

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18341

研究課題名(和文)疾患特異的iPS細胞を用いたドルーゼン形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidate the drusen formation mechanism using disease-specific iPS cells

研究代表者

井上 由美 (INOUE, YUMI)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：70867481

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)：黄斑変性患者由来iPS-RPEを用いて病態を再現し、iPS-RPEの形態・貪食能・消化能の評価を行い、脂質解析による脂質プロファイルとの関連を検討することでドルーゼン形成メカニズムの解明を目指した。本研究では、患者由来iPS-RPEと健常由来iPS-RPEを分化させることができた。さらに、Fibulin-3のたんぱく質発現は患者由来iPS-RPEで増加しており、黄斑変性患者の病態を再現できた。網羅的脂質解析ではクラスタリング解析の結果患者由来iPS-RPEと健常由来iPS-RPEで細胞内の脂質組成が違ってくるのが分かった。また、視細胞外節を貪食させることで細胞内の構成脂質も変化することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、大きなドルーゼンを多数持つ患者由来のRPE(iPS-RPE)の脂質プロファイルからドルーゼン形成メカニズムを明らかにすることを目的とした。研究成果ではiPS-RPEで病態を再現することに成功し、脂質解析による貪食した視細胞外節の代謝経路や細胞内の脂質分布の変化を調べることが可能になった。これらの結果からMALの病態を解明することで、ドルーゼン形成のメカニズムを明らかにすることができる。脂質プロファイルからドルーゼン形成との関連を調べる研究はこれまでになく学術的意義は高い。このメカニズムが明らかになることで、ドルーゼン消失の治療法または治療薬の開発の進展が期待でき社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, reproduce the pathological condition using iPS-RPE derived from Macular degeneration patients, then evaluating the morphology, phagocytic ability, and digestive ability of iPS-RPE. Furthermore, examining the relationship with the lipid profile by lipid analysis and the mechanism of drusen formation was elucidated. We could differentiate the Patient-derived iPS-RPE and healthy-derived iPS-RPE, and the protein expression of Fibulin-3 was increased in the Patient-derived iPS-RPE, and the pathological condition of Macular degeneration patients could be reproduced. In the comprehensive lipid analysis, it was found that the intracellular lipid composition differs between the Patient-derived iPS-RPE and healthy-derived iPS-RPE as a result of clustering analysis. It was also found that the intracellular constituent lipids are changed by phagocytosing the extracellular segment of photoreceptor cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：iPS-RPE 黄斑変性 加齢黄斑変性症

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD) は、中途失明の主な原因の一つであり、人口の高齢化に伴い患者数は増加の一途をたどっている。脈絡膜新生血管を伴う滲出型と、新生血管を伴わず、網脈絡膜萎縮をきたす萎縮型ともに、AMD の発症には網膜色素上皮細胞 (RPE) の脂質代謝をはじめとする加齢変化が重要であるとされる。これまで患者から病変組織を採取することは不可能であり、RPE の加齢変化を解析することは難しかった。そのため、病態解明が進まず、根本的な治療法も見つかっていない。

RPE は視細胞外節 (脂質二重膜が積み重なった構造) の貪食、消化及びリサイクルを日々行っており、体内でも脂質の代謝が最も盛んな細胞の一つである。RPE に機能障害が生じ、貪食した視細胞外節を十分消化できなくなると、ドルーゼンと呼ばれる脂質を中心とした老廃物が網膜色素上皮下に沈着する。ドルーゼンは加齢黄斑変性の前駆病変であり、発症予防の好ターゲットであるものの、形成メカニズムはいまだ十分に解明されていない。

私達が着目する黄斑変性の類縁疾患、Malattia Leventinese (常染色体優性放射状ドルーゼン、autosomal dominant radial drusen : ADRD) は EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) 遺伝子変異によって、思春期からドルーゼンの形成を認める。ドルーゼンの長期にわたる蓄積の結果、脈絡膜新生血管や網脈絡膜萎縮をきたし、中心視力が低下する。治療としては新生血管消退を目指すものはあるが、血管が消退しても良好な視力は期待できず、ADRD の有効な治療法は存在していない。

上記より、AMD、ADRD とともに新生血管や変性が起きる前段階のドルーゼン蓄積期の進行メカニズム解明並びに進行抑制・治療こそが今後の課題である

2. 研究の目的

本研究では、大きなドルーゼンを多数持つ ADRD 患者から樹立した iPS 細胞由来の RPE (iPS-RPE) を用いてのドルーゼン形成メカニズムの解明を目的とした。患者からのサンプリングが困難であった RPE を、我々独自の iPS-RPE への分化誘導法により病態の再現が可能になった。RPE は視細胞外節を貪食し、刷新するという非常に大事な役割を果たし、大量の脂質を常に分解している。その脂質プロファイルを解明し、ドルーゼン形成との関連を調べる研究はこれまでになく、学術的にも独自性並びに創造性が高い。このメカニズムが明らかになることで、ドルーゼン消失の治療法または治療薬の開発の進展が期待できると考えた。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞樹立

