

令和 3 年 10 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16923

研究課題名（和文）新規遺伝子異常を有する疾患特異的iPS細胞を用いた網膜色素変性症の病態解明

研究課題名（英文）Pathological elucidation in induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells established from Patient with Retinitis Pigmentosa Carrying novel gene abnormality

研究代表者

岩井 祥子 (Iwai, Sachiko)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：00768905

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：網膜色素変性症（RP）は、難治性の遺伝性変性疾患であり、いまだ病態は解明されていない。MERTKはRPの原因遺伝子の1つで、MERTK蛋白は網膜色素上皮（RPE）に発現しており、視細胞外節を貪食する際に不可欠である。我々は、MERTKの新規遺伝子異常を伴う患者由来iPS細胞をRPE細胞に分化する方法を確立し、健常者由来iPS-RPEと比較した。両者に明らかな形態学的な差異は認められなかった。しかし、ラテックスビーズもしくは摘出牛視細胞外節をiPS-RPEに貪食させたところ、患者由来iPS-RPEの貪食能は、健常者由来iPS-RPEの貪食能より著明に低下していたことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性症は遺伝性の網膜脈絡膜変性疾患で、100以上の原因遺伝子が同定されているが、患者から病変組織を採取することができず正確にヒトの病態を再現することが難しく、これまで詳細な病態解明や治療法の開発が困難であった。しかし、我々はiPS細胞からRPE（iPS-RPE）へ分化誘導する方法を確立し、患者由来iPS-RPEを得ることができるようになった。本研究では、新規MERTK遺伝子変異をもつ患者由来iPS-RPEの貪食機能が、健常者由来iPS-RPEと比較して低下していることが明らかになった。このin vitroの結果は、今後病態解明や将来的な治療法開発の礎を築くことに役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Retinitis pigmentosa (RP) is an incurable retinal degenerative disease with a yet unelucidated mechanism of disease progression. Mer tyrosine kinase (MERTK) is one of the causal genes of RP. MERTK is reportedly expressed in retinal pigment epithelium (RPE); it is essential for phagocytosis of the photoreceptor outer segment. Here, we established induced pluripotent stem cells (iPSC) from an RP patient with compound heterozygous mutations in MERTK and from healthy subjects; the RP patient- and healthy control-derived iPSCs were differentiated into RPE cells. There were no morphological differences between the diseased and normal RPE cells. However, the internalization of latex beads or photoreceptor outer segments in diseased iPSC-RPE cells was significantly deteriorated compared to normal iPSC-RPE cells.

研究分野：眼科学

キーワード：MERTK 網膜色素変性 疾患特異的iPS細胞 iPS-RPE

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は、中途失明の上位を占める遺伝性の網膜脈絡膜の変性疾患である。視細胞や網膜色素上皮 (RPE) で働く 100 以上の遺伝子異常が同定されているが、患者から病変組織を採取することが不可能なため、正確にヒトの病態を再現することが難しく、これまで詳細な病態解明や治療法の開発が困難であった。しかし、induced pluripotent stem (iPS) 細胞から網膜色素上皮 (iPS-RPE) へ分化誘導する方法を確立し、患者由来 iPS-RPE 細胞を得ることができるようになった。

### 2. 研究の目的

本研究では、それぞれ異なった新規 *MERTK* 遺伝子変異をもつ網膜色素変性患者から樹立した iPS 細胞由来 RPE を用いて、患者 iPS-RPE での細胞形態、食食機能、遺伝子・タンパク発現などを健常者 iPS-RPE と比較することで、病態メカニズムを明らかにし、将来的な治療法開発の礎を築くことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 患者由来 iPS 細胞ならびに健常者由来 iPS 細胞を樹立した。また、これらの iPS 細胞から RPE 細胞 (iPS-RPE) を分化させた。

(2) 患者由来 iPS-RPE 細胞と健常者由来 iPS-RPE 細胞間で、形態に差がないか、光学顕微鏡下、電子顕微鏡下で観察した。また、免疫染色により、RPE 特異的タンパク質の発現状況を観察した。

(3) 患者由来 iPS 細胞と健常者由来 iPS 細胞、患者由来 iPS-RPE 細胞と健常者由来 iPS-RPE 細胞の間に、それぞれ遺伝子発現に差異がないか、qRT-PCR にて主要遺伝子 (*RPE65*, *CRALBP*, *BEST1*, *MERTK*) の発現を解析した。

(4) iPS-RPE において、タンパク (*RPE65*, *CRALBP*, *BEST1*, *MERTK*) の発現に差異がないか、ウェスタンブロッティングを用いて確認した。

