

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18878

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いたレーバー先天黒内障の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathophysiology of Leber's congenital amaurosis using genome editing technology

研究代表者

細川 海音 (Hosokawa, Mio)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：00711053

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)：レーバー先天黒内障16型(LCA-16)は網膜色素上皮細胞(RPE)に発現しているKCNJ13遺伝子異常に起因する網膜ジストロフィであり、その疾患メカニズムは不明な部分が多い。本研究ではゲノム編集技術を用いてKCNJ13遺伝子をノックアウトしたLCA-16モデルRPEを作製した。得られたモデル細胞について位相差顕微鏡および免疫染色を用いた細胞形態評価、電子顕微鏡での貪食能の評価を行った。LCA-16モデルRPEでは一部の細胞に配列異常を生じており、細胞死を起こしている細胞が有意に多く、貪食能が低下していた。RPEの細胞配列の異常や機能低下がLCA-16の病態に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レーバー先天黒内障16型(LCA-16)は重篤な視力障害を来す眼疾患である網膜ジストロフィの一種であるが、その疾患メカニズムは不明な点が多く、現在有効な治療法はない。本研究ではLCA-16モデルの網膜色素上皮細胞(RPE)を作成し、細胞形態や貪食能などの評価を行った結果、RPEの細胞配列の異常や機能低下がLCA-16の病態に関与している可能性が示唆された。LCAの病態が明らかになることは、治療法のない疾患であるLCA-16治療法開発の基盤となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Leber's congenital amaurosis type 16 (LCA-16) is a retinal dystrophy caused by an abnormality in the KCNJ13 gene expressed in retinal pigment epithelial cells (RPE), and its disease mechanism is largely unknown. In this study, we created an LCA-16 model RPE in which the KCNJ13 gene was knocked out using genome editing technology. The obtained model cells were evaluated for cell morphology using a phase-contrast microscope and immunostaining, observed with a transmission electron microscope and a scanning electron microscope, and their phagocytic ability was evaluated. In the LCA-16 model RPE, some cells had misalignment, significantly more cells were killed, and phagocytosis was reduced.

It was suggested that abnormalities in the cell sequence of RPE and decreased function may be involved in the pathophysiology of LCA-16.

研究分野：網膜

キーワード：レーバー先天黒内障 KCN13遺伝子 ゲノム編集 アポトーシス ネクローシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜ジストロフィは重篤な視力障害を来す眼疾患であり、現在有効な治療法はない。その一型であるレーバー先天黒内障 16 型(Leber's congenital amaurosis type16 以下 LCA-16)ではイオンチャネル Kir7.1 をコードする *KCNJ13* 遺伝子に異常があり、*KCNJ13* 遺伝子は眼の網膜色素上皮(以下 RPE)細胞に多く発現していることが知られている。しかし *KCNJ13* 遺伝子が RPE や網膜を含む眼球全体に及ぼす影響には不明な点が多い。

2. 研究の目的

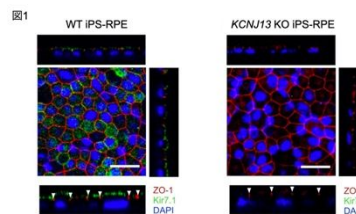
本研究ではゲノム編集技術を用いて *KCNJ13* 遺伝子ノックアウト iPS-RPE 細胞、*KCNJ13* 遺伝子ノックアウトマウスを作製し、細胞レベル、そして眼球全体の組織レベルでの解析を行い、LCA の病態を明らかにし、治療法開発の基盤となる研究を行う。

3. 研究の方法

(1)CRISPR-Cas9 システムを用いて正常ヒト人工多能性幹細胞(以下 iPS 細胞)に遺伝子編集を行い、*KCNJ13* 遺伝子欠損 iPS 細胞を作製し、RPE(*KCNJ13* KO iPS-RPE)へと分化させた。得られた正常および *KCNJ13* KO iPS-RPE について下記の検討を行った。(2)位相差顕微鏡および免疫染色を用いて形態の評価を行った。(3)貪食能を評価するために、ブタの網膜より採取・精製した視細胞外節を FITC 蛍光色素で標識(FITC-POS)し、RPE に添加し、RPE を Ezrin と DAPI で共染色し、多焦点顕微鏡にて FITC-POS の細胞内への取り込みを観察した。(4)細胞のより詳細な形態学的評価のために透過型電子顕微鏡(TEM)を用いた形状解析を行った。(5)*KCNJ13* KO iPS-RPE の病態にアポトーシス・ネクローシスなどの細胞死が関与しているか解析するために、アポトーシスのマーカーである Annexin とネクローシスのマーカーである Ethidium Homodimer III で共染色し、1 視野あたりの染色陽性細胞数を計測した。(6)走査型電子顕微鏡(SEM)で細胞表面の形状観察を行った。

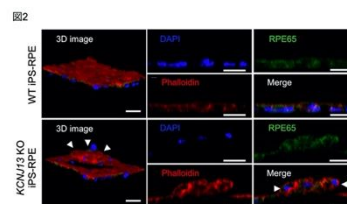
4. 研究成果

(1)*KCNJ13* 遺伝子特異的に作用する gRNA を作成した。CRISPR-Cas9 システムを用いて、正常 iPS 細胞の *KCNJ13* 遺伝子をノックアウトし、LCA-16 細胞モデル(*KCNJ13* KO iPS-RPE)の作製に成功した。作製した *KCNJ13* KO iPS-RPE は Kir7.1 タンパクの発現を認めなかった。(図 1)



