

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22673

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞キメラマウスを用いた緑内障関連遺伝子変異の病態解析

研究課題名(英文) Pathological analysis of chimeric mice using human iPSCs derived from glaucoma patient with gene mutations

研究代表者

中澤 徹 (Nakazawa, Toru)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30361075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から立体網膜組織を作製し、その組織から網膜神経節細胞(iPS-RGC)を単離し培養することが可能になった。しかし、in vitroの研究では眼内の環境を再現出来ないため、ヒトiPS-RGCを小動物の眼内へ移植し生体内で生存に関わる因子の探求することを考えた。その評価のためには立体網膜組織内のRGCを蛍光標識する必要があると考え、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集でGFP標識されたヒトiPS-RGCを作製した。MMEJ法では困難であったが、MHAを長くすることで蛍光標識したiPS細胞を作製出来た。蛍光標識があることで今後イメージングやソーティングを用いた研究が容易になる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞から作製した網膜神経節細胞(iPS-RGC)を培養しているだけでは眼内環境を再現することは出来ないため、小動物の眼内へ移植し緑内障関連視神経障害を与えることによりその反応を調べることを考えた。異種の細胞を使用する際にはその判別が重要になるため、iPS-RGCの蛍光標識を行った。蛍光標識があるためライブイメージングで細胞の状態を確認でき、また細胞を純度高く組織から分離することが可能になる。今後この蛍光標識したiPS-RGCの眼内移植や網羅的遺伝子解析を行うことで、失明原因の第1位である緑内障の原因解明、新規創薬へつなげる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：It is now possible to generate three-dimensional retinal organoids from human iPSCs and to isolate and culture retinal ganglion cells (iPS-RGCs) from the organoids. However, in vitro studies cannot reproduce the intraocular environment, so we decided to transplant human iPS-RGCs into the eyes of rodents to study the factors involved in their survival in vivo. In this study, we generated GFP-labeled human iPS-RGCs by genome editing using CRISPR/Cas9, which was difficult by MMEJ method. The fluorescence labeling will facilitate future studies using imaging and sorting.

研究分野：眼科

キーワード：緑内障 網膜神経節細胞 iPS細胞 ゲノムワイド関連解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

緑内障は、眼圧や環境要因に加えて遺伝的要因が発症に関与する多因子疾患であり、網膜神経節細胞(RGC)死により視野障害が生じる。本邦の中途失明原因の第一位であるが、眼圧下降治療以外に有効な治療がない。従って、眼圧下降治療に対して抵抗性を示す患者群の病態解明は特に重要な課題である。眼圧下降のみに依存した緑内障治療の現状を打破するために、申請者は機序依存的な個別化医療に資する創薬研究を行うことを目的とし、複合的な基礎・臨床研究を行ってきた。基礎研究では、緑内障を模倣した動物モデルを作成し(Nakazawa et al., J Neurosci. 2006)、網羅解析により RGC 死の重要な経路を証明した(Yasuda et al., PLoS One. 2014)。また、最新の遺伝子改変技術を緑内障研究に積極的に導入し、アデノ随伴ウイルスと CRISPR/Cas9 を用いた RGC 特異的なゲノム編集の実験系を確立した(Sato et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018)。加えて、臨床に即した検査方法を用いて電気生理学的・画像診断で詳細に再現性高く障害評価が出来る方法を確立した(Fujita et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 2017)。臨床研究では、患者を病態別に層別化する人工知能アルゴリズムを開発し(Omodaka et al., PLoS One. 2017)、血流や代謝産物などのバイオマーカーを探索できる環境を整備した(Kiyota et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018, Sato et al., Sci Rep. 2018)。さらに、世界最大規模の GWAS を展開し、日本人に特有な7つの緑内障と関連する遺伝子座を発見した(Shiga et al., Hum Mol Genet. 2018)。研究連携先である東北メディカルメガバンクが保有する正常人12万人のゲノムデータを解析することで、日本人に特有な緑内障感受性遺伝子が発見されることが期待され、これらの成果は個別化医療を着実に現実に近づけている。しかし、緑内障患者の内訳から感受性遺伝子は影響力が弱い可能性が考えられ、また、その分子の役割や機序の解明においてマウスとヒトによる種差の影響が無視出来ない。この問題を解決する手段としてヒト iPS 細胞の応用が考えられる。申請者らのグループではヒト iPS 細胞から高純度で RGC を作製することが可能になっており(iPS-RGC)、感受性遺伝子のヒト RGC へ与える影響を *in vitro* で解析出来る。しかし、細胞培養による実験系では眼内の環境がヒト RGC へ与える影響を解析することが出来ない。そこで本研究ではそれらの要件を全て満たす評価系として、ヒト iPS-RGC をマウス眼に異種移植・生着させることにより、より生体に近い環境下で感受性遺伝子や緑内障関連神経障害がヒト iPS-RGC に及ぼす影響を解析することを目的とした。

