
R	22.25 ± 1.81	22.53 ± 1.6	0.73	28.87 ± 4.1	28.73 ± 4.9	0.95
L+R	22.13 ± 1.9	22.2 ± 1.3	0.51	28.64 ± 3.4	27.68 ± 5.3	0.33
Sagittal plane						
Genotype	WT	<i>MGST2</i> ^{+/-}	<i>p</i>			
Axis Angle (°)						
L	33.12 ± 3.3	32.16 ± 2.3	0.46			
R	33.76 ± 2.9	32.75 ± 3.3	0.65			
L+R	33.44 ± 2.9	32.46 ± 2.7	0.52			

以下のペアについて測定を行った：F1（1 ペア、8 ヶ月齢、オス）、F1（1 ペア、7 ヶ月齢、オス）、F2（1 ペア、5 ヶ月齢、オス）、および F2（1 ペア、4 ヶ月齢、オス）。左眼（L, n=4、それぞれ）、右眼（R, n=4、それぞれ）、および両眼（L+R, n=8）のデータは平均値±標準偏差（SD）として示されている。測定は水平面と矢状面の 2 つの異なる平面で行われた。以下のパラメータが測定された：水平面での体積と軸角、および矢状面での軸角。統計検定は L、R、および L+R に対して行われ、*p* 値は対応のあるサンプル *t* 検定を用いて計算された。

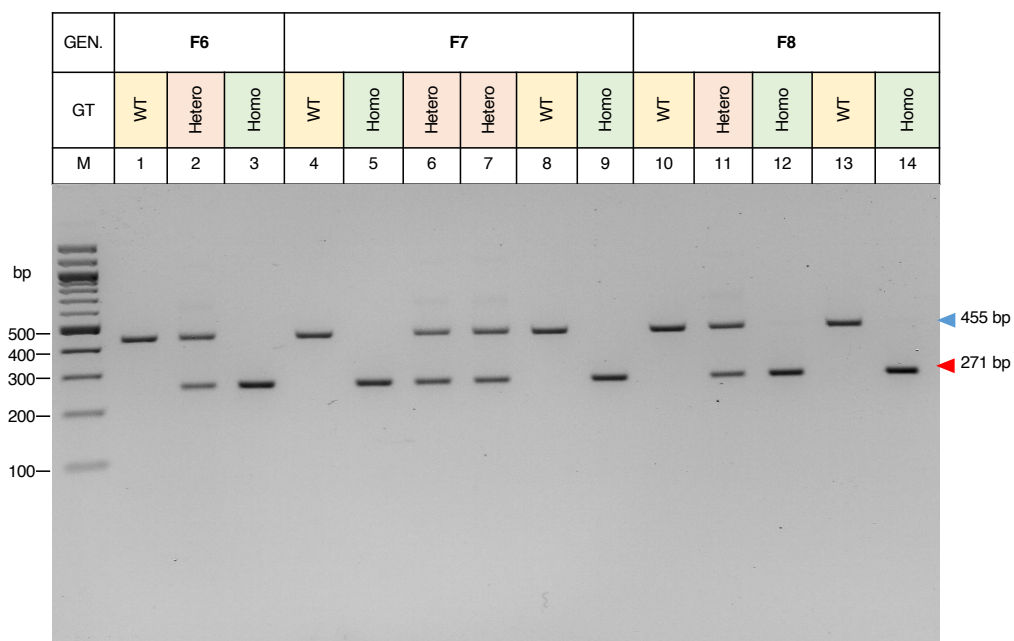


図 7. KOマウスライン#5のF6、F7、およびF8世代のマウスの遺伝型。MRI実験のサンプルとしてWTおよびホモ接合型の遺伝子型を選択した。F6世代の1ペア、F7世代の2ペア、F8世代の2ペア、合計10匹のマウスをMRI解析および比較に使用した。M: マーカー、bp: 塩基対、WT: 455 bp、: 271 bp、GT: 遺伝型、GEN.: 世代、Hetero: ヘテロ接合体、Homo: ホモ接合体。

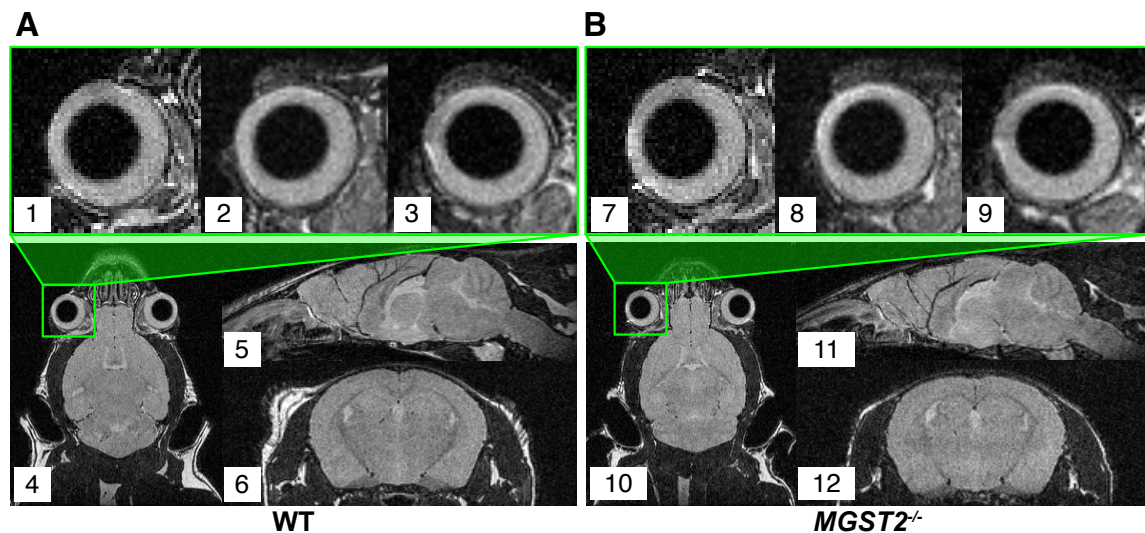


図 8. WT (A) およびホモ接合 $MGST2^{-/-}$ (B) マウスの代表的なMRI画像。眼と脳の解剖学的概観には顕著な変化は見られない。上段のパネルは、WTマウス (1, 2, 3) およびホモ接合 $MGST2^{-/-}$ マウス (7, 8, 9) の水平面、冠状面、および矢状面における右眼のクローズアップビューを示している。下段のパネルは、WTおよびホモ接合 $MGST2^{-/-}$ マウスの水平面 (4, 10)、矢状面 (5, 11)、および冠状面 (6, 12) における脳を示しており、マルチプラン再構築によって構築された。スケールバー = 1 mm。

