

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09977

研究課題名(和文) レポーターノックイン疾患iPS細胞を用いた網膜色素変性の薬剤スクリーニング

研究課題名(英文) Drug screening for Retinitis pigmentosa by using reporter knock-in human iPSCs

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは先行研究で、網膜視細胞の変性をきたす網膜色素変性症患者由来iPS細胞を作製し、網膜視細胞を特異的に標識できるノックインiPS細胞のラインを樹立した。本研究では、1)各原因遺伝子が引き起こす網膜視細胞死に関連するシグナル遺伝子発現を調べた。2)ミトコンドリア病MELASの疾患iPS細胞を用いることで疾患に関連する代謝物の影響を調べ、酸化ストレスが関与していることを明らかにし、タウリンがこれらのシグナルを緩和することを明らかにした。3)MELASの疾患iPS細胞の2-デオキシグルコースに対する脆弱性を指標とした薬剤スクリーニングを行い、候補となる化合物をスクリーニングできる系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性症は、緑内障、糖尿病網膜症に次いで日本国内第3位の主要な失明原因となっている(厚生労働省資料)。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。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、未だその遺伝子変異による遺伝子発現や、それに伴うエネルギー代謝変化による視細胞死のメカニズムについて、詳細は明らかではなく、これらを防ぐ治療法は現在存在しない。本研究では、ノックインiPS細胞を利用して、網膜変性の疾患メカニズムを詳細に解析し、それぞれの疾患に対応したいくつかの新規治療方法を提案することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined (1) signal gene expression associated with retinal photoreceptor cell death caused by each causative gene. (2) By using disease iPSCs from the mitochondrial disease MELAS patient, we examined the effects of metabolites involved in the disease and found that oxidative stress is involved, and that taurine alleviates these signals. (3) We conducted drug screening using the vulnerability of MELAS diseased iPSCs to 2-deoxyglucose and established a system that can screen candidate compounds.

研究分野：神経科学

キーワード：ヒトiPS細胞 網膜色素変性 網膜視細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでの先行研究で、網膜視細胞の変性をきたす網膜色素変性症患者由来 iPS 細胞を作製した。また、近年開発されたゲノム編集技術により、網膜視細胞を特異的に標識できるノックイン iPS 細胞のラインを樹立した。そこで本研究では、これらの蛍光タンパク質標識された分化視細胞を用いて、網膜色素変性患者由来視細胞と正常視細胞を比較することにより、各原因遺伝子が引き起こす (1) 細胞死関連シグナル遺伝子発現や、(2) 代謝物の産生に与える影響を調べ、(3) 蛍光タンパク質標識を指標とした薬剤スクリーニングを行う。

2. 研究の目的

網膜色素変性症は、緑内障、糖尿病網膜症に次いで日本国内第 3 位の主要な失明原因となっている (厚生労働省資料)。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。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/)、未だその遺伝子変異による遺伝子発現や、それに伴うエネルギー代謝変化による視細胞死のメカニズムについて、詳細は明らかではなく、これらを防ぐ治療法は現在存在しない。本研究では、網膜色素変性症患者由来 iPS 細胞レポーターノックインラインを用いることで、疾患視細胞と正常視細胞を詳細に比較し、細胞死のメカニズムを解析、さらには細胞死を防ぐための薬剤をスクリーニングすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、これまでに作製された網膜色素変性症患者由来 iPS 細胞とそのノックインラインを用いて、視細胞を選択的に標識することで、患者由来 iPS 細胞から分化した視細胞同士、正常 iPS 細胞から分化させた視細胞のデータを比較することで細胞死の抑制を試みる。