### 2. 研究の目的

患者由来の iPS 細胞から分化誘導した網膜神経節細胞(iPS-RGC)をヌードマウスの眼内に移植し、感受性遺伝子と RGC の生存やストレスマーカーとの関連を実臨床で用いられている医療機器により評価する。本研究成果は、GWAS により同定されたリスクアレルと緑内障病態の関連性を明らかにするとともに、緑内障治療において実現されなかった「ゲノム医療」への応用が期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 患者由来 iPS-RGC の作製

GWAS により同定されたリスクアレルをホモで持つ緑内障患者から iPS 細胞を作製する。この iPS 細胞に対して、RGC 特異的な転写因子である Pou4F2 のプロモーターの下流に EGFP を搭載したコンストラクトを、CRISPR/Cas9 を用いて遺伝子導入による影響を受けにくい領域である AAVS-1 領域に導入し stable clone を作製する。この iPS 細胞から立体構造網膜を分化誘導した後に iPS-RGC を単離する。

#### (2) ヒト iPS-RGC のマウス眼内への移植

作製したヒト iPS-RGC を、拒絶反応が起こりにくいヌードマウスの硝子体内に移植し、既報(Venugopalan et al., Nat Commun. 2016)に従い網膜への生着を評価する。iPS-RGC を単離後の培養日数および移植する細胞数などの条件検討をおこない、iPS-RGC がマウス網膜へ生着する条件を最適化する。

#### (3) 眼圧変動における移植後ヒト iPS-RGC の脆弱性評価

ヒト iPS-RGC 移植後のマウスを長期間飼育し、RGC 変性の過程を経時的に観察する。走査レーザー検眼鏡(SLO)を用いて *in vivo* イメージング(Fujita et al., Sci Rep. 2015)による蛍光陽性ヒト iPS-RGC の生存数評価の他、OCT, ERG, VEP, オプトトリーによる画像診断、電気生理学的評価および行動学的評価をおこなう。加えて、申請者らが開発した、鋭敏に RGC 障害を検出可能なストレス応答性レポーターを用いて、移植した iPS-RGC の障害と眼圧の関係を組織学的に解析する(Fujita et al., Sci Rep. 2015)。さらに、高眼圧に対する反応性を評価するため、マイクロビーズを前房内に投与し眼圧上昇を誘導したモデルを作製し、上記と同様の評価項目

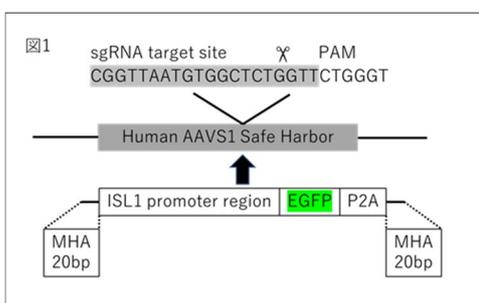
で実験をおこなう。

#### 4. 研究成果

マウス眼内へ移植したヒト iPS 細胞由来網膜神経節細胞をイメージング出来るように、ヒト遺伝子のセーフ・ハーバー座位である AAVS1 領域へ網膜神経節細胞特異的プロモーター蛍光タンパク質をノックインしたヒト iPS 細胞株の作製を行った (図 1)。まずは代表的な網膜神経節細胞マーカーである Thy1、ISL1、BPMS のプロモーター領域をそれぞれ約 1kbp の範囲でクロニングを試みた。電気泳動のサイズから問題なくクロニングされたと考えられた ISL1 のプロモーター領域の N 末及び C 末にはそれぞれ制限酵素 MluI、EcoRI の配列を付加した。この PCR 産物を NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit を用いて精製した。pcDNA3.1(+) eGFP vector のマルチクロニングサイトにおいて、制限酵素 MluI と EcoRI で vector を切断し、先ほどプロモーター領域部分をクロニングした PCR 産物とを DNA Ligation Kit を使用して形質転換により組み込んだ。作製したプラスミドを pcDNA3.1(+) eGFP vector 内のプライマーで DNA シークエンスを施行し、正しく形質転換が行われていることを確認した。組み込んだ vector のプロモーター領域の先頭からポリ A 鎖までを PCR 法で増幅した。こちらも同様に NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit を用いて精製した。次に CRISPR RGEN Tools のサイトから AAVS1 領域においてゲノム編集に効率的な crRNA の選定を行い ( crRNA: CGGTTAATGTGGCTCTGGTT, PAM 配列 CTGGGT )、Sacas9-vector ( pX601-AAV-CMV::NLS-SaCas9-NLS-3xHA-bGHpA; U6::BsaI-sgRNA; addgene ) へ組み込んだ。ゲノム編集の方法は編集効率が高いと報告された MMEJ (Microhomologies-mediated end-joining) 法を用いた ( J Grajcarek at al., Nature communication. 2019 )。プロモーター領域の先頭からポリ A 鎖までを PCR 法で増幅し精製したコンストラクトに DNA 切断後の末端部分 20bp のマイクロホモロジーを PCR で両端に付加し、ノックイン用のコンストラクトを作製した。このノックイン用コンストラクト及び pcDNA3-GFP plasmid をヒト iPS 細胞に FuGENE® HD Transfection Reagent を用いて遺伝子導入した。翌日に培地交換を行い、Accutase で遺伝子導入したヒト iPS 細胞を回収した。BD FACSAria™ Cell Sorter を用いて GFP 陽性 iPS 細胞をシングルセルとして単離し、96well plate で培養を開始した。コロニーが出現したヒト iPS 細胞から DNA を抽出し、ノックイン配列内部のプライマーを用いて PCR を行い、電気泳動でノックインした DNA のサイズのバンドが出ているか確認したが、ゲノム編集されたヒト iPS 細胞は確認されなかった。MMEJ では SNP などの数塩基置換の編集に使用されることが多く、本研究のように長い配列をノックインする際にはアームの長さを長くし、さらにノックインする配列を組み込んだベクターでゲノム編集を行うことが必要と考えられた。

