

令和元年5月20日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11305

研究課題名(和文)患者iPS細胞由来視細胞標識による網膜色素変性症疾患メカニズムの解析

研究課題名(英文) Investigation of disease mechanisms by fluorescent labeling of photoreceptor derived from retinitis pigmentosa patient-derived induced pluripotent stem cells

研究代表者

本間 耕平 (Homma, Kohei)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：80462729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまでに既に作製された網膜色素変性症(RP)患者由来iPS細胞(RP1, RP9, PRPH2, RHOの変異株)を使用した。得られたRPのiPS細胞のラインのゲノムを抽出し遺伝子変異を確認した。これらのラインから分化させた桿体視細胞を選択的に標識するために、ゲノム編集によるノックインを行った。これによりGFPの蛍光で分化した視細胞が確認できる。この視細胞に分化した細胞をGFPで標識することができ、その後の遺伝子発現、機能解析を行うことが可能となった。この技術を用いて分化した蛍光タンパク質標識視細胞を比較することによって疾患メカニズムやドラッグスクリーニングを検討することができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性症や加齢黄斑変性症などの視細胞変性疾患は、緑内障、糖尿病網膜症に次いで日本国内の主要な失明原因となっている(厚生労働省資料)。これらの視細胞変性疾患では、様々な遺伝子の変異により、網膜で光を感じる視細胞が細胞死を引き起こすが、この細胞死のメカニズムについては、ほとんど明らかではない。本研究で作製された遺伝子改変のヒトiPS細胞のラインから分化したGFP陽性の視細胞を用いることによって、より詳細に細胞死のメカニズムを調べることができ、またGFPによるドラッグスクリーニングを検討できるようになった。

研究成果の概要(英文)：In this research, several human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) were used to investigate the disease mechanism of retinitis pigmentosa (RP). Genomic mutation of RP patient derived hiPSCs were confirmed by genomic PCR and conventional sequencing. Genome of these cell lines (and wild-type control hiPSCs) were edited with CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins). In these cell lines, photoreceptor specific promoter GFP expression cassette were inserted in both alleles of AAVS1 sites, safe harbor for gene insertion, thus derived photoreceptors from these hiPSC lines were fluorescently labeled with GFP. By using these cell lines, the gene expressions and the cellular function could be investigated specifically in photoreceptors. These fluorescently labelled cells could be used for the investigation of disease mechanisms and the drug screening.

研究分野：神経科学

キーワード：ヒトiPS細胞 網膜色素変性症 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症や加齢黄斑変性症などの視細胞変性疾患は、緑内障、糖尿病網膜症に次いで日本国内の主要な失明原因となっている(厚生労働省資料)。これらの視細胞変性疾患では、様々な遺伝子の変異により、網膜で光を感受する視細胞が細胞死を引き起こす。近年の遺伝子解析技術の発達により、これまでに 200 以上の原因遺伝子が特定されているが (RetNetTM: www.sph.uth.edu/retnet/)、未だこれらは全体の一部であり、個々の遺伝子についての細胞死のメカニズムについては、ほとんど明らかではない。これについては、

- (1) 研究者が詳細に研究することのできるモデルマウスが限られている
- (2) マウスとヒトでは寿命が異なるため、フェノタイプの比較が難しい
- (3) マウスとヒトの進化の過程における遺伝子の役割の変化 (遺伝子重複, 変異など) などが、これらの疾患研究の律速となっていると考えられる。

そこで以前、研究代表者らは、induced-Pluripotent Stem (iPS)細胞作製技術を用いて、何人かの網膜色素変性患者線維芽細胞から iPS 細胞を作製し、視細胞に分化させることで、いくつかの薬剤に対する反応を比較した (Jin ZB et al., 2011)。しかしながら、当時の解析方法としては、各種マーカーの細胞免疫抗体染色での比較にとどまっていた。