表 2. WTおよびホモ接合MGST2^{-/-}マウスの眼形態に関する定量解析データ。

Horizontal Plane (A)						
Genotype	WT	<i>MGST2</i> ^{-/-}	<i>p</i>	WT	<i>MGST2</i> ^{-/-}	<i>p</i>
Axis Angle (°)			Volume (mm ³)			
L	23.06 ± 1.54	23.19 ± 1.52	0.97	22.3 ± 0.68	22.3 ± 0.68	0.17
R	23.24 ± 3.49	23.5 ± 0.83	0.88	21.9 ± 1.01	23.8 ± 0.24	0.07
L+R	23.16 ± 2.57	24.16 ± 1.53	0.92	22.1 ± 0.97	23.4 ± 1.33	0.01
Genotype	WT	<i>MGST2</i> ^{-/-}	<i>p</i>	WT	<i>MGST2</i> ^{-/-}	<i>p</i>
Width (mm)			Axis Length (mm)			
L	3.29 ± 0.07	3.39 ± 0.07	0.07	3.34 ± 0.03	3.33 ± 0.05	0.86
R	3.31 ± 0.05	3.41 ± 0.04	0.02	3.34 ± 0.04	3.32 ± 0.04	0.61
L+R	3.3 ± 0.05	3.4 ± 0.06	0.005	3.33 ± 0.03	3.31 ± 0.03	0.64
Genotype	WT	<i>MGST2</i> ^{-/-}	<i>p</i>			
Area (mm ²)						
L	9.32 ± 0.25	9.53 ± 0.25	0.23			
R	9.14 ± 0.17	9.38 ± 0.23	0.1			
L+R	9.23 ± 0.23	9.45 ± 0.24	0.046			
Equatorial Plane (B)						
Genotype	WT	<i>MGST2</i> ^{-/-}	<i>p</i>	WT	<i>MGST2</i> ^{-/-}	<i>p</i>
Width (mm)			Height (mm)			
L	3.23 ± 0.04	3.29 ± 0.06	0.15	3.18 ± 0.03	3.22 ± 0.04	0.22
R	3.22 ± 0.06	3.32 ± 0.02	0.01	3.11 ± 0.08	3.24 ± 0.07	0.04
L+R	3.22 ± 0.05	3.10 ± 0.05	0.002	3.15 ± 0.08	3.23 ± 0.06	0.02
Genotype	WT	<i>MGST2</i> ^{-/-}	<i>p</i>			
Area (mm ²)						
L	8.96 ± 0.18	9.17 ± 0.19	0.12			
R	8.56 ± 0.33	9.19 ± 0.25	0.001			
L+R	8.76 ± 0.33	9.18 ± 0.21	0.003			

Sagittal Plane (C)						
Genotype	WT	MGST2 ^{-/-}	<i>p</i>	WT	MGST2 ^{-/-}	<i>p</i>
Axis Angle (°)			Axis Length (mm)			
L	22.8 ± 3.72	26.4 ± 3.99	0.17	3.39 ± 0.03	3.39 ± 0.06	0.95
R	23.4 ± 4.26	21.8 ± 3.77	0.53	3.37 ± 0.04	3.34 ± 0.03	0.17
L+R	23.1 ± 3.78	24.1 ± 4.39	0.59	3.38 ± 0.04	3.36 ± 0.05	0.46
Genotype	WT	MGST2 ^{-/-}	<i>p</i>	WT	MGST2 ^{-/-}	<i>p</i>
Height (mm)			Area (mm ²)			
L	3.29 ± 0.06	3.38 ± 0.03	0.045	8.83 ± 0.22	9 ± 0.25	0.29
R	3 ± 0.2	3.27 ± 0.25	0.034	8.45 ± 0.16	8.93 ± 0.18	0.002
L+R	3.26 ± 0.07	3.34 ± 0.06	0.025	8.64 ± 0.27	8.97 ± 0.21	0.008

以下のペアについて測定を行った：F6（1ペア、5ヶ月齢、オス）、F7（2ペア、5ヶ月齢、オス）、F8（2ペア、5ヶ月齢、オス）。左眼（L, n=5、それぞれ）、右眼（R, n=5、それぞれ）、および両眼（L+R, n=10）のデータは平均値±標準偏差（SD）として示されている。測定は水平面、赤道面、および矢状面の3つの異なる平面で行われた。以下のパラメータが測定された：水平面（A）での軸角、体積、幅、軸長、および面積；赤道面（B）での幅、高さ、および面積；矢状面（C）での軸角、軸長、高さ、および面積。各測定のサンプルサイズは、各眼に対して5、両眼に対して10であった。統計検定はL、R、およびL+Rに対して行われ、*p*値はStudentの*t*検定を用いて計算された。

