

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18829

研究課題名(和文)常染色体優性視神経症患者由来iPS細胞を用いた病態解析

研究課題名(英文)Pathological analysis using iPSCs derived from autosomal dominant optic neuropathy patients

研究代表者

小林 航(Kobayashi, Wataru)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20646442

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)：常染色体優性視神経萎縮症患者(ADOA)でOPA1遺伝子変異を認める患者の皮膚からiPS細胞を樹立した。このiPS細胞から既報に軽微な修正を加えた分化誘導方法で人工的3次元立体網膜組織へ分化誘導した。分化誘導40日目の立体網膜組織において網膜神経節細胞マーカーで(Pou4f2)で免疫染色を施行するとADOA群及び正常人群中Pou4F2陽性細胞数に有意差は認めず、網膜神経節細胞の発生に明らかな差を認めなかった。単離した網膜神経節細胞の神経突起中のミトコンドリアはADOA群で有意に減少していた。神経萎縮にはミトコンドリア機能異常が影響している可能性が高い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Optic atrophy 1 (OPA1) 遺伝子変異による遺伝性視神経症である常染色体優性視神経萎縮症 (autosomal dominant optic atrophy: ADOA) は幼少期より視機能障害が生じる治療困難な疾患である。視神経は組織採取して研究を行うことが困難な臓器の一つであるが、ヒトiPS細胞を使用することにより患者の視神経を採取することなく研究することが可能になった。さらにOPA1遺伝子変異がもたらすミトコンドリア機能障害が視神経萎縮と関連している可能性が高いことから、同様に視神経障害を来す緑内障においてもミトコンドリア機能障害が関連している可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：We established iPSCs from the skin of a patient with autosomal dominant optic atrophy (ADOA) who had an OPA1 mutation. The iPSCs were induced to differentiate into artificial three-dimensional retinal organoids using a differentiation induction method with minor modifications to a previous report. Immunostaining for Pou4f2, a retinal ganglion cell marker, was performed in the 3D retinal organoids on the 40th day of differentiation, and there was no significant difference in the number of Pou4F2-positive cells between the ADOA group and the normal group. The number of mitochondria in the neurites of isolated retinal ganglion cells was significantly decreased in the ADOA group. It is likely that abnormal mitochondrial function is responsible for neural atrophy.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：眼科

キーワード：ヒトiPS細胞 網膜神経節細胞 視神経萎縮

## 1. 研究開始当初の背景

常染色体優性視神経萎縮症 (autosomal dominant optic atrophy: ADOA) は、網膜神経節細胞の神経突起が束になった視神経が何らかの原因で障害される疾患であり、遺伝性視神経症の中で最も頻度が高く、日本では約 10000 人から 50000 人に 1 人の割合で患者が存在する。本疾患の特徴として若年期に発症し、有効な治療法がないことから病態解明及び治療薬開発は急務である。また、ADOA の原因遺伝子として、OPA1 遺伝子の変異が報告されており (Kjer et al. Acta Ophthalmol Scand. 1996)、当施設を含めてこれまで多数の遺伝子変異が報告されている (Pesch et al. Hum Mol Genet. 2001、Inoue et al. Acta Ophthalmologica. 2016)。臨床症状としては、急速に進行する視力低下、中心視野異常及び青黄色覚異常を自覚することが多く (Cohn et al. BJO. 2008)、光干渉断層計 (Optical coherence tomography: OCT) 検査では網膜内層の網膜神経線維層の著明な菲薄化を認めるのに対して、網膜外層の厚さは正常であることから網膜神経節細胞にその原因があるという仮説が考えられる。OPA1 遺伝子変異が網膜神経節細胞及びその軸索である視神経にどのような影響を与えるかを解明することで新規治療へつなげる可能性が高い。

OPA1 は、ミトコンドリア膜間隙に局在するダイナミン様 GTPase で、ミトコンドリアの内膜融合反応、アポトーシス調節及び内膜クリステ構造形成に関与していることが報告されている (Ban et al. Nat Cell Biol. 2017)。OPA1 遺伝子変異を持つ ADOA 患者では、ミトコンドリアの構造変化に伴う機能障害により網膜神経節細胞障害が引き起こされている可能性が示唆される。しかしながら、患者から網膜神経節細胞を採取することは大きな侵襲を伴い倫理的に困難であり、ヒト生体組織を用いた病態解析は進んでいない。

そこで、このような組織及び細胞へのアクセスが困難なヒト臓器の研究を行う手段の一つに iPS 細胞を用いた研究手法が考えられる。患者由来の iPS 細胞を作製する技術は、疾患特異的 iPS 細胞技術として躍進が目覚ましく、ADOA のような遺伝子疾患の *in vitro* での病態解析に最適であると考えられている。さらに、申請者のヒト iPS 細胞由来網膜神経節細胞を精製する技術を応用することで、これまで明らかにされなかった ADOA 患者の網膜神経節細胞障害の分子メカニズム解明が期待される。