近年、ゲノム編集技術が発展し、ヒト ES/iPS 細胞のノックインが比較的容易に行えるようになってきており、研究代表者らも Zinc finger nuclease を用いて、ヒト ES 細胞の 19 番染色体にある Safe harbor (ヒト細胞内で強く起こるサイレンシングを免れる) に、視細胞に特異的な転写遺伝子である Crx のプロモーターと GFP を挿入することで、ヒト視細胞を特異的に標識することに成功し、ヒト視細胞の発生過程における網羅的遺伝子発現の継時的変化を調べた (Kaewkhaw R et al., 2015)。さらに、最近研究代表者らは CRISPR/Cas9 を用いて、Crx 遺伝子の 3' 末端に 2A ペプチドと赤色蛍光タンパク質 (E2-Crimson) 遺伝子を挿入することで、Crx 陽性細胞を標識することに成功した。

2. 研究の目的

本研究では、このヒト iPS 細胞ノックインによる蛍光標識技術を、網膜色素変性患者由来 iPS 細胞に適用することで、疾患患者由来視細胞と、正常視細胞を比較し、細胞死に関わる遺伝子群や代謝物の変化について探索することを目的とする。

3. 研究の方法

<網膜色素変性患者 iPS 細胞ノックインライン樹立>

本研究では、これまでに既に作製された網膜色素変性患者由来 iPS 細胞 (RP1, RP9, PRPH2, RHO: Jin ZB et al., 2011; CEP290: 未発表) を使用した。この中で、RP9 については、動物モデルが存在しないが、他の遺伝子については、マウスのモデルがあるため、各種細胞死シグナルや、ストレスマーカーなど、マウスのデータとの比較ができる。

視細胞の標識については、CRISPR/Cas9 または、TALEN システムによるノックイン方法を用いた。CRISPR/Cas9 の方法では、ターゲットとなるタンパク質が発現した時に蛍光タンパク質がターゲットのタンパク質と等量発現する。このとき、各遺伝子のプロモーターを同定する必要がないため、あらゆるマーカー遺伝子に適用可能である。また本研究では、TALEN システムによる AAVS1 サイトへのノックインも用いた。この方法では、サイレンシングの影響を受けにくい AAVS1 サイトへ選択的なノックインをすることによって網膜色素変性で細胞死を引き起こす桿体視細胞に特異的な Nr1 プロモーターを用いた分化視細胞の標識を行った。

ノックインの手順としては (図 1A)、各遺伝子の 3' 末端の遺伝子部位の上流 (Homologous Arm-left, HAL) と下流 (Homologous Arm-right, HAR) を Bacterial Artificial Chromosome (BAC) ベクターからクローニングして、ドナーベクターに挿入する。このときに、標的遺伝子のストップコドン を削除しておく。標的遺伝子の後に 2A ペプチドと蛍光タンパク質遺伝子を挿入する (同時に、抗生物質耐性遺伝子発現カセットも挿入)。これによって、標的遺伝子が翻訳された時に同時に蛍光タンパク質も翻訳され、標的遺伝子の翻訳後に 2A ペプチドは内在性の酵素により切断されるために蛍光タンパク質は細胞質に遊離する。また、Cas9 のターゲットを決める single-guide RNA (20 塩基) を発現するベクターを作製する。これらと Cas9 発現ベクターを同時にエレクトロポレーションで iPS 細胞に遺伝子導入し、その後 2 週間ほど抗生物質を添加した培地で細胞を選択することでシングルコロニーを採取する。

<網膜色素変性症患者由来視細胞と正常視細胞の比較解析>

得られたシングルコロニーの iPS 細胞ラインは増幅され、そのゲノム DNA が抽出された。これらの中からゲノム PCR、ゲノムシーケンシングにより標的部位に正しく遺伝子が挿入されているものを選択し、確認されたラインについて、網膜細胞に分化させる 3 次元培養を開始した。この分化培養では既に視細胞へ分化することが確認されている方法を用いた (Kaewkhaw R et al., 2015)。