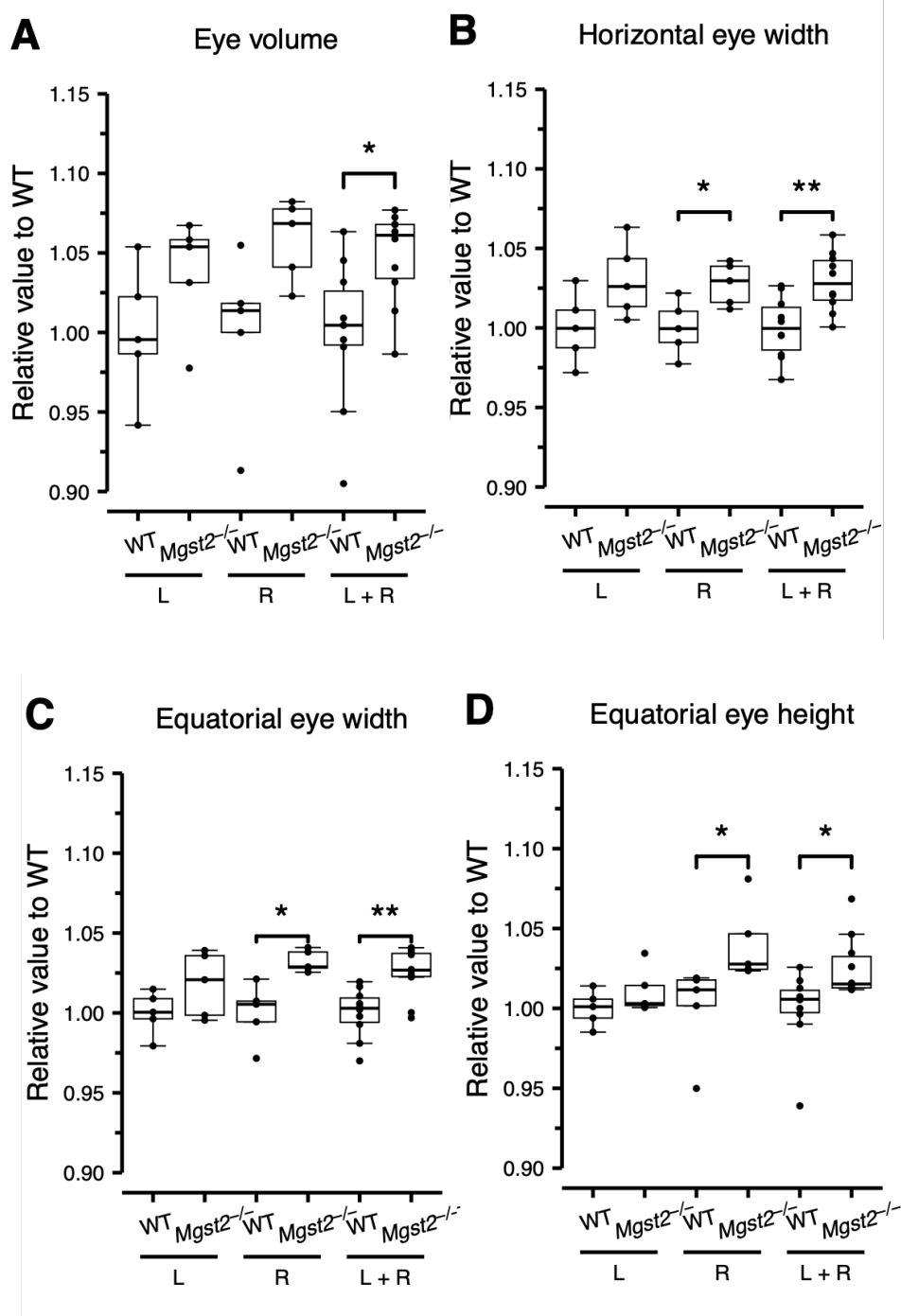


図 9. 眼の形態測定解析

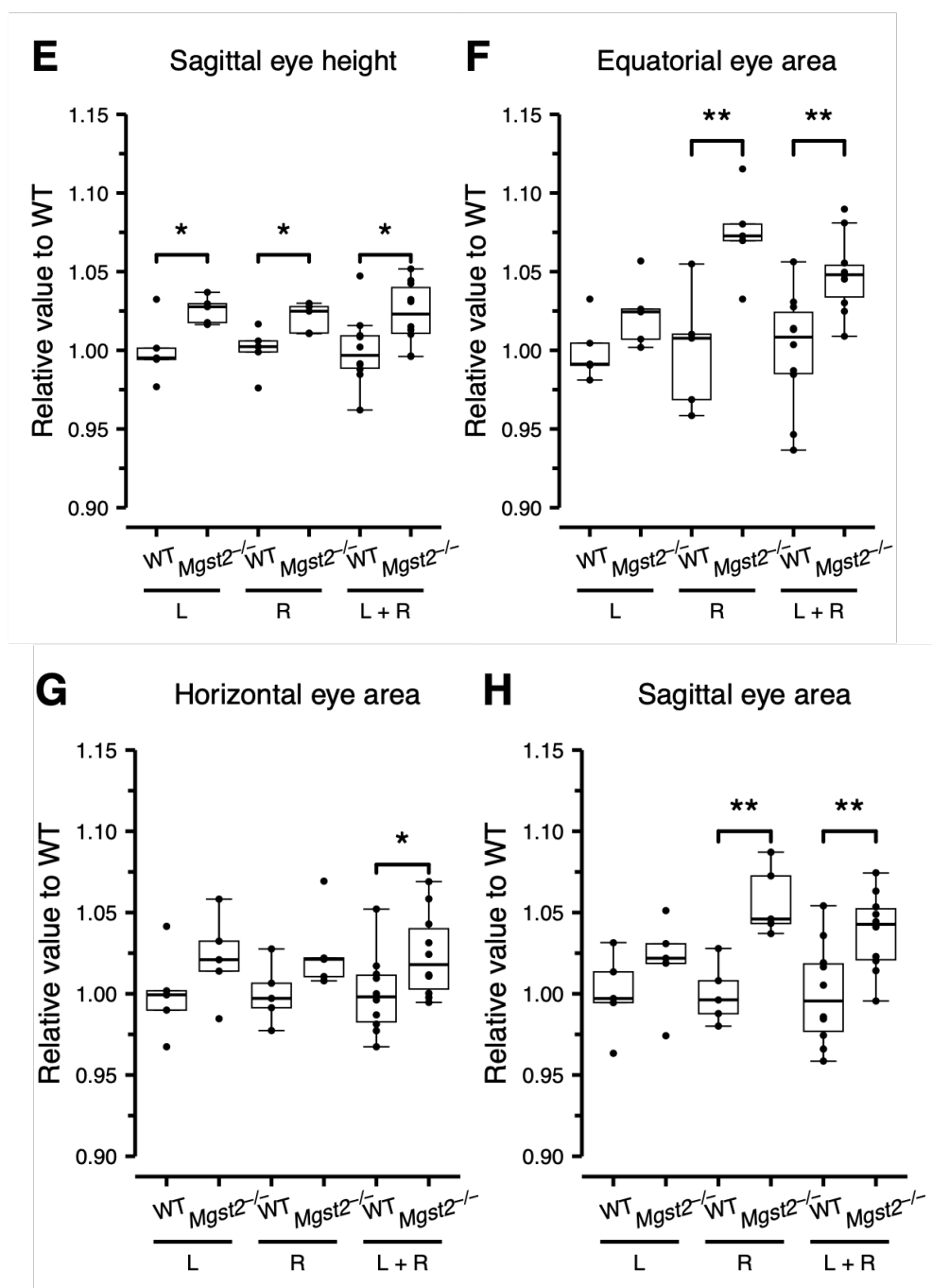


図 9. 眼の形態測定解析。各測定パラメータに対するホモ接合 $MGST2^{-/-}$ の WT に対する相対値の箱ひげ図およびドットプロット。各パネルの標準化は WT の平均値によって計算された。縦軸は相対値を表し、横軸は左眼 (L, $n = 5$, 各)、右眼 (R, $n = 5$, 各)、および WT およびホモ接合 $MGST2^{-/-}$ サンプルの左眼と右眼の合計 (L + R, $n = 10$) をそれぞれ表す。下のヒンジ、中央の太線、および上のヒンジは、それぞれ第 1 四分位数、中央値、第 3 四分位数を表す。ひげは四分位範囲の 1.5 倍以内の最も極端なデータ点まで伸びる。ひげの範囲外のデータ点は外れ値として示される。* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 。

第四章 考察

4.1 研究結果の考察

本研究の目的は、*MGST2* 遺伝子が眼の発達、眼の方向性、全体的な眼の形態において、共同性斜視の発生の背景として考えられる斜視感受性遺伝子の候補としての役割を果たすかどうかを調べることであった。*MGST2* 遺伝子ノックアウトモデルを用いて、高解像度小動物 MRI により眼の軸長、軸角、幅、高さ、面積、および体積を測定した。結果は、ホモ接合 *MGST2*^{-/-} マウスの眼が WT マウスの眼よりも大きいことを示したが、軸長および軸角には変化が見られなかった。

眼軸角および眼軸長の測定において、WT マウスとホモ接合 *MGST2*^{-/-} マウスの間に有意な差が見られなかった。左眼、右眼、または両眼の軸角のいずれにおいても、WT マウスとホモ接合 *MGST2*^{-/-} マウスの間に統計的に有意な差は見られなかった。*MGST2* 遺伝子が眼の方向性を決定する上で重要な役割を果たしていない可能性もある。一方、ホモ接合 *MGST2*^{-/-} マウスの眼の体積が WT マウスと比較して有意に増加していることは、*MGST2* 遺伝子が全体的な眼の大きさに影響を与えている可能性がある。つまり、*MGST2* 遺伝子の欠損が眼の発達や形態に影響を与え、眼の体積が増加することを示している。観察された眼の高さと幅の変化が、眼の体積の増加に寄与している。眼の面積は、3つの平面すべてで差が見られたが、赤道面が最も大きく、次いで矢状面および水平面の順である。このことは、*MGST2* 遺伝子の欠失が眼の空間的な寸法に影響を与え、その影響が特定の平面でより顕著に現れることを示している。