ADRD 患者 (マラチア) 1 名及び健常人 (正常眼底コントロール) 2 名から皮膚を採取し、遺伝子導入にて iPS 細胞を樹立した。

(2) iPS-RPE 分化誘導

私達が開発した分化方法で RPE 細胞に分化誘導させた。具体的には、フィーダー細胞上で培養した iPS 細胞を RPE 細胞へと分化誘導し、RPE 細胞特異的であるピグメントが観察されたら、そのピグメントコロニーだけを単離し、増殖させる。さらにシート状に広がりピグメントが観察された細胞だけを回収し、純度の高い iPS-RPE を得る。ADRD 患者 (マラチア) 及び健常人 (正常眼底コントロール) から樹立した iPS 細胞を用い、iPS-RPE を作成、メンブレン及びアッセイ用プレートに単層シート状の iPS-RPE を得る。

(3) 形態評価

作製した iPS-RPE を用いて健常人と患者とで形態に差異があるかを、タイトジャンクションマーカーである ZO-1 の免疫染色で検討した。また、電子顕微鏡観察でより詳細な検討を行った。

(4) 遺伝子発現評価

RPE 特異的な遺伝子発現の差異に関して、iPS-RPE を用いて Retinal pigment epithelium-specific 65kDa protein (RPE65), Cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP), Bestrophin-1 (BEST1) の発現状態をそれぞれ RT-PCR 及び western blotting で調べた。また、EFEMP1 の産物である Fiblin-3 の発現を western blotting にて検討した。

(5) 機能評価

iPS-RPE を用いて健常人と患者とで貪食能に差異があるかを、蛍光標識した牛外節を iPS-RPE に貪食させ、FACS 解析を行うことで検証した。さらに、NOR と ADRD とで消化能に差異があるかを、iPS-RPE に貪食させた牛外節に含まれるロドプシンたんぱく量を western blotting を用いて経時的に定量することで検証した。

(6) ドルーゼン形成評価

メンブレン上で各 RPE 細胞を培養すると、ドルーゼン様の蓄積物が生じる。このドルーゼン形成量の差異を検証した。

(7) 長期培養にての加齢の模倣

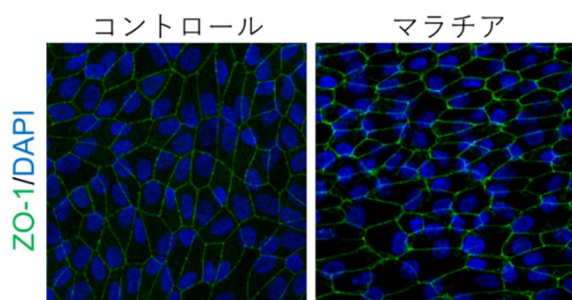
作製した iPS-RPE を用いて、長期培養あるいは、視細胞外節負荷培養を行い、加齢を模した状態で上記と同様に形態及び機能解析を行い比較検討した。

(8) 脂質解析

作製した iPS-RPE を用いて、ストレス無負荷 iPS-RPE 及びその培養液に関して、LC-MS/MS を用い、脂肪酸代謝物の網羅的ノンターゲット解析を行った。ヒートマップを MS-DIAL 及び MultipleArray viewer (MeV) で作成した。本解析は理化学研究所統合生命科学研究センターの有田誠教授（研究協力者）らの協力を得て実施した。

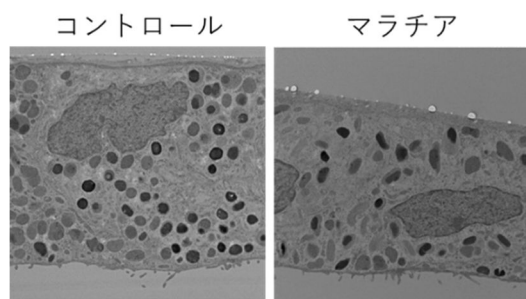
4. 研究成果

- (1) Mallatia Leventinese 患者（マラチア）および、健常人（コントロール）2 名から、iPS 細胞を樹立することができた。RPE へ分化誘導を行うと、それぞれ、RPE に分化することができた。ZO-1 の免疫染色では、患者由来 iPS-RPE (マラチア) と健常由来 iPS-RPE (コントロール) に形態の差はなかった (図 1)。