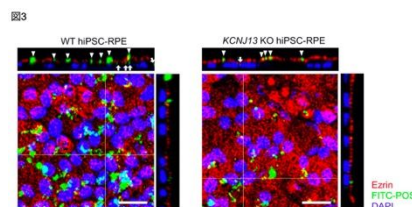
正常iPS-RPEではZO-1(白矢頭)の頂端側に発現しているKir7.1は *KCNJ13* KO iPS-RPEでは欠損している。

(2)位相差顕微鏡及び免疫染色を行い、細胞を観察すると、正常 iPS-RPE は均一な単層配列を示すのに対し、*KCNJ13* KO iPS-RPE は単層配列を示す部分と、一部で表面が突出した形態を示した。LCA-16 の患者では OCT にて RPE の部分に高輝度の瘤状沈着物を認めることが報告されており、RPE の部分的突出所見は患者の表現型を再現した変化である可能性があると考えられた(図 2)。突出部分は RPE のマーカーである E-cadherin のシグナルが消失し、間葉系マーカーである fibronectin が発現する部位を認めた。*KCNJ13* KO iPS-RPE で観察される細胞突出は上皮間葉転換が原因の一つである可能性が示唆された。



*KCNJ13*遺伝子ノックアウトRPEでは突出した形態を示す部位を認めた。(白矢頭)

(3)また、*KCNJ13* KO iPS-RPE の貪食能は正常 iPS-RPE と比較して低下していることがわかった(図 3)LCA-16 では生下時より重篤な視機能障害を呈するが、その原因の一つに RPE による貪食能の低下が関与している可能性が示唆された。



*KCNJ13*遺伝子ノックアウトRPEではFITC-POSの取り込みが有意に低下していた。

(4) TEMでの *KCNJ13* KO iPS-RPE の観察において、位相差顕微鏡と同様に、単層に配列した RPE の上に突出した細胞塊を認めた。また、単層に配列した RPE の下に異常構造を呈する細胞を認めた(図 4)。

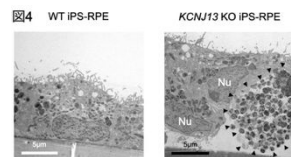


図4 WT iPS-RPE KCN13 KO iPS-RPE
*KCNJ13*遺伝子ノックアウトRPEでは細胞の下に異常構造を呈する細胞を認めた(黒矢頭)。

(5) *KCNJ13* KO iPS-RPE は正常 iPS-RPE と比較し、Annexin 染色のみ陽性の細胞数では差を認めなかったが、Ethidium Homodimer III 染色陽性細胞数が有意に多く、そのほとんどは突出部に存在していた。LCA-16 の病態にネクローシスが関与している可能性が示唆された(図 5)。

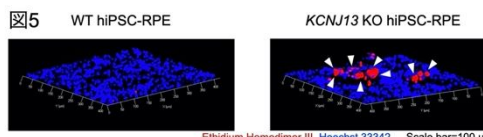


図5 WT hiPSC-RPE KCN13 KO hiPSC-RPE
 Ethidium Homodimer III, Hoechst 33342 Scale bar=100 μm
*KCNJ13*遺伝子ノックアウトRPEでは突出部にEthidium Homodimer III 陽性細胞を認め、ネクローシスを起こしている細胞が存在する。

(6) 免疫染色を行った細胞での 3 次元解析で明らかになった、一部の RPE がシート状に配列した RPE から隆起した形状を示す所見が SEM においても再現性をもって確認された。また、野生型 iPS-RPE の頂端側には発達した微絨毛を認めたが、*KCNJ13* KO iPS-RPE のうち突出した形態を示す部位には微絨毛の発達が見られない、もしくは未熟である細胞が一部に存在した。また、*KCNJ13* KO iPS-RPE では一部の細胞で細胞間接着に異常を生じている細胞を認めた。

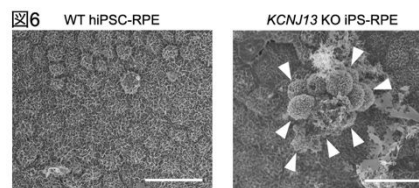


図6 WT hiPSC-RPE KCN13 KO iPS-RPE
*KCNJ13*遺伝子ノックアウトRPEの突出部位の細胞は微絨毛の形態が未発達な細胞が存在する。

本研究により正常ヒト iPS 細胞から遺伝子編集による LCA-16 のモデル細胞の作製に成功した。病態の詳細な機序に関しては不明な部分はあるが、*KCNJ13* 遺伝子欠損によって RPE の機能や形態に異常が生じ、そのことが LCA-16 の病態に関与している可能性が示唆された。今後は今回明らかになった結果から推測される病態メカニズムに対する治療法についての研究を進めたいと考えている。

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 Kanzaki Yuki, Fujita Hirofumi, Sato Keita, Hosokawa Mio, Matsumae Hiroshi, Shiraga Fumio, Morizane Yuki, Ohuchi Hideyo	4. 巻 61
2. 論文標題 KCNJ13 Gene Deletion Impairs Cell Alignment and Phagocytosis in Retinal Pigment Epithelium Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 38 ~ 38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.61.5.38	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuki Kanzaki; Hirofumi Fujita; Keita Sato; Mio Hosokawa; Hiroshi Matsumae; Fumio Shiraga; Yuki Morizane; Hideyo Ohuchi
2. 発表標題 KCNJ13 gene deletion impairs phagocytosis in retinal pigment epithelium derived from human-induced pluripotent stem cells.
3. 学会等名 ARVO Annual Meeting 2020（国際学会）
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
---------	---------