MGST2 遺伝子は、重要な脂質メディエーターである LTC₄ の合成に重要な役割を果たしており、これは内部受容体に結合して NADPH オキシダーゼ 4 (NOX4) の核および細胞の核周囲領域への移行を引き起こし、活性酸素種 (ROS) の生成、核 DNA への酸化的損傷、アポトーシスおよびネクローシスの誘導をもたらす²⁸。ER ストレスによる細胞死は、

MGST2 KO ホモ接合 *MGST2*^{-/-} マウスの腎臓で減少することが示されている^{28,37}。
MGST2 遺伝子による ER ストレス誘導アポトーシスは眼では報告されていないが、現時点でのデータは、*MGST2* 遺伝子が眼の発達過程においても重要な役割を果たしていることを示唆している。ホモ接合 *MGST2*^{-/-} マウスで観察された眼の体積増加は、*MGST2* 遺伝子欠損による細胞死の減少に起因する可能性が高い。*MGST2* KO ヘテロ接合 *MGST2*^{+/-} マウスにおけるアポトーシスのメカニズムは未知のままである。本研究でヘテロ接合体 *MGST2*^{+/-} マウスが軸角および眼の体積に有意な変化を示さなかった理由は、少なくとも1つの正常な *MGST2* 遺伝子コピーがあるためである、それが眼の構造の正常な発達および分化を維持するのに十分であると考えられる。

眼球およびその関連組織の形態と機能については、斜視に限らず広く知られている。この研究では、眼球全体の表面積を測定することで眼球の拡大の結果を得た。眼球表面の寸法が変化することで、眼外筋の強膜への付着に異常が生じる可能性がある。その場合、関連する筋肉の作用方向に眼の動きがある程度変化し、それが斜視の発生につながる可能性がある³⁸。また、眼球の形態異常、例えば眼軸長の変化は屈折異常を引き起こす。近視、遠視、乱視といった視力の問題は、眼球の形態と密接な関係がある^{39,40}。例えば、近視は眼軸が過度に長いために、光が網膜上で正確に焦点を結ばず、網膜の手前で焦点が結ばれることで発生する。一方で遠視は、眼軸が短いために、光が網膜の後方で焦点を結ぶ。また、乱視は角膜やレンズの曲率異常に関連して発生する^{41,42}。さらに、角膜の形態変化は視力機能にも大きな影響を与える可能性がある。例えば、円錐角膜は角膜が薄くなり前方に突出する疾患であり、この形態異常により光が正確に網膜に焦点を結ばず、視界がぼやける。この疾患は、形態異常が視機能に与える影響の深刻さを明確に示している。他の形態変化による疾患の例としては、緑内障が挙げられる。緑内障は眼圧の上昇によって眼球内部が拡張し、場合によっては眼球の体積が増加することがある⁴³。眼球突出症もまた、典型的な形態変化の一例である。この場合、眼軸長や眼軸角には直接的な影響を与えないが、眼球の顕著な拡張が見ら

