

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06248・19K21343

研究課題名(和文) AAV-CRISPRを用いた代謝リプログラミングによる緑内障モデル動物の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of disease state in glaucoma model animals by metabolic reprogramming using AAV-CRISPR

研究代表者

片山 翔太 (Katayama, Shota)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60825123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障の病態解明研究を個体レベルで遺伝子を対象に行うために、網膜神経節細胞でのみ遺伝子破壊をすることができる新たなゲノム編集システムの開発を行った。本研究では、網膜神経節細胞特異的プロモーターを同定・縮小し、Cas9をドライブした。遺伝子破壊細胞を蛍光標識するために、小型の蛍光タンパク質をノックインするための開発も行った。本システムを搭載したAAVベクターを硝子体注射により、マウス眼内へ注入した。マウス網膜を摘出し解析を行った結果、CATが網膜神経節細胞死に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は中途失明原因第1位の眼疾患である。現在唯一エビデンスのある治療法は眼圧下降治療であるが、日本人の緑内障患者の約7割は眼圧が正常範囲内にある正常眼圧緑内障であり、超高齢社会を迎え失明患者は増加の一途を辿っていることから、眼圧下降以外の有効な治療法の開発が望まれている。本研究では網膜神経節細胞特異的に遺伝子破壊し、遺伝子破壊された細胞が標識される新たな実験系を開発した。本技術を用いることにより、網膜神経節細胞特異的に遺伝子破壊が起こっていることを確認でき、CATが網膜神経節細胞死に関与していることを突き止めた。緑内障患者の前房水中でもCATの代謝物が多くあることから、関与が示唆される。

研究成果の概要(英文)：We developed a new genome editing system that can disrupt genes only in retinal ganglion cells in order to conduct research on glaucoma pathogenesis at the individual level. In this study, we identified and reduced a retinal ganglion cell-specific promoter and driven Cas9. To fluorescently label gene-disrupted cells, we have also developed knock-in of small fluorescent proteins. The AAV vector was injected into the mouse eye by vitreous injection. Analysis of mouse retinas revealed that CAT was involved in retinal ganglion cell death.

研究分野：眼科、ゲノム編集、合成生物学

キーワード：緑内障 網膜神経節細胞死 CRISPR-Cas9 AAV in vivo knock-out fluorescence labeling CAT 代謝

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障(網膜神経節細胞が死ぬ病気)は本邦における中途失明原因第1位の眼疾患です。日本人の緑内障患者の多くは、眼圧が正常範囲内にある正常眼圧緑内障であり、現在治療法がありません。治療法の開発には詳細な病態解明が求められます。

東北大学眼科医局では、緑内障モデルマウスのメタボローム解析からアセチル L-カルニチンの産生が網膜組織において亢進していることを見出しました。加えて、緑内障患者の眼内においてもアセチル L-カルニチンの増加を確認しました(未発表)。アセチル L-カルニチンは神経保護効果がある分子として知られており、その生産に深く関わっているカルニチンアセチルトランスフェラーゼ(CAT)が活発に働いていることが予想されました。

2. 研究の目的

網膜神経節細胞(網膜全体の0.1%しか存在しない)におけるCATの機能を明らかにするためには、網膜神経節細胞特異的に遺伝子をノックアウトできる技術の開発、更にはノックアウトされた細胞が蛍光標識されノックアウトされた細胞のみを解析できる技術の開発が必須でした。

3. 研究の方法

ウイルスベクターに搭載することができるCRISPR-Cas9を用いたノックインシステムを開発することにより、CATがノックアウトされた細胞のみを蛍光標識できる原理を構想しました。CRISPR-Cas9を改変したウイルスベクターの作製、及びマウス眼内への硝子体注射を行いました。

4. 研究成果

本研究では、標的遺伝子のエクソン領域を2カ所で切断し、そこに蛍光タンパク質を挿入することにより、ノックアウトされた細胞のみが蛍光タンパク質で標識される“蛍光標識ノックアウトシステム”を確立することに成功しました(図1、Katayama et al., Life Sci Alliance, 2019)。本システムは網膜神経節細胞特異的なプロモーターでしかドライブされないため、網膜神経節細胞でのみ働きます(図2)。更に、アデノ随伴型ウイルス(AAV)ベクターで本システムを網膜組織へデリバリーするために、すべてのコンポーネントを1つにまとめたAll-in-one vectorとし、その搭載サイズは4.6 kbpまでとしました(図2)。AAVは厳密な搭載サイズの制限があり、4.6 kbpまでであることが知られています。