(1) 網膜3次元培養による視細胞ライブイメージング

先行研究(Jin ZB et al., 2011)では、網膜色素変性患者 iPS 細胞由来の網膜桿体視細胞は、分化培養開始後 120 日に見られ、150 日に減少した。一方、正常 iPS 細胞由来桿体視細胞ではこの減少が見られないため、これは疾患過程を模擬していると考えられた。本研究では蛍光タンパク質標識により、抗体染色での比較をする必要がないため、分化成熟過程における、生存率の変化や、細胞動態解析など、より精緻なデータが得られると考えられる。

(2) 網膜視細胞の遺伝子発現解析

従来の基礎研究では、細胞死を起こす視細胞を染色等で特定しなければならないため、解析が不十分であった。本研究の視細胞の蛍光タンパク質標識により、FACS(fluorescence activated cell sorting)法を適用し、視細胞の純化をすることで、特異的に発現する遺伝子を詳細に解析することができた。解析は、Realtime PCR で行った。

4. 研究成果

<網膜色素変性患者 iPS 細胞ノックインライン樹立>

まず、コントロールの iPS 細胞から分化した視細胞の遺伝子発現について調べるために、視細胞のマーカーである *Crx* の終始コドンの付近に gRNA を設計し、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術により、2A ペプチドと蛍光タンパク質 (E2-Crimson) 遺伝子を挿入した。これにより、*Crx* 遺伝子が発現した細胞において E2-Crimson が発現し、ライブイメージングと FACS によって、遺伝子発現のプロファイルデータを得ることができた (Homma K et al., Genes Cells 2017, Homme K, Stem Cell Transl Investig 2017, 図 1B,C)。さらに、錐体視細胞のマーカーである *Pde6H* の終始コドン部位に同様に 2A ペプチドと YFP をノックインすることにより、同時に錐体視細胞を選択的に標識するダブルノックインのラインを樹立した (図 1C,D, 投稿準備中)。これらを用いて、ヒト iPS 細胞から分化して得ることができるコントロールの視細胞の基礎的な情報を得ることができた。

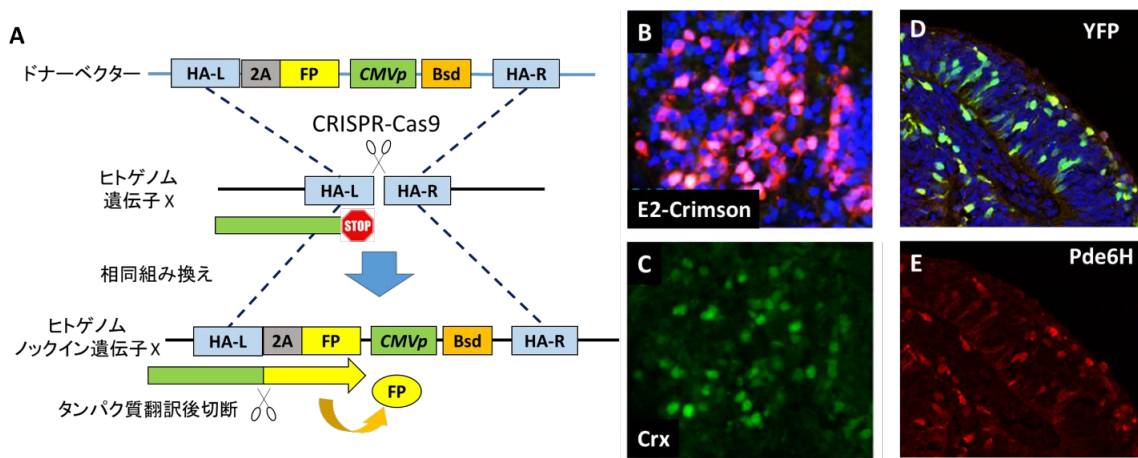


図 1 ノックインヒト iPS 細胞の樹立 (A) 2A ペプチド配列を用いたバイシストロニック発現レポーターノックインラインの作製。(B、C) ノックイン iPS 細胞由来網膜視細胞の *Crx* とレポーター (E2-Crimson) の共発現。(D、E) 同細胞の *Pde6H* とレポーター (YFP) の共発現。