れる⁴⁴。また、先天性や後天性の眼疾患、さらには頭蓋内圧の上昇などの神経系疾患も、眼球形態の変化を引き起こす可能性がある⁴⁵⁻⁴⁸。

時に、眼球形態異常が目の機能障害の原因となることもあれば、逆に目の機能障害が眼球形態に影響を与えることもある。例えば、網膜剥離では、網膜が正常な位置から剥がれ、形態が変化し、視力が失われる。網膜の形態異常は光受容体細胞の配列を乱し、視覚信号の伝達に影響を与える⁴⁹。同様に、ドライアイは涙膜の構造不安定が形態異常を引き起こし、結果として涙膜の機能が低下し、眼表面の乾燥や不快感が生じる。この機能障害はさらに眼表面の組織に形態的な損傷を引き起こし、悪循環を生み出す⁵⁰。

総括すると、眼球および関連組織の形態と機能の関係は、眼科研究における中心的な課題である。形態異常は通常、機能障害を引き起こし、機能障害はさらに組織の形態を変化させる。この相互作用は多くの眼科疾患に見られ、屈折異常から網膜疾患や角膜病変、さらには斜視に至るまで、それぞれの疾患の発症メカニズムは形態と機能の緊密な関係を反映している。これらの事例は、眼の形態に影響を与える要因の複雑性と多面性を示している。現在の動物モデルの結果は共同性斜視に直接適用するには限界があるかもしれないが、眼の形態や発達の変化の潜在的な原因を広く理解することは、斜視の発生機序を解明する手がかりとなるだろう。

4.2 研究の限界

この研究における方法論的制限として、眼の特定の構造や組織の画像化は MRI 条件に依存することがある。これらの構造の小さな変化は、高解像度でも観察できないことがある。将来の観察では、MRI 造影剤の使用がこの制限を克服するのに役立つかもしれない。MRI 造影剤は、画像のコントラストと明瞭度を高め、組織構造の詳細を提供する物質である⁵¹。また、この実験には画像の歪みが存在する可能性がある。主磁場の均一性はアイソセンターからの距離とともに劣化するため、画像可能領域の端に歪みが生じる^{52,53}。画像の歪みにより、左眼および右眼のそれぞれが画像上で伸びたり縮んだりする可能性がある。比較のための 2 つのグループのマウスはほぼ同じ年齢であり、MRI の位置合わせもできるだけ一定にしているため、画像の歪みの影響はマウス間でほぼ等しいと考えられる。また、分析中に生じる可能性のある画像の歪みを避けるために、WT マウスと *MGST2* KO ホモ接合 *MGST2*^{-/-} マウスのデータの比較には、同じ眼（右眼または左眼のみ）を使用した。さらに、この研究で使用された TurboRARE シーケンスは、MRI パルスシーケンスの中で主磁場の不均一性に最も鈍感であるため、画像の歪みは最小限であり、バイアスも限定的である。両眼の視覚統合への参加および解剖学的構造の対称性も考慮し、個体差を減らし、データの信頼性を向上させるために、左眼と右眼のデータを統合して解析することを決定した。この文脈において、既存のバイアスは WT マウスと *MGST2* KO ホモ接合 *MGST2*^{-/-} マウス間の形態学的差異の解釈に最小限の影響を与えるだろう。

現在、実際の MRI 装置の主磁場の完全な均一性を達成することは依然として困難であり、画像の歪みを完全に避けることはできない。将来の研究では、主磁場マップを取得し、後処理で画像の歪みを補正することで、測定精度を向上させることができるだろう⁵⁴。

この研究の主な制限は、マウスモデルがヒトの共同性斜視のような臨床疾患の解析に適しているかどうかという問題である。ヒトは高解像度の視力を持つ黄斑構造の網膜を持っている。ヒトの目は前方に位置し、広い視野を持ち、両眼が重なることで両眼視が可能である。

また、ヒトの目は結膜の背景に角膜が見える特徴があり、目の位置と視線の方向性がわかりやすくなっている。対照的に、マウスは頭の両側に目があり、まぶたの間に角膜のみが見え、結膜は見えないため、目の位置と視線の方向性を特定するのが難しい。これらのヒトとマウスの違いがあっても、マウスは両眼の重なる視野が小さいながらも両眼視を持っている。この状況下で、マウスモデルはヒトの共同性斜視のメカニズムを理解するための有意義な手がかりになりうる。眼球に付着する眼外筋は、共同性斜視の形態変化の候補となりうる^{55,56}。つまり、眼球の形が異なる場合、眼外筋が発揮するトルクが変わり、そのために目の位置がずれて共同性斜視が発生する可能性がある。

第五章 結論と今後の発展

本研究では、*MGST2* 遺伝子が眼球の発達、配置、全体的な形態に与える影響を調べるために、CRISPR/Cas9 技術を使って *MGST2* 遺伝子 KO マウスモデルを作成した。そして MRI 方法を使用して KO マウスと野生マウスの眼球の三次元画像を比較分析することで、*MGST2* 遺伝子が眼球の発達過程で具体的に果たしている役割や、眼球の解剖学的構造や形態に与える影響を詳しく解析できた。*MGST2*^{-/-} マウスの眼球の高さ、幅、および体積、つまり、*MGST2*^{-/-} マウスの眼球が有意に拡大していることを明らかにした。これらの形態変化によって、眼球外壁に付着する外眼筋の効力に変化をきたし、眼球運動に影響して斜視を発症するのではないかと推論された。この研究によって斜視発症の分子機序の一端が明らかになり、斜視の治療法を考える上での新たな手がかりになると期待される。