## 2. 研究の目的

これまで研究困難であった ADOA 患者の網膜神経節細胞を iPS 細胞から作製し、*in vitro* で神経の発生や発達について解析を行い、OPA1 遺伝子変異によるミトコンドリア障害が網膜神経節細胞にもたらす影響を追及し、ADOA の病態を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ADOA 患者由来疾患 iPS 細胞の作製

東北大学病院に通院中で遺伝子検査により OPA1 遺伝子異常を認めた患者の皮膚を採取し、線維芽細胞を培養する。この線維芽細胞にセンダイウイルスベクターを用いて山中因子を遺伝子導入し iPS 細胞を作製する。作製した iPS 細胞に対して、同様の OPA1 遺伝子変異が存在することを DNA シークエンス法で確認する。また、iPS 細胞であることを確認するために多能性幹細胞マーカーである抗 Oct3/4 抗体で免疫染色を施行する。

### (2) ADOA 患者由来 iPS 細胞から人工的 3 次元立体網膜組織への分化

作製した iPS 細胞から既報の方法に基づいて人工的 3 次元立体網膜組織へ分化誘導する (Kobayashi et al. IOVS. 2018)。分化誘導した ADOA 患者由来立体網膜組織から凍結切片を作製し、網膜神経節細胞マーカーである抗 Pou4F2 抗体で免疫染色を施行し、正常人由来立体網膜組織中の網膜神経節細胞数と比較検討する。また、この ADOA 患者由来立体網膜組織と正常人由来立体網膜組織から神経培養を行い、神経突起の状態を比較検討する。さらに神経突起を mitotracker で染色し、ミトコンドリアの状態を評価する。同様に JC-1 MitoMP Detection Kit を用いてミトコンドリア膜電位を評価する。

### (3) iPS 細胞由来立体網膜組織から網膜神経節細胞の単離培養

作製した ADOA 患者由来立体網膜組織と正常人由来立体網膜組織から auto MACS pro® を用いて CD90 microbeads で網膜神経節細胞を単離し維持培養を施行する。維持培養による網膜神経節細胞の生存、神経突起伸長に関して比較検討を施行する。単離した網膜神経節細胞に対しても同様に JC-1 MitoMP Detection Kit を用いてミトコンドリア膜電位を評価する。

### (4) グルタミン酸障害、酸化ストレス、オートファジー及びミトファジーの評価

緑内障では網膜神経節細胞死にグルタミン酸障害や酸化ストレスが関連していると考えられており、作製した立体網膜組織でその障害モデルの検討を行う。また、ミトコンドリアが障害を受

けると細胞はオートファジーの機構を利用して、機能不全に陥ったミトコンドリアを処理する  
と考えられている。ADOA 患者由来立体網膜組織と正常人由来立体網膜組織から単離した網膜神  
経節細胞からタンパク抽出を行い、オートファジーに関連するタンパク発現を比較検討する。

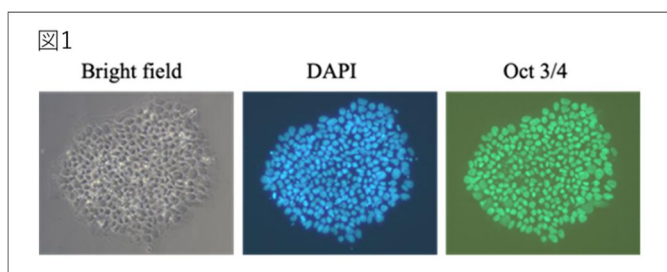
#### (5) ゲノム編集での OPA1 遺伝子変異修復

OPA1 遺伝子変異部位を正常配列に置き換えるため CRISPR/Cas9 の技術を利用し、ガイド RNA の  
効率を T7E1 assay で確認する。切断効率の良いガイド RNA を Cas9 ベクターに組み込む。遺伝  
子変異部位の前後約 1kbp の配列及び修復した配列をノックインベクターに組み込み、ガイド RNA  
を組み込んだベクターと共に iPS 細胞に遺伝子導入する。コロニーピックを行い、DNA シークエ  
ンスで変異部位が正しい配列に置換されたコロニーを拡大培養し、同様に立体網膜組織に分化  
誘導する。立体網膜組織及び単離した網膜神経節細胞を用いて比較検討を行う。