そこで、マイクロホモロジーから相同配列を前後 1kbp に伸長し、さらに標的とする網膜神経節細胞関連遺伝子を Thy1、ISL1、BPMS からより早期に発現し長期にわたり発現が継続する Pou4F2 へと変更した。同様にゲノム編集に効率的な gRNA の選定を行い、pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)へ組み込んだ。ノックインベクター及び gRNA vector を Lipofectamine® 2000 を用いて iPS 細胞に遺伝子導入し、導入した iPS 細胞からコロニーをピックアップした。iPS 細胞及び GFP 遺伝子内のプライマーを用いてノックインされた iPS 細胞を同定した。さらにこの iPS 細胞かを拡大培養し、もう一度コロニーピックアップを行い、ホモ接合体、ヘテロ接合体のノックイン株を同定した。このノックイン株 iPS 細胞から立体網膜組織へ分化誘導したところ個々の発生速度に変化があるものの分化誘導 40 日目以降に立体網膜組織の網膜内層部に GFP の蛍光発現を認めた。この立体網膜組織より凍結切片を作製し、抗 Pou4F2 抗体及び抗 GFP 抗体で免疫染色を施行したところ、局在の一致を認めており、網膜神経節細胞が蛍光標識された iPS 細胞であることを確認した (図 2、図 3)。

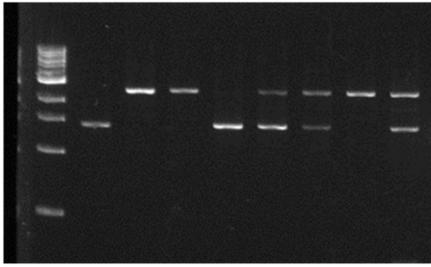
今後は蛍光標識されたヒト網膜神経節細胞を用いてマウス及びラットの眼内へ細胞移植を行い、その生着を確認する。その後 AAV vector による緑内障関連遺伝子導入やマイクロビーズによる高眼圧モデルにおけるヒト網膜神経節細胞の反応を検証していく方針である。



(図 1) ヒト AAVS1 領域へのゲノム編集

ISL1 のプロモーター配列に EGFP 及び P2A の配列を付加し、両端に MHA20bp を付加したコンストラクトを作製した。

図2

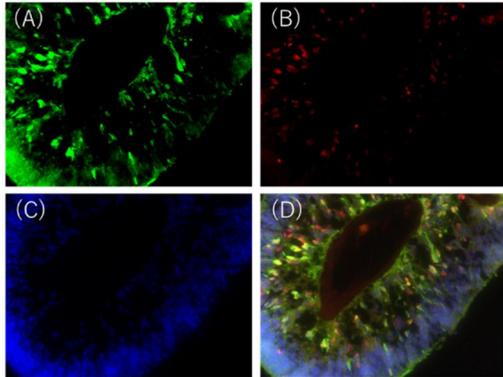


(図2) iPS細胞に対するゲノム編集の確認

- ・ 1.4kbp のバンドのみ 編集(-)
- ・ 2.1kbp のバンドのみ ホモ接合体
- ・ 1.4kbp と 2.1kbp のバンド ヘテロ接合体

ホモ接合体及びヘテロ接合体を確認した。

図3

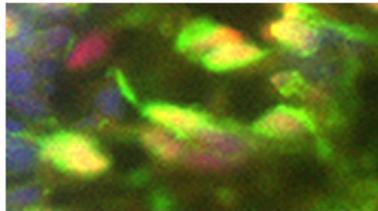


(図3) ノックイン株 iPS 細胞由来立体網膜組織の免疫染色

ノックイン株 iPS 細胞由来立体網膜組織を 50 日間維持培養した後に凍結切片を作製した。抗 GFP 抗体及び抗 BRN3B 抗体で免疫染色を施行した。

(A) 抗 GFP 抗体、(B) 抗 BRN3B 抗体、(C) DAPI、  
(D) Merge

図4



(図4) ノックイン株 iPS 細胞由来立体網膜組織の免疫染色(拡大)

抗 GFP 抗体と抗 BRN3B 抗体の二重染色で共陽性細胞を認めた。

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、中澤 徹
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、中澤 徹
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
研究分担者	小林 航  (Kobayashi Wataru)  (20646442)	東北大学・医学系研究科・助教    (11301)	

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