先行研究では、*MGST2* KO ホモ接合 *MGST2*^{-/-} マウスの腎臓では ER ストレスによる細胞死が減少することが確認されている²⁸。同様のメカニズムが眼球発生にも関与し、結果として眼球の体積が増加する可能性がある。本研究では *MGST2* 遺伝子が眼球の発達において重要な役割を果たしていることが確認され、その欠失が形態異常を引き起こす新たな知見が得られた。この知見は、斜視を含む眼疾患の予防や治療に向けた新たなアプローチの開発に寄与できるものである。

本研究の意義は、眼球形態の異常に関する新たな病因を明らかにすることで、眼疾患の早期診断と効果的な治療法の開発に貢献できる点にある。斜視やその他の眼疾患の原因を理解し、これに基づいた新しい治療戦略を構築する基盤を提供する。この研究は、遺伝子治療や精密医療の分野における重要なステップとなり、眼疾患による視覚障害の軽減や生活の質の向上に寄与することが期待される。今後の展望として、さらに詳細な分子メカニズムの解明が必要であり、*MGST2* 遺伝子の欠失が引き起こす具体的な細胞レベルの変化や、他の眼疾患との関連性を調査することが求められる。また、この遺伝子の変異がヒトの眼球形態異常や斜視にどのように影響するかを研究することも重要である。

謝辞

今回本研究の実施と本論文を著作するにあたり、多大な御助力と御指導を賜りました岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学研究科松尾俊彦教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行、実験手技の指導、方針決定に対して御指導頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科神経機構学分野宮地まり先生、細谷修先生及び岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（薬学部）上田真史教授、岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学研究科の同僚杉本昂平様に心より感謝申し上げます。

本研究に用いた遺伝子組み換えマウスを提供頂きました群馬大学生体調節研究所附属生体情報ゲノムリソースセンター畑田出穂教授、堀居拓郎准教授及び小林良祐先生に感謝申し上げます。

日々の研究において御助言・御支援頂きました松尾智江先生に感謝申し上げます。

最後に、長い学生生活を支援してくれた家族及び友人に最大限の感謝を申し上げます。

引用文献

1. Zhang, J.; Matsuo, T.; Hamasaki, I.; Sato, K. Whole Exome-Sequencing of Pooled Genomic DNA Samples to Detect Quantitative Trait Loci in Esotropia and Exotropia of Strabismus in Japanese. *Life* **2021**, *12*, 41.
2. Matsuo, T.; Chaomulige; Miyaji, M.; Hosoya, O.; Saito, A.; Nakazono, K. Candidate Genes in Testing Strategies for Linkage Analysis and Bioinformatic Sorting of Whole Genome Sequencing Data in Three Small Japanese Families with Idiopathic Superior Oblique Muscle Palsy. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8626.
3. Wang, Y.; Chen, X.; Jiang, T.; Gu, Y.; Zhang, X.; Yuan, W.; Zhao, A.; Li, R.; Wang, Z.; Hu, Z.; et al. Expanding the phenotypic spectrum of mutations in LRP2: A novel candidate gene of non-syndromic familial comitant strabismus. *J. Transl. Med.* **2021**, *19*, 495.
4. Ye, X.C.; Pegado, V.; Patel, M.S.; Wasserman, W.W. Strabismus genetics across a spectrum of eye misalignment disorders. *Clin. Genet* **2014**, *86*, 103–111.
5. Shaaban, S.; MacKinnon, S.; Andrews, C.; Staffieri, S.E.; Maconachie, G.D.E.; Chan, W.M.; Whitman, M.C.; Morton, S.U.; Yazar, S.; MacGregor, S.; et al. Genome-Wide Association Study Identifies a Susceptibility Locus for Comitant Esotropia and Suggests a Parent-of-Origin Effect. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci* **2019**, *59*, 4054–4064.
6. Engle, E. The Genetic Basis of Complex Strabismus. *Pediatr. Res* **2006**, *59*, 343–348.
7. Das, V.E. Strabismus and the Oculomotor System: Insights from Macaque Models. *Annu. Rev. Vis. Sci* **2016**, *14*, 37–59.

8. Beauchamp, G.R.; Black, B.C.; Coats, D.K.; Enzenauer, R.W.; Hutchinson, A.K.; Saunders, R.A.; Simon, J.W.; Stager, D.R.; Stager, D.R.Jr.; Wilson, M.E.; Zobal-Ratner, J.; Feliuss, J. Clinical characteristics and treatment. *J AAPOS* **2003**, *7*, 233-40.

9. Hatt, S.R.; Leske, D.A.; Castañeda, Y.S.; Wernimont, S.M.; Liebermann, L.; Cheng-Patel, C.S.; Birch, E.E.; Holmes, J.M. Association of Strabismus with Functional Vision and Eye-Related Quality of Life in Children. *JAMA Ophthalmol* **2020**, *138*, 528-535.

10. Hatt, S.R.; Leske, D.A.; Castañeda, Y.S. et al. Association of Strabismus with Functional Vision and Eye-Related Quality of Life in Children. *JAMA Ophthalmol* **2020**, *138*, 528–535.

11. Rowe, F.J.; Noonan, C.P. Botulinum toxin for the treatment of strabismus. *Cochrane Database Syst Rev* **2017**, *3*, CD006499.

12. Plotnikov, D.; Shah, R.L.; Rodrigues, J.N.; Cumberland, P.M.; Rahi, J.S.; Hysi, P.G.; Atan, D.; Williams, C.; Guggenheim, J.A. UK Biobank Eye and Vision Consortium. A commonly occurring genetic variant within the NPLOC4-TSPAN10-PDE6G gene cluster is associated with the risk of strabismus. *Hum. Genet* **2019**, *138*, 723–737.