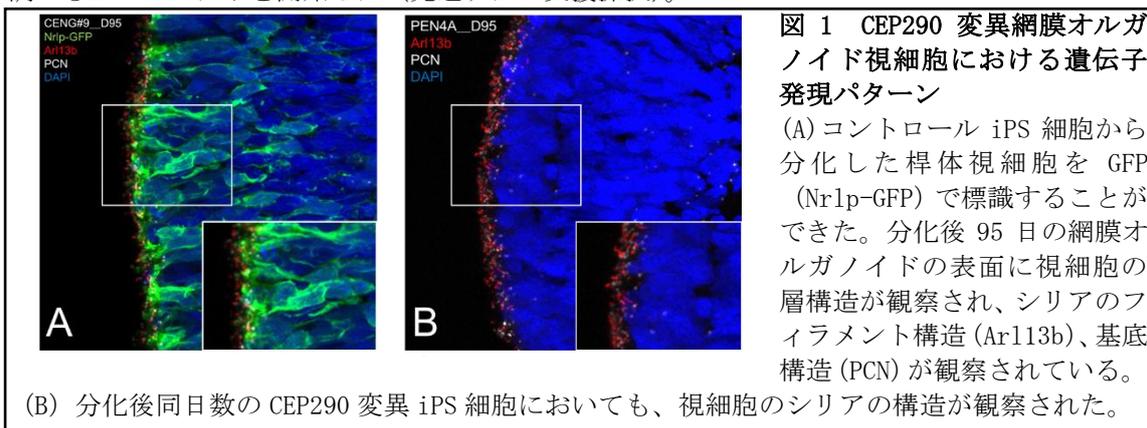
(1) 網膜視細胞の遺伝子発現解析: 本研究の視細胞の蛍光タンパク質標識により、FACS (fluorescence activated cell sorting) 法を適用し、視細胞の純化をする。解析は、Realtime PCR で行うほか、申請者が以前所属していた、Swaroop ラボ (米国 NIH) との共同研究で、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析をすることができる。

(2) 網膜視細胞の代謝物解析: (1) と同様に、視細胞を純化した後、質量分析システムを使った代謝解析を行なう。慶應義塾大学では、本大学医化学教室 (末松誠客員教授) の協力・アドバイスの下、質量分析装置 LCMS-8030PLUS (Shimadzu) が共通機器として導入されており、主要エネルギー代謝経路の代謝物変動解析を行うことができる。

(3) 網膜色素変性の細胞死抑制の薬剤スクリーニング: 本研究ではノックイン iPS 細胞を用いることによって、生細胞を蛍光標識で確認できる (Kaewkhaw R et al., IOVS. 2016)。そこで、(1)、(2) で得られた知見を元に、特定のシグナルを活性/抑制することで細胞死を抑えることと同時に、既存薬ライブラリーを用いたノンターゲットのスクリーニングについても検討する。

4. 研究成果

(1) 網膜視細胞の遺伝子発現解析: 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ができる。これまでに、Rhodopsin, RP1, RP9, PRPF31, mtDNA (A3243G), CEP290 のそれぞれに遺伝子変異のある疾患 iPS 細胞からレポーターノックイン iPS 細胞ラインを樹立することができた。特に、米国 NIH の Swaroop 博士との共同研究で得られた CEP290 変異を持つ iPS 細胞 (PEN2, PEN4) から、網膜オルガノイドを誘導するとスプライシング異常が起こっており、株式会社エディットフォースとの共同研究で、スプライシングを制御するタンパク質である PPR を用いた治療方法を開発している (図 1、未発表)。また、この計画が派生して、中心視野を担う黄斑分化の作用機序を調べるプロジェクトを開始した (先進ゲノム支援採択)。



(2) 網膜変性疾患細胞の代謝物解析：いくつかの疾患 iPS 細胞を用いて、質量分析システムを使った代謝解析を行った。慶應義塾大学医化学教室（末松誠客員教授）の協力・アドバイスのもと、特に、ミトコンドリア DNA 変異 (A3243G) のあるミトコンドリア病疾患 iPS 細胞 (MELAS-iPS 細胞) および分化した網膜色素上皮細胞において、酸化ストレスが活性化されており、硫化アミノ酸の一種であるタウリンを添加することによりストレスが一部解消され表現型が改善されることを示すことができた (図 2, Homma K et al., Redox Biol. 2021)。