(5) 生細胞計測試験薬を用い、吸光度測定により iPS-RPE の増殖率を測定した。

(6) 患者由来 iPS-RPE と健常者由来 iPS-RPE の間で、食食能に差異がないか、蛍光ビーズならびに摘出牛眼視細胞外節を用い、蛍光顕微鏡下での観察、FACS 解析ならびにロドプシンのウェスタンブロッティングを行い、多角的に検討した。

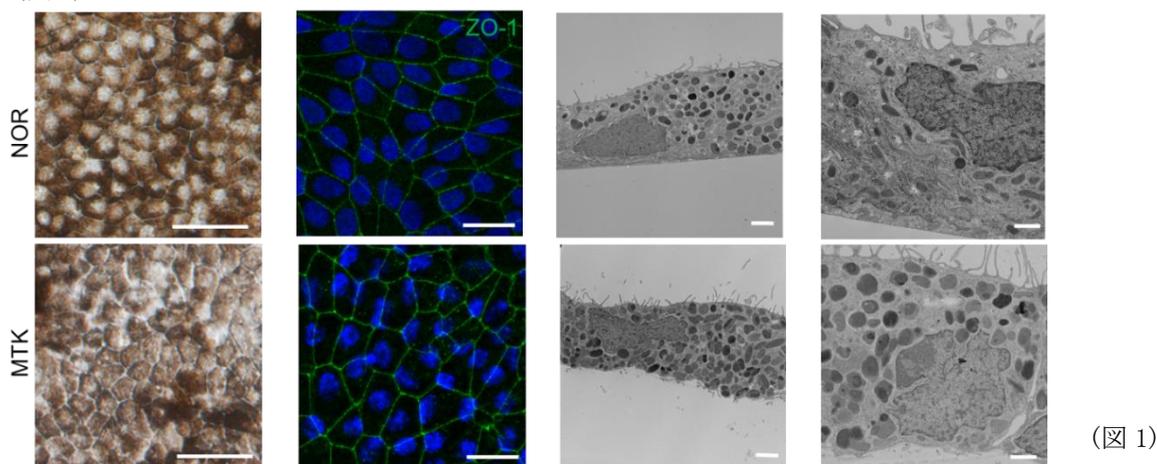
### 4. 研究成果

(1) 今回、患者由来 iPS-RPE 細胞 2 ライン (MTK 1、MTK 2) と、健常者由来 iPS-RPE 細胞 3 ライン (NOR 1、NOR 2、NOR 3) を RPE に分化させることができた。

(2) 光学顕微鏡写真では、両者の RPE 細胞ともに、色素を持ち、六角柱、敷石状の形態を呈していた。免疫染色標本の顕微鏡写真では、タイトジャンクションマーカーである ZO-1 の染色が、両者同様にみられた。また、電顕写真では、両者ともに微絨毛、多数の pigment 顆粒を含む形態であった。

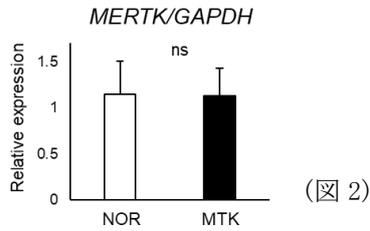
これらから、形態的には、患者・健常者由来 iPS-RPE 細胞間で大きな差異はないと判断した。

(図 1)



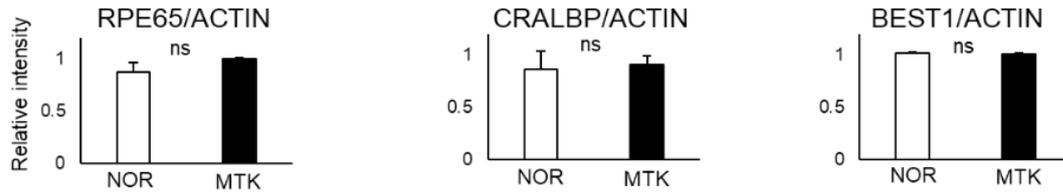
(図 1)

(3) *MERTK* の発現において、mRNA レベルでは、患者由来 iPS-RPE と健常者由来 iPS-RPE の両者に有意な差を認めなかった。(図 2)