13. Sanfilippo, P.G.; Hammond, C.J.; Staffieri, S.E.; Kearns, L.S.; Melissa Liew, S.H.; Barbour, J.M.; Hewitt, A.W.; Ge, D.; Snieder, H.; Mackinnon, J.R.; et al. Heritability of strabismus: Genetic influence is specific to esodeviation and independent of refractive error. Twin

Res. *Hum. Genet* **2012**, 15, 624–630.

14. Maconachie, G.D.; Gottlob, I.; McLean, R.J. Risk factors and genetics in common comitant strabismus: A systematic review of the literature. *JAMA Ophthalmol* **2013**, 131, 1179–1186.
15. Parikh V, Shugart YY, Doheny KF, Zhang J, Li L, Williams J, Hayden D, Craig B, Capo H, Chamblee D, Chen C, Collins M, Dankner S, Fiergang D, Guyton D, Hunter D, Hutcheon M, Keys M, Morrison N, Munoz M, Parks M, Plotsky D, Protzko E, Repka MX, Sarubbi M, Schnall B, Siatkowski RM, Traboulsi E, Waeltermann J, Nathans J. A strabismus susceptibility locus on chromosome 7p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100, 12283-8.
16. Plotnikov, D.; Shah, R.L.; Rodrigues, J.N.; Cumberland, P.M.; Rahi, J.S.; Hysi, P.G.; Atan, D.; Williams, C.; Guggenheim, J.A. A commonly occurring genetic variant within the NPLOC4-TSPAN10-PDE6G gene cluster is associated with the risk of strabismus. *Hum Genet* **2019**, 138, 723-737.
17. Wang, Y.; Chen, X.; Jiang, T.; Gu, Y.; Zhang, X.; Yuan, W.; Zhao, A.; Li, R.; Wang, Z.; Hu, Z.; Liu, H. Expanding the phenotypic spectrum of mutations in LRP2: a novel candidate gene of non-syndromic familial comitant strabismus. *J Transl Med* **2021**, 19, 495.
18. Fujiwara, H.; Matsuo, T.; Sato, M.; Yamane, T.; Kitada, M. Hasebe, S.; Ohtsuki, H. Genome-wide search for strabismus susceptibility loci. *Acta Med Okayama* **2003**, 57, 09-16.

19. Shaaban, S; Matsuo, T; Strauch, K.; Ohtsuki, H. Investigation of parent-of-origin effect in comitant strabismus using MOD score analysis. *Mol Vis* **2009**, 15, 1351-8.
20. Shaaban, S.; Matsuo, T.; Fujiwara, H.; Itoshima, E.; Furuse, T.; Hasebe, S.; Zhang, Q.; Ott, J.; Ohtsuki, H. Chromosomes 4q28.3 and 7q31.2 as new susceptibility loci for comitant strabismus. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci* **2009**, 50, 654–661.
21. Zhang, J.; Matsuo, T. *MGST2* and *WNT2* are candidate genes for comitant strabismus susceptibility in Japanese patients. *Peer J* **2017**, 5, e3935.
22. Jakobsson, P.J.; Morgenstern, R.; Mancini, J.; Ford-Hutchinson, A.; Persson, B. Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **2000**, 161, S20–S24.
23. Martinez Molina, D.; Eshaghi, S.; Nordlund, P. Catalysis within the lipid bilayer-structure and mechanism of the MAPEG family of integral membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol* **2008**, 18, 442–449.
24. Thulasingham, M.; Orellana, L.; Nji, E.; Ahmad, S.; Rinaldo-Matthis, A.; Haeggström, J.Z. Crystal structures of human *MGST2* reveal synchronized conformational changes regulating catalysis. *Nat. Commun* **2021**, 12, 1728.
25. Ahmad, S.; Niegowski, D.; Wetterholm, A.; Haeggström, J.Z.; Morgenstern, R.; Rinaldo-Matthis, A. Catalytic characterization of human microsomal glutathione S-transferase 2: identification of rate-limiting steps. *Biochemistry* **2013**, 52, 1755-64.

26. Zhao, G.; Zhao, W.; Cui, X.; Xu, B.; Liu, Q.; Li, H.; Guo, X. Identification of an *MGST2* gene and analysis of its function in antioxidant processes in *Apis cerana cerana*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol* **2021**, *106*, e21770.

27. Ahmad, S.; Thulasingham, M.; Palombo, I.; Daley, D.O.; Johnson, K.A.; Morgenstern, R.; Haeggström, J.Z.; Rinaldo-Matthis, A. Trimeric microsomal glutathione transferase 2 displays one third of the sites reactivity. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1854*, 1365–1371.

28. Rubinstein, M.; Dvash, E. Leukotrienes and kidney diseases. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* **2018**, *27*, 42–48.

29. Quiroz-Casian, N.; Chacon-Camacho, O.F.; Barragan-Arevalo, T.; Nava-Valdez, J.; Lieberman, E.; Salgado-Medina, A.; Navas, A.; Graue-Hernandez, E. O.; Zenteno, J.C. Sclerocornea-Microphthalmia-Aphakia Complex: Description of Two Additional Cases Associated With Novel FOXE3 Mutations and Review of the Literature. *Cornea* **2018**, *37*, 1178-1181.

30. Kit, V.; Cunha, D.L.; Hagag, A.M. Moosajee, M.; Longitudinal genotype-phenotype analysis in 86 patients with PAX6-related aniridia. *JCI Insight* **2021**, *6*, e148406.

31. Campenhout, C.V.; Cabochette, P.; Veillard, A.C.; Laczik, M.; Zelisko-Schmidt, A.; Sabatel, C.; Dhainaut, M.; Vanhollebeke, B.; Gueydan, C.; Kruys, V. Guidelines for optimized gene knockout using CRISPR/Cas9. *Biotechniques* **2019**, *66*, 295-302.

32. Gaj, T.; Gersbach, C.A.; Barbas, C.F. 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* **2013**, *31*, 397-405.

33. Horii, T.; Morita, S.; Kimura, M.; Terawaki, N.; Shibutani, M.; Hatada, I. Efficient generation of conditional knockout mice via sequential introduction of lox sites. *Sci. Rep* **2017**, *7*, 7891.