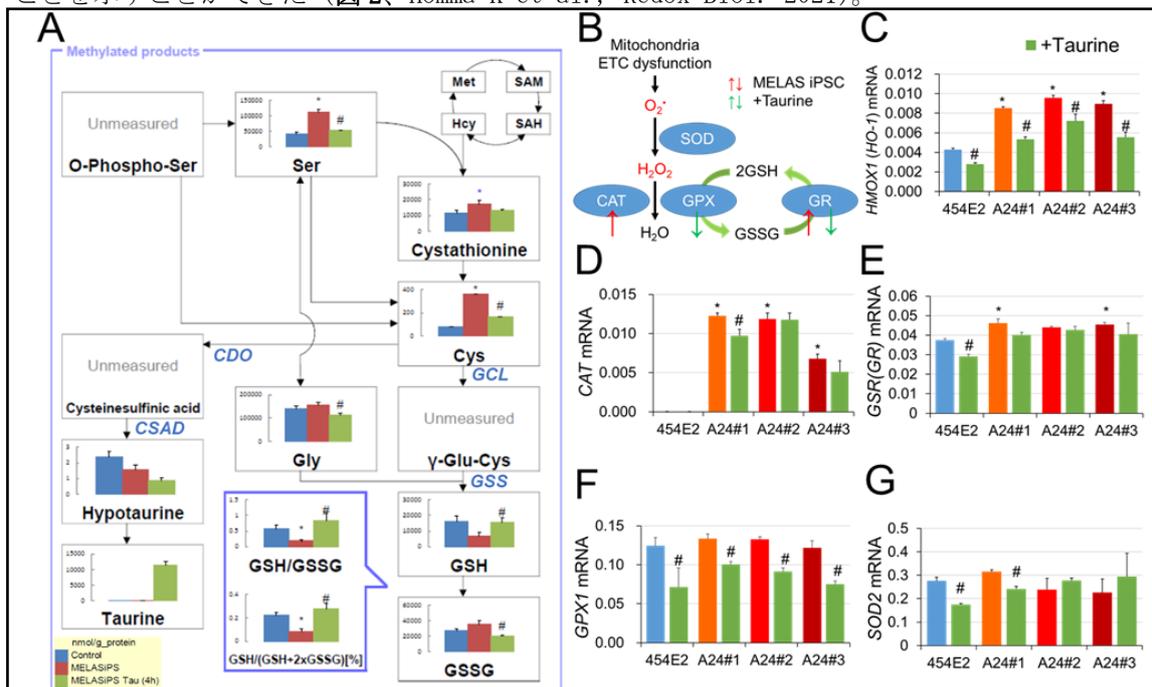


図 2 ミトコンドリア病 (MELAS) 細胞における酸化ストレスの活性化をタウリンが緩和する

(A) ミトコンドリア病 (MELAS) iPS 細胞の網羅的代謝物解析を行ったところ、MELAS 細胞 (赤バー) では、還元型グルタチオン (GSH) が低下し、酸化型グルタチオン (GSSG) が上昇していることが分かった。(B) このことから酸化ストレスの関与が考えられ、各種遺伝子発現を調べると、(C) 酸化ストレスマーカー (HMOX1) の遺伝子発現が MELAS 細胞で上昇、(D) 過酸化水素代謝酵素 (CAT) が MELAS 細胞で上昇していることが分かった。(E) グルタチオン還元酵素 (GSR) は、微増していた。(F) グルタチオン代謝酵素 (GPX)、スーパーオキシド代謝酵素 (SOD2) は変化しなかった。MELAS 疾患を緩和することが期待されているタウリンの作用メカニズムを調べるために、タウリンをこれらの細胞に添加すると、これらのマーカーの一部は、タウリンによって低下することが分かった。

(3) 網膜色素変性の細胞死抑制の薬剤スクリーニング：本研究では特にミトコンドリア機能に障害のある MELAS-iPS 細胞において、生細胞を蛍光標識で確認し、グルコース取り込みを阻害することでストレスをかけた時の生存率を調べたところ、MELAS 細胞では、有意に細胞死が引き起こされることが分かった。そこで、株式会社 JSR との共同研究を行い、既存薬ライブラリーを用いたノンターゲットのスクリーニングを行ったところ、いくつかの効果的な薬剤を同定することができた。現在、これらの救済メカニズムについて解析中である (図 3, 未発表)。