### 4. 研究成果

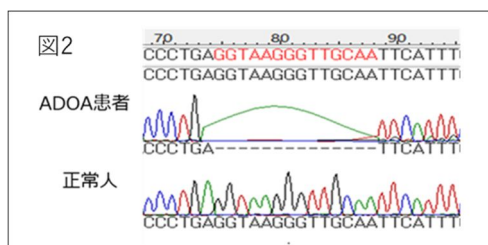
#### (1) ADOA 患者由来 iPS 細胞の作製

OPA1 遺伝子変異を有する ADOA 患者の皮膚からセンダイウイルスベクターを用いて iPS 細胞を作  
製した。作製した細胞が多能性を有することを抗 Oct3/4 抗体による免疫染色で確認した。この  
iPS 細胞から DNA 抽出を施行し変異配列を DNA シークエンスで確認し、採血検体から施行した遺  
伝子検査と同様の変異があることを確認した。



(図1) 作製した iPS 細胞の免疫染色

DAPI 陽性細胞の全てで抗 Oct3/4 陽性  
の細胞を認める。

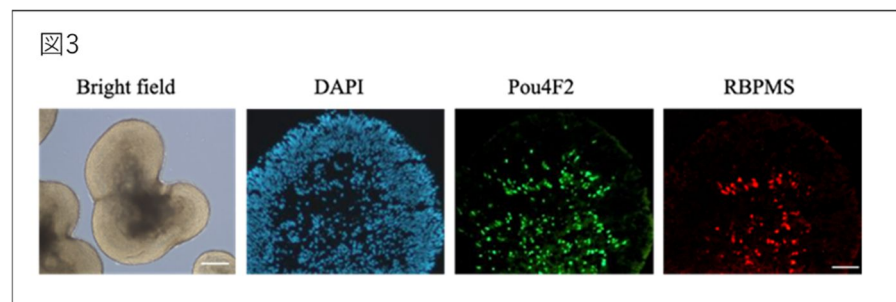


(図2) iPS 細胞における遺伝子変異の確認

作製した iPS 細胞から DNA 抽出を行い変異部位の前  
後で PCR を施行し、精製した DNA からシークエンス  
解析を施行した。採血検体と同様の変異を認めた。

#### (2) ADOA 患者由来 iPS 細胞から 3 次元立体網膜組織への分化誘導

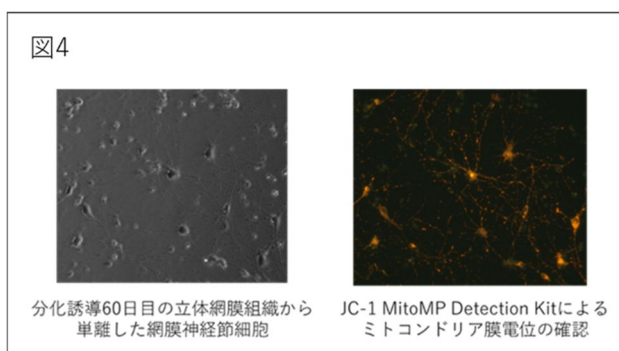
作製した iPS 細胞から既報に基づき立体網膜組織を作製した。分化誘導 40 日目のサンプルから  
凍結切片を作製し、網膜神経節細胞マーカーである抗 Pou4F2 抗体、抗 RBPMS 抗体および DAPI 染  
色でその発現を確認した。正常人由来立体網膜組織中の網膜神経節細胞数と比較検討したとこ  
ろ有意差を認めなかった。OPA1 遺伝子変異は発生の段階で網膜神経節細胞数に影響を与えない  
可能性が示唆された。



(図3) ADOA 患者由来 iPS 細胞から分化誘導した立体網膜組織の免疫染色  
網膜の内層部分に Pou4F2 陽性及び RBPMS 陽性細胞を認めた。

### (3) 立体網膜組織からの網膜神経節細胞の単離

作製した立体網膜組織を維持培地で 60 日まで維持培養した。Auto MACS pro®を用いて CD90 microbeads で立体網膜組織から網膜神経節細胞を単離した。既報で使用した培地を用いて維持培養した。単離 2 週間後に JC-1 MitoMP Detection Kit を用いてミトコンドリア膜電位を染色した。同様に正常人由来立体網膜組織から単離した網膜神経節細胞と比較検討したところ、神経突起中のミトコンドリアが有意に減少していた。