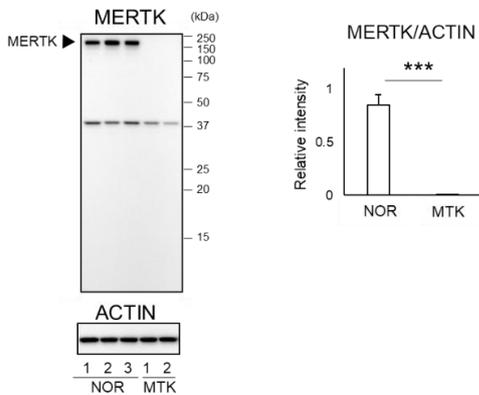
(図 2)

その他の遺伝子の mRNA の発現量については、健常者由来・患者由来の両者いずれにおいても、分化した iPS-RPE 細胞の方が、未分化の iPS 細胞と比較して有意に高値を示し、健常者由来・患者由来の iPS-RPE では差が無かった。(図 3)



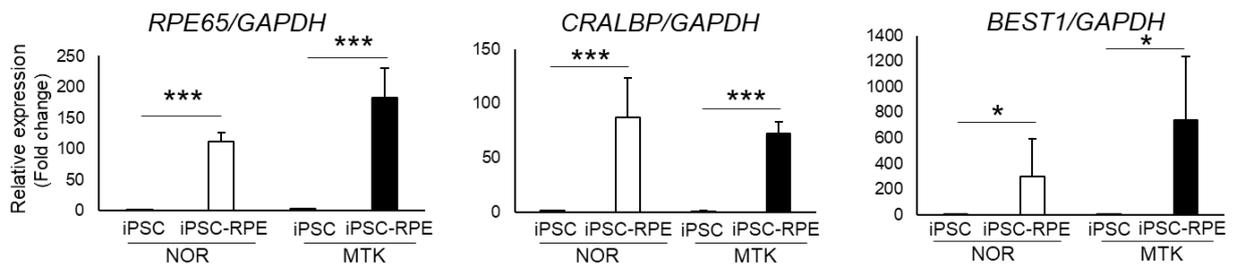
(図 3)

(4) 健常者由来の iPS-RPE では MERTK タンパクの発現がみられ、患者由来の iPS-RPE では発現がみられなかった。(図 4)



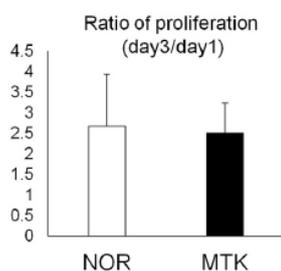
(図 4)

RPE65、CRALBP、BEST1 タンパクの発現は、健常者由来・患者由来の iPS-RPE 間に有意な差はなかった。(図 5)



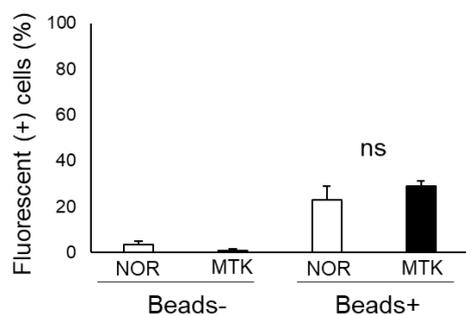
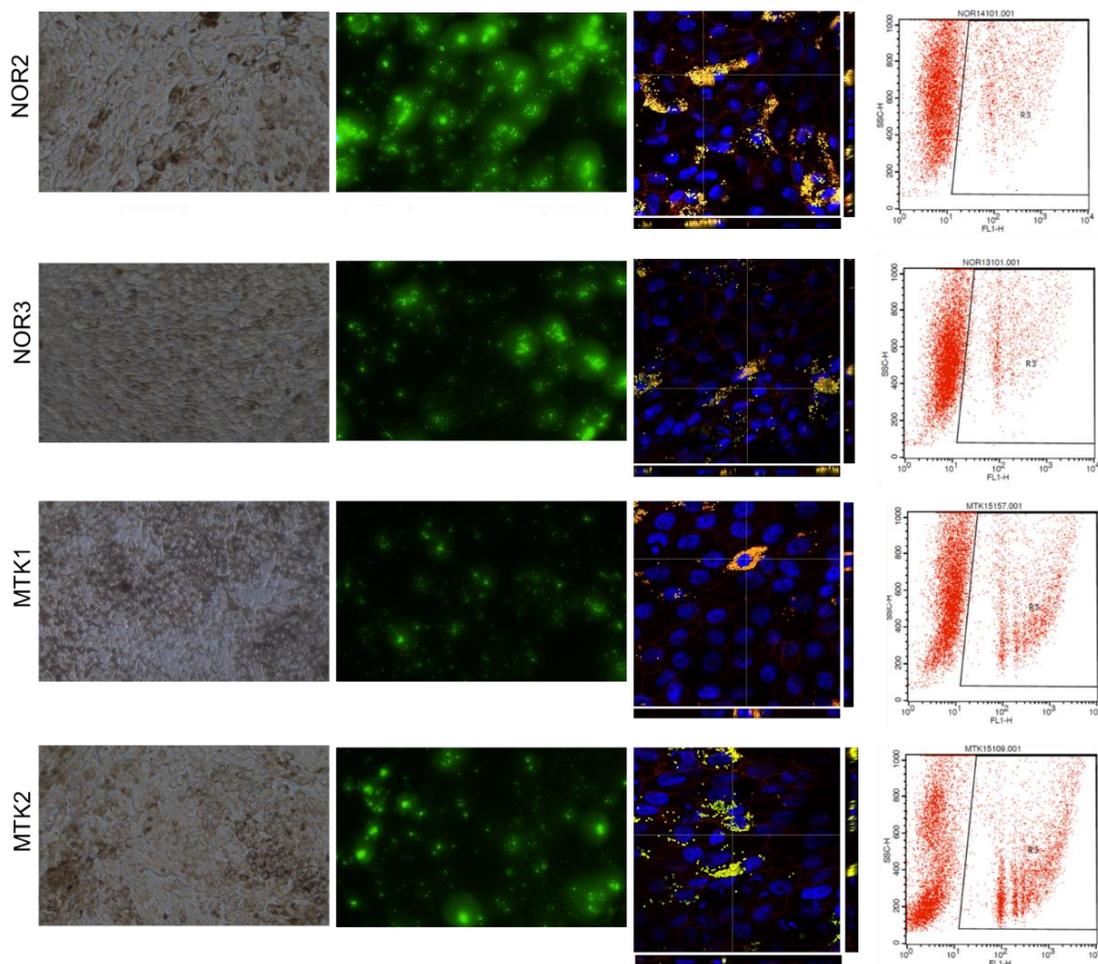
(図 5)