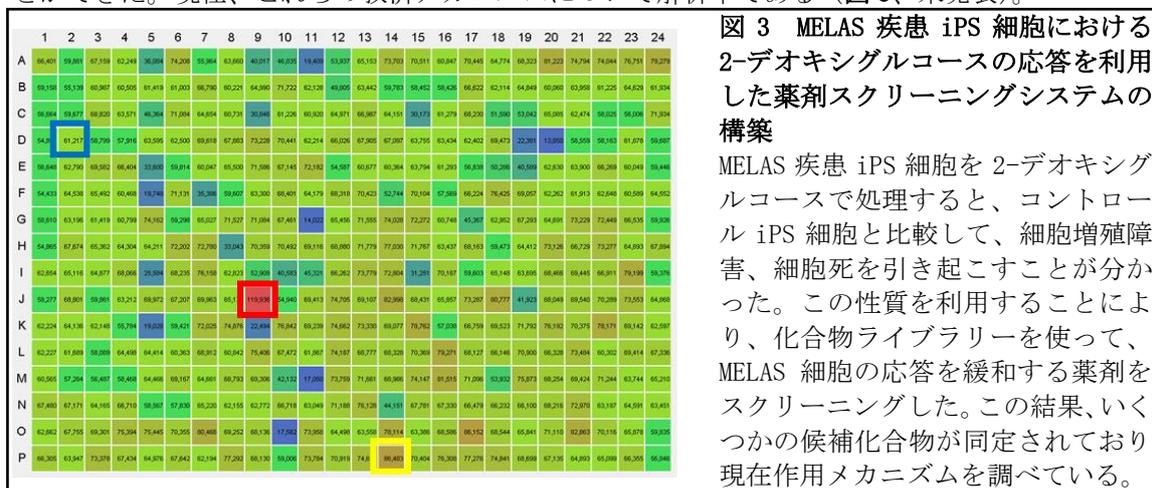


図 3 MELAS 疾患 iPS 細胞における 2-デオキシグルコースの応答を利用した薬剤スクリーニングシステムの構築

MELAS 疾患 iPS 細胞を 2-デオキシグルコースで処理すると、コントロール iPS 細胞と比較して、細胞増殖障害、細胞死を引き起こすことが分かった。この性質を利用することにより、化合物ライブラリーを使って、MELAS 細胞の応答を緩和する薬剤をスクリーニングした。この結果、いくつかの候補化合物が同定されており、現在作用メカニズムを調べている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kohei Homma, Eriko Toda, Hideto Osada, Norihiro Nagai, Takumi Era, Kazuo Tsubota, Hideyuki Okano, Yoko Ozawa	4. 巻 Feb 28;41:101921.
2. 論文標題 Taurine rescues mitochondria-related metabolic impairments in the patient-derived induced pluripotent stem cells and epithelial-mesenchymal transition in the retinal pigment epithelium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.redox.2021.101921	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kohei Homma; Toshio Narimatsu; Kazuo Tsubota; Hideyuki Okano; Yoko Ozawa.
2. 発表標題 Analysis of retinal disease mechanism by using MELAS patient-derived induced pluripotent stem cell lines
3. 学会等名 ARVO Annual Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本間 耕平、坪田一男、岡野栄之、小澤 洋子
2. 発表標題 ミトコンドリア脳筋症疾患iPS細胞由来網膜色素上皮細胞の遺伝子発現解析
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kohei Homma, Toshio Narimatsu, Kazuo Tsubota, Hideyuki Okano, Yoko Ozawa.
2. 発表標題 Analysis of degeneration mechanism in retinal pigment epithelium-derived from human induced pluripotent stem cells with mitochondria DNA mutation.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本間 耕平、坪田一男、岡野栄之、小澤 洋子
2. 発表標題 ミトコンドリア病疾患iPS細胞由来網膜色素上皮細胞の変性メカニズム解析
3. 学会等名 第23回 視覚科学フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本間 耕平
2. 発表標題 ミトコンドリア病疾患iPS細胞由来網膜色素上皮細胞を用いた網膜変性メカニズム解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本間 耕平
2. 発表標題 Analysis of energy metabolism in retinal pigment epithelium of age-related macular degeneration models.
3. 学会等名 反分野的生物医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本間 耕平
2. 発表標題 ミトコンドリア機能不全モデルにおける網膜色素上皮細胞の機能解析
3. 学会等名 ミトコンドリアシンポジウム
4. 発表年 2019年

〔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
研究 分担 者	小澤 洋子 (OZAWA Yoko) (90265885)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任准教授 (32612)	

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
---------	---------