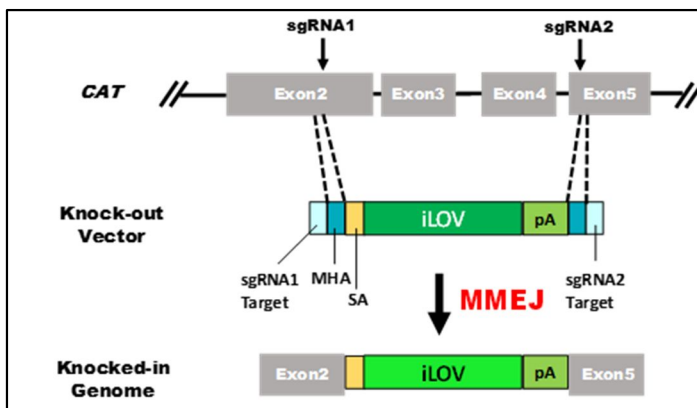


図1. 蛍光標識ノックアウトシステム

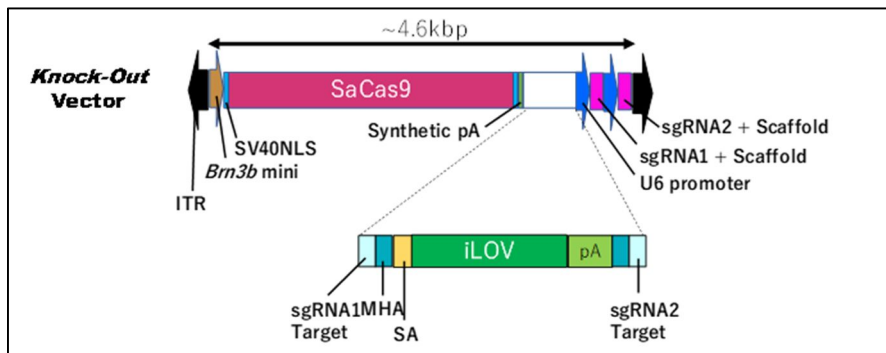


図2. 蛍光標識ノックアウトベクター(AAVベース)

AAV2-蛍光標識ノックアウトベクターを眼内投与することにより、網膜組織へ感染導入しました。CATがノックアウトされた網膜神経節細胞は緑蛍光で標識され、その後細胞死をおこすことが確認されました(図3)。本研究により、正常眼圧下において、CATが網膜神経節細胞の生存に必須であることが初めて見出されました。

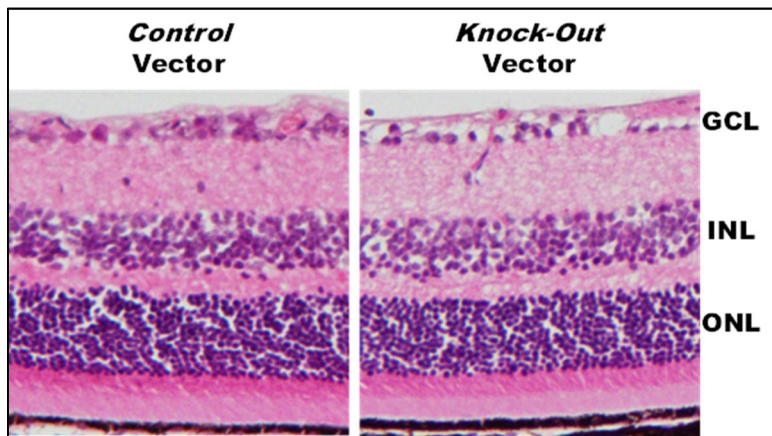


図3 . GCL=網膜神経節細胞層 (GCL が “すかすか” になっていることが確認できる)

緑内障患者の網膜神経節細胞においても CAT の発現が低い可能性があり(未発表データ多数)、CAT 活性化剤が正常眼圧緑内障の予防薬となる可能性があります(未発表データ多数)。

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 Katayama Shota, Sato Kota, Nakazawa Toru	4. 巻 3
2. 論文標題 In vivo and in vitro knockout system labelled using fluorescent protein via microhomology-mediated end joining	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900528
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.26508/lsa.201900528	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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 片山翔太
2. 発表標題 In vitro and in vivo knock-out system labelled by fluorescent protein via microhomology-mediated end joining
3. 学会等名 未来型医療創造卓越大学院プログラムキックオフシンポジウム（招待講演）
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
---------------------------	-----------------------	----