(5) 患者由来 iPS-RPE と健常者由来 iPS-RPE の両方で、細胞増殖能において有意な差は認めなかった。(図 6)



(図 6)

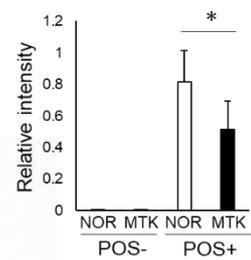
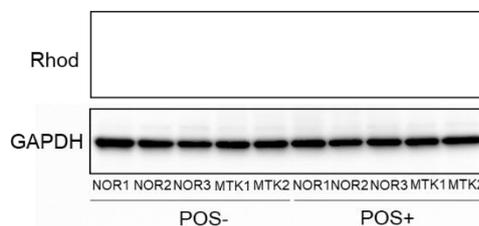
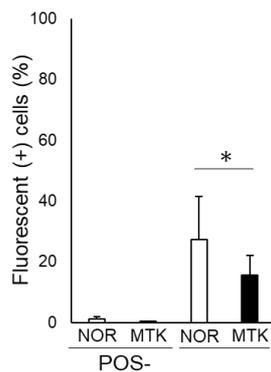
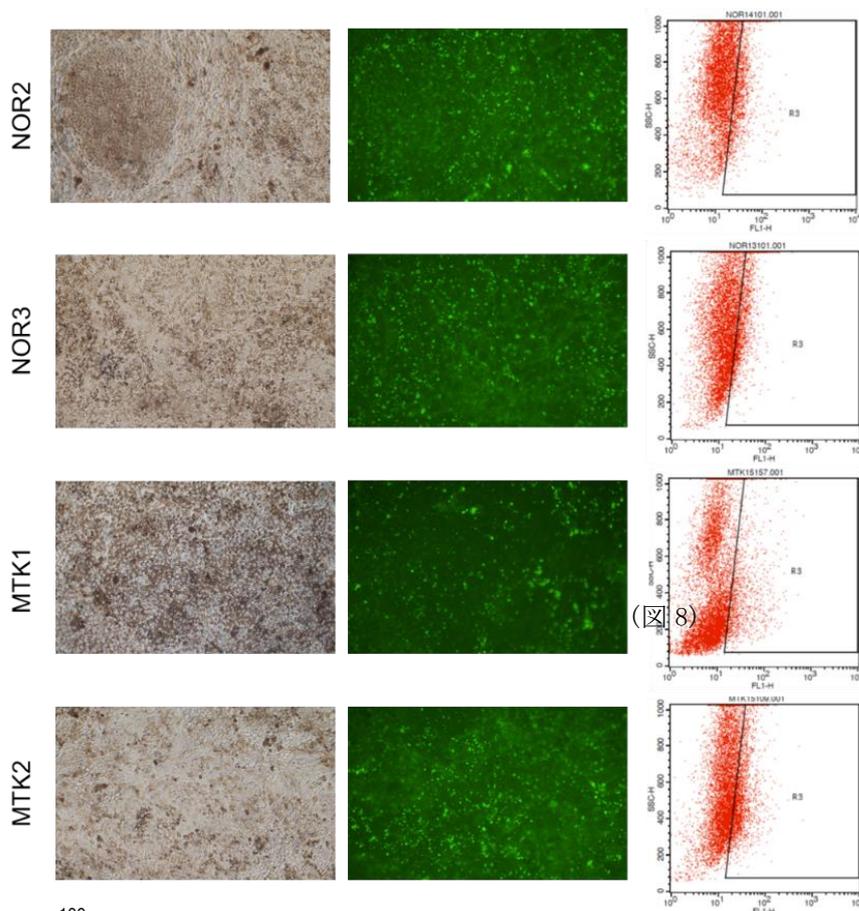
(6) 蛍光ビーズ使用下では、FACS 解析の結果より、蛍光標識ビーズの RPE 細胞内の取り込みにおいて、患者・健常者由来 iPS-RPE 細胞間で有意な差はみられなかった。(図 7)