34. Horii, T.; Kobayashi, R.; Hatada, I. Generation of Floxed Mice by Sequential Electroporation. *Methods Mol. Biol* **2023**, *2637*, 135–147.

35. Lindhardt, T.B.; Gutiérrez-Jiménez, E.; Liang, Z.; Hansen, B. Male and Female C57BL/6Mice Respond Differently to Awake Magnetic Resonance Imaging Habituation. *Front. Neurosci* **2022**, *16*, 853527.

36. Fiedorowicz, M.; Wełniak-Kamińska, M.; Świątkiewicz, M.; Orzeł, J.; Choraśiewicz, T.; Toro, M.D.; Rejdak, R.; Bogorodzki, P.; Grieb, P. Changes of Ocular Dimensions as a Marker of Disease Progression in a Murine Model of Pigmentary Glaucoma. *Front. Pharmacol* **2020**, *11*, 573238.

37. Dvash, E.; Har-Tal, M.; Barak, S.; Meir, O.; Rubinstein, M. Leukotriene C4 is the major trigger of stress-induced oxidative DNA damage. *Nat. Commun* **2015**, *6*, 10112.

38. Ludwig, I.H.; Clark, R.A.; Stager, D.R., Sr. New strabismus surgical techniques. *J. AAPOS* **2013**, *17*, 79–88.

39. Llorente, L.; Barbero, S.; Cano, D.; Dorronsoro, C.; Marcos, S. Myopic versus hyperopic eyes: Axial length, corneal shape and optical aberrations. *J. Vis* **2004**, *4*, 288–298.
40. Stone, R.A.; Flitcroft, D.I. Ocular shape and myopia. *Ann. Acad. Med. Singap* **2004**, *33*, 7–15.
41. Nishida, T.; Saika, S. Cornea and sclera: Anatomy and physiology. *Cornea* **2010**, *1*, 3–24.
42. Verkicharla, P.K.; Mathur, A.; Mallen, E.A.; Pope, J.M.; Atchison, D.A. Eye shape and retinal shape, and their relation to peripheral refraction. *Ophthalmic Physiol. Opt* **2012**, *32*, 184–199.
43. Tatewaki, Y.; Mutoh, T.; Omodaka, K.; Thyreau, B.; Matsudaira, I.; Furukawa, H.; Yamada, K.; Kunitoki, K.; Kawashima, R.; Nakazawa, T.; et al. Morphological prediction of glaucoma by quantitative analyses of ocular shape and volume using 3-dimensional T2-weighted MR images. *Sci. Rep* **2019**, *9*, 15148.
44. Topilow, N.J.; Tran, A.Q.; Koo, E.B.; Alabiad, C.R. Etiologies of Proptosis: A review. *Intern. Med. Rev* **2020**, *6*, 10.
45. Ambekar, R.; Toussaint, K.C., Jr.; Wagoner Johnson, A. The effect of keratoconus on the structural, mechanical, and optical properties of the cornea. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater* **2011**, *4*, 223–236.

46. Aerts, I.; Lumbroso-Le, R.L.; Gauthier-Villars, M.; Brisse, H.; Doz, F.; Desjardins, L. Retinoblastoma. *Orphanet J. Rare Dis* **2006**, *1*, 31.
47. Cavodeassi, F.; Creuzet, S.; Etchevers, H.C. The hedgehog pathway and ocular developmental anomalies. *Hum. Genet* **2019**, *138*, 917–936.
48. Vaiman, M.; Gottlieb, P.; Bekerman, I. Quantitative relations between the eyeball, the optic nerve, and the optic canal important for intracranial pressure monitoring. *Head Face Med* **2014**, *10*, 32.
49. Amer, R.; Nalcı, H.; Yalçındağ, N.; Exudative retinal detachment. *Surv Ophthalmol* **2017**, *62*, 723-769.
50. Messmer, E.M. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. *Dtsch Arztebl Int* **2015**, *112*, 71-81.
51. Au, J.M.; Kancharla, S.; Hamade, M.; Mendoza, M.; Chan, K.C. In vivo MRI evaluation of early postnatal development in normal and impaired rat eyes. *Sci. Rep* **2021**, *11*, 15513.
52. Haskell, M.W.; Nielsen, J.F.; Noll, D.C. Off-resonance artifact correction for MRI: A review. *NMR Biomed* **2023**, *36*, e4867.
53. Theocharis, S.; Pappas, E.P.; Seimenis, I.; Kouris, P.; Dellios, D.; Kollias, G.; Karaiskos, P.

Geometric distortion assessment in 3T MR images used for treatment planning in cranial Stereotactic Radiosurgery and Radiotherapy. *PLoS ONE* **2022**, 23, e0268925.

54. Chang, H.; Fitzpatrick, J.M. A technique for accurate magnetic resonance imaging in the presence of field inhomogeneities. *IEEE Trans. Med. Imaging* **1992**, 11, 319–329.
55. Kitada, M.; Matsuo, T.; Yamane, T.; Hasebe, S.; Ohtsuki, H. Different levels of TIMPs and MMPs in human lateral and medial rectus muscle tissue excised from strabismic patients. *Strabismus* **2003**, 11, 145–155.
56. Yamane, T.; Matsuo, T.; Hasebe, S.; Ohtsuki, H. Clinical correlations of aggrecan in the resected medial rectus muscle of patients with intermittent exotropia. *Acta Med. Okayama* **2003**, 57, 199–204.

資金提供

本研究の一部は、日本医療研究開発機構（AMED）の創薬・ライフサイエンス研究支援基盤事業（BINDS）の助成金（助成番号 JP23ama121049、研究代表・畑田出穂教授）を得て行われた。

参考論文

本博士論文は以下の論文を元に作成された。

Chaomulige, Matsuo T, Sugimoto K, Miyaji M, Hosoya O, Ueda M, Kobayashi R, Horii T, Hatada I. Morphometric Analysis of the Eye by Magnetic Resonance Imaging in *MGST2*-Gene-Deficient Mice. *Biomedicines* **2024**, 12, 370.