<網膜色素変性症患者由来視細胞と正常視細胞の比較解析>

次に、これまでに既に作製された網膜色素変性症 (RP) 患者由来 iPS 細胞 (RP1, RP9, PRPH2, RHO: Jin ZB et al., 2011; RHO#5, RHOmut-induced: Yoshida T et al., 2014) を使用してノックインラインを作製した。これらの細胞は理化学研究所バイオリソースセンターに供与申請を行い、慶應義塾大学の倫理委員会の承認後に入手することができた。得られた RP の iPS 細胞のライン (59M8 (RHO_562G>A 変異), K10M5 (RP9_410A>T 変異), K11PD17 (RP9_410A>T 変異), K21S4 (RP1_2162insC 変異), K31M28 (RHO_520G>A 変異, PRPF31_613_615delTAC 変異), RHO#5 (RHO_541G>A 変異, RHOmut-induced (RHO_541G>A 変異)) のゲノムを抽出しシーケンスでヘテロの変異を確認した。これらのラインから分化させた桿体視細胞を選択的に標識するために、CRISPR/Cas9 システムによるノックイン方法を行った。この方法では、ヒトゲノム上の Safe harbor と言われる AAVS1 サイトに桿体視細胞に特異的な Nr1 遺伝子のプロモーター-GFP 発現カセット (Nr1p-GFP) を挿入した (図 2A, B)。これにより、網膜桿体視細胞に分化した細胞を GFP で標識することができ、その後の遺伝子発現、機能解析を行うことが可能となった。現在、樹立した、網膜錐体視細胞および桿体視細胞を標識することができるコントロール iPS 細胞を用いて、遺伝子解析を行っているところである (図 2C, 未発表)。これらコントロールラインと、疾患 iPS 細胞ノックインラインから分化した蛍光タンパク質標識視細胞を比較することに

よって疾患メカニズムやドラッグスクリーニングを検討することができる。

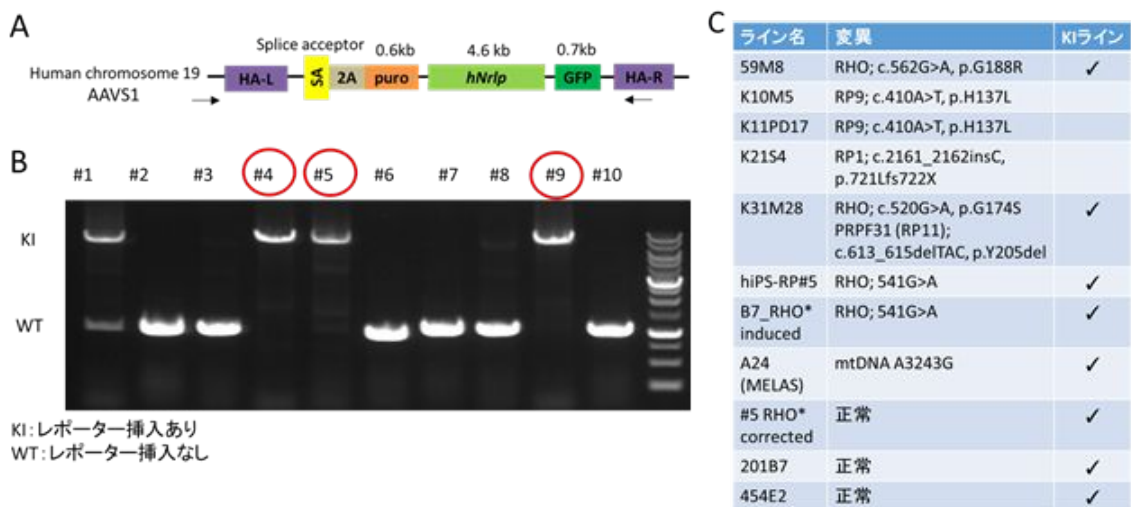


図2 網膜色素変性 iPS 細胞レポーターラインの樹立 (A) ヒト 19 番染色体の AAVS1 サイト (サイレンシングが起こらない) に Nrlp-GFP(桿体視細胞を標識)を挿入した。(B) ゲノム PCR で遺伝子の挿入を確認した。#4, #5, #9 で両アレルに挿入されている。(C) 樹立したライン一覧