<蛍光ビーズを貪食させた結果>  
FACS 解析

(図 7)

摘出牛眼視細胞外節使用下では、FACS 解析、ウェスタンブロッティング解析のいずれにおいても、患者由来 iPS-RPE の方が、健常者由来 iPS-RPE よりも貪食能が有意に低下していることが明らかになった。(図 8, 9)



<蛍光ビーズを食食させた結果>

① FACS 解析 (図 8)

② ウェスタンブロッティング解析 (図 9)

## 5. 主な発表論文等

[英文論文]

Deterioration of phagocytosis in induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells established from patient with retinitis pigmentosa carrying *Mer* tyrosine kinase mutations. Miho Tagawa, Hanako Ohashi Ikeda, Yumi Inoue, Sachiko Iwai, Yuto Iida, Masayuki Hata, Isao Asaka, Akitaka Tsujikawa. *Exp Eye Research* 2021 205:108503. doi: 10.1016/j.exer.2021.108503

[学会発表]

① 「*MERTK* 遺伝子異常を有する網膜色素変性患者由来 iPS 細胞から分化誘導させた網膜色素上皮細胞における食食能低下」 田川美穂、池田華子、井上由美、岩井祥子、飯田悠人、畑匡侑、浅香勲、辻川明孝 第 125 回日本眼科学会総会 2021/4/11

② Deterioration of phagocytosis in induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells established from patient with retinitis pigmentosa carrying *Mer* tyrosine kinase mutations. Miho Tagawa, Hanako Ohashi Ikeda, Yumi Inoue, Sachiko Iwai, Yuto Iida, Masayuki Hata, Isao Asaka, Akitaka Tsujikawa. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2021 Annual Meeting. 2021/5/7

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hata Masayuki, Ikeda Hanako O., Iwai Sachiko, Iida Yuto, Gotoh Norimoto, Asaka Isao, Ikeda Kazutaka, Isobe Yosuke, Horii Aya, Nakagawa Saori, Yamato Susumu, Arita Makoto, Yoshimura Nagahisa, Tsujikawa Akitaka	4. 巻 115
2. 論文標題 Reduction of lipid accumulation rescues Bietti's crystalline dystrophy phenotypes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 3936 ~ 3941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1717338115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Tomoko, Ikeda Hanako Ohashi, Gotoh Norimoto, Iida Kei, Iwai Sachiko, Nakano Noriko, Kakizuka Akira, Tsujikawa Akitaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Effect of VCP modulators on gene expression profiles of retinal ganglion cells in an acute injury mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61160-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miho Tagawa, Hanako Ohashi Ikeda, Yumi Inoue, Sachiko Iwai, Yuto Iida, Masayuki Hata, Isao Asaka, Akitaka Tsujikawa	4. 巻 205
2. 論文標題 Deterioration of phagocytosis in induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells established from patients with retinitis pigmentosa carrying Mer tyrosine kinase mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 108503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2021.108503. Epub 2021 Feb 17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	井上 由美  (Inoue Yumi)  (70867481)	京都大学・医学研究科・特定研究員   (14301)	
連携研究者	池田 華子  (Ikeda Hanako)  (20372162)	京都大学・医学研究科・准教授   (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------