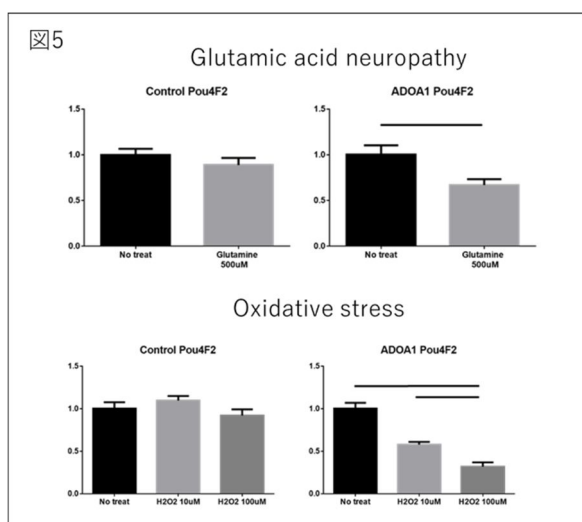


(図 4) 神経突起伸長とミトコンドリア膜電位の確認

単離した網膜神経節細胞から神経突起伸長を認める。また、JC-1 色素により細胞内及び神経突起内にミトコンドリアが確認される。

### (4) グルタミン酸障害、酸化ストレス、オートファジー及びミトファジーの評価

ADOA 患者及び正常人由来立体網膜組織に対してグルタミン酸障害 (glutamic acid : 500uM) 及び酸化ストレス障害 (hydrogen peroxide : 100uM) を添加したところ、ADOA1 群では Rt-qPCR 法で Pou4f2 の発現が有意に減少していた。Alamar blue assay でグルタミン酸障害後の細胞生存率を比較検討したところ、こちらも ADOA1 患者由来立体網膜組織で有意に生存率が低下していた。ミトコンドリア障害によるオートファジー機構を評価するため ADOA 患者及び正常人由来立体網膜組織から RIPA buffer を用いてタンパク抽出を施行した。オートファジー関連マーカーである抗 LC3 抗体及びオートファジーによるミトコンドリア分解に関連する抗 PINK1 抗体を用いて Western blotting を施行した。比較検討したところ ADOA 由来立体網膜組織では有意に LC3 及び PINK1 の発現が亢進していた。



(図 5) グルタミン酸障害及び酸化ストレスによる網膜神経節細胞の変化

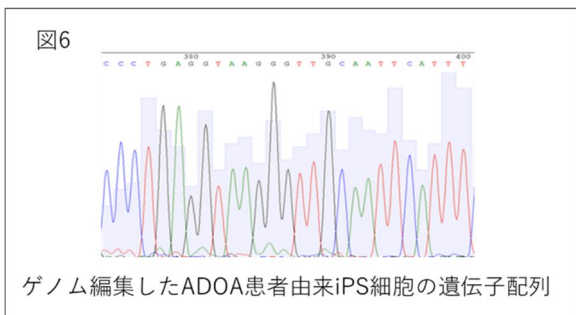
立体網膜組織にグルタミン酸を 500uM 添加し、6 時間後に回収した。サンプルから RNA 抽出を行い、cDNA を作製した後 RT-qPCR 法で Pou4F2 の発現を調べた。ADOA 群で有意に発現が減少していた。

同様に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 10uM、100uM 添加し、6 時間後に回収したサンプルにおいても ADOA 群で有意に発現が低下していた。

### (5) ゲノム編集での OPA1 変異修復

OPA1 遺伝子変異の上流及び下流 1kbp 内でガイド RNA の結合に必要な PAM 配列を 4 つ選択し、pSpCas9 ベクターのマルチクロニングサイトに PAM 配列の上流 20 塩基の配列を組み込んだ。T7E1 assay を施行し、切断効率および PAM 配列の位置から最も切断効率が良いと判断した PAM 配列を同定した。ADOA 患者由来 iPS 細胞から OPA1 遺伝子変異部位の上流クローニングし、変異部分を修復した配列を C 末に付けた。同様に下流約 1kbp をクローニングした配列とともにノックインベクターに形質転換を施行した。このノックインベクター及びガイド RNA ベクターを Lipofectamine® 2000 試薬を用いて ADOA 患者由来 iPS 細胞に遺伝子導入を施行した。遺伝子導入後の iPS 細胞のコロニーをピックアップし、DNA 抽出を施行した後に変異部位を含むような前後プライマーで PCR を施行した。PCR 産物を精製し、forward プライマーを使用して DNA シークエンスを施行した。変異部位が修復された iPS 細胞コロニーを拡大培養し、凍結ストックを作製

した。



(図6)ゲノム編集した iPS 細胞の DNA シー  
クエンス

採血検体及び iPS 細胞から抽出した DNA で認  
めていた遺伝子欠失がゲノム編集によって修  
復されていた。

現在このゲノム編集で OPA1 遺伝子変異を修復した iPS 細胞から立体網膜組織へ分化誘導を施行している。OPA1 遺伝子変異によりミトコンドリア機能障害が生じ、神経突起内のミトコンドリアの減少、オートファジー及びミトファジーの亢進が生じていることが同定された。ゲノム編集で遺伝子変異を修復することによりこの状況が改善されれば、遺伝子治療の有効性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林 航
2. 発表標題 iPS細胞由来の立体網膜組織を用いた緑内障関連神経障害
3. 学会等名 第124回日本眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 航
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来の網膜神経節細胞の解析
3. 学会等名 第31回日本緑内障学会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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