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. Homma K “Bicistronic 2A-peptide-based co-expression reporter knock-in strategy by CRISPR/Cas9 system: application to the labeling of specific cell lineages and gene expression monitoring.” Stem Cell Transl Investig 2017; 4:e1551. doi: 10.14800/scti.1551. (査読有)
2. Homma K*, Usui S, Kaneda M. “Knock-in strategy at 3'-end of Crx gene by CRISPR/Cas9 system shows the gene expression profiles during human photoreceptor differentiation.” Genes Cells. 2017 Jan 26. doi: 10.1111/gtc.12472. PMID: 28124402 (*corresponding author) (査読有)

[学会発表](計 10 件)

1. 本間耕平, 小澤洋子, “ゲノム編集ノックインヒト iPS 細胞による錐体視細胞分化過程解析”, 第 22 回視覚科学フォーラム, 2018 年
2. 本間耕平, 小澤洋子, “Gene expression analysis of cone photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells in the three dimensional retinal differentiation culture”, 第 41 回日本神経科学学会, 2018 年
3. Homma K., Ozato N., Tsubota K., Okano H., Ozawa Y., “Monitoring the developing photoreceptors in the hiPSC-derived three dimension retinal organoid culture using bicistronic 2A-peptide-based co-expression reporter knock-in system”, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2018 (Oral)
4. 本間耕平, 尾里納美, 小澤洋子, “ノックインヒト iPS 細胞による 3 次元網膜オルガノイド形成の可視化”第 17 回日本再生医療学会, 2018 年
5. 本間耕平, “ノックインヒト iPS 細胞による視細胞分化過程の遺伝子発現解析” 第 22 回眼科分子生物学研究会, 2018 年
6. Homma K., Ozawa Y., “Bicistronic 2A-peptide-based co-expression reporter knock-in hiPSC lines revealed gene expression profiles during human photoreceptor differentiation.”, Society for Neuroscience 2017 (Oral)
7. 本間耕平, 小澤洋子, “Bicistronic 2A-peptide-based co-expression reporter knock-in strategy for the labeling of human induced pluripotent stem cell-derived photoreceptors.”, 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年 (ポスター, 査読無)

8. 本間耕平, 小澤洋子, “ノックインヒト iPS 細胞による 3 次元網膜組織の可視化への取り組み”, 視覚科学フォーラム, 2017 年 (口頭, 査読無)
9. 本間耕平: “Bicistronic 2A-peptide-based co-expression reporter knock-in hiPSC lines revealed gene expression profiles during human photoreceptor differentiation.”, 日本生物物理学会第 55 回年会, 2017 年 (口頭, 査読無)
10. Homma K., “Bicistronic 2A-peptide-based co-expression reporter knock-in strategy for hiPSC: Application to the labeling of specific cell lineages and gene expression monitoring”, 2017 (Oral, IRCMS mini-symposium)

〔図書〕(計 1 件)

1. 本間耕平 “CRISPR/Cas9 ゲノム編集による網膜視細胞の蛍光標識技術とその応用”, BIO Clinica Vol.32 No.6:75-77. 2017 年, 北隆館

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 標的遺伝子の標識方法、ベクターシステム、細胞、及び遺伝子活性維持標的遺伝子編集キット

発明者: 本間耕平

権利者: 同上

種類: 特許

番号: : 特願 2016-179955

出願年月日: 2016 年 9 月 14 日

国内外の別: 国内

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。