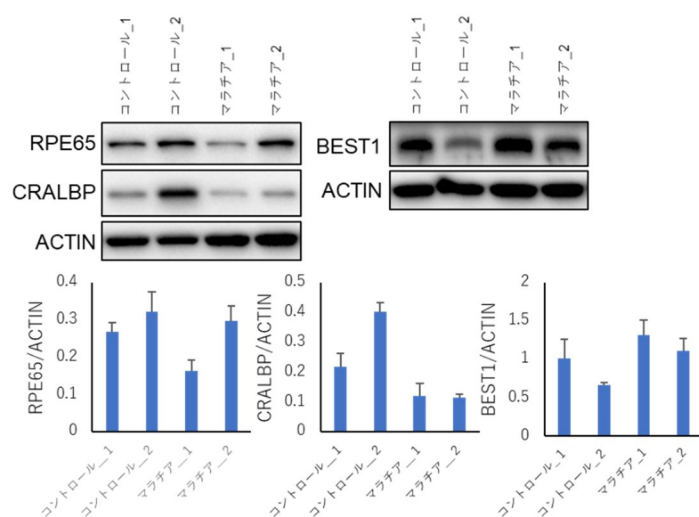
(図 1)

電子顕微鏡観察でも、細胞形態や細胞内小器官に、健常人と患者の差はないように見えた (図 2)。



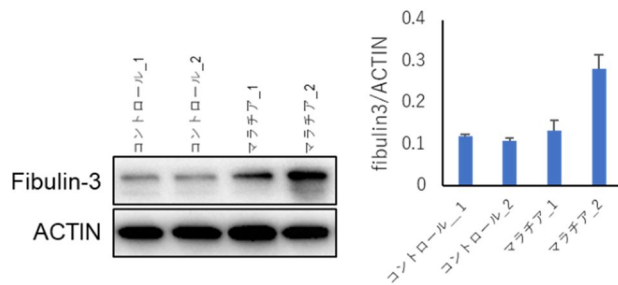
(図 2)

- (2) RPE 特異的遺伝子 RPE65、CRALBP、BEST1 に関して、western blotting の解析から、いずれも発現がみられ、発現量に関して健常人と患者の間で差がなかった (図 3)。



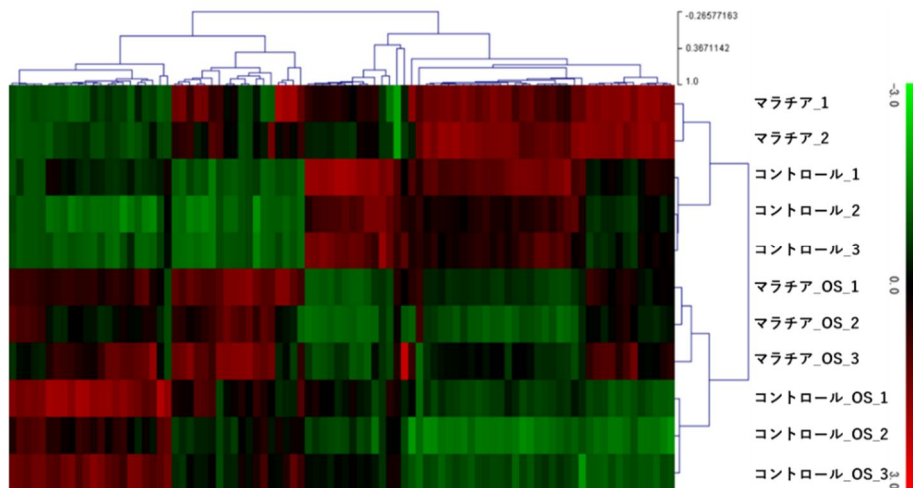
(図 3)

(3) マラチア iPS-RPE では Fibulin-3 の発現量がコントロールと比べて多かった (図 4)



(図 4)

(4) 網羅的脂質解析によるクラスタリング解析の結果、マラチアとコントロールの細胞内の脂質の分布が大きく異なることが分かった(図5)。さらに、視細胞外節を貪食させることで細胞内の脂質構成が変化していることも分かった(図5)。



(図 5)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Minamino, T., Kinoshita, M., **Inoue, Y.**, Kitao, A. & Namba, K. (2022) Conserved GYXLI motif of FlhA is involved in dynamic domain motions of FlhA required for flagellar protein export. bioRxiv (DOI : 10.1101/2022.03.25.485897)
2. **Inoue, Y.***, Kinoshita, M.*, Kida, M., Takekawa, N., Namba, K., Imada, K. & Minamino, T. (2021) The FlhA linker mediates flagellar protein export switching during flagellar assembly. Commun. Biol. 4, 646
3. Tagawa, M., Ikeda, O, H., Hata, M., **Inoue, Y.**, Iwai, S., Tsujikawa, (2021) A Protocol for Stepwise Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells into Retinal Pigment Epithelium. Methodo Mol Biol (DOI: 10.1007/7651_2021_418.)
4. Tagawa, M., Ikeda, O, H., **Inoue, Y.**, Iwai, S., Iida, Y., Hata, M., Asaka, I., Tsujikawa, (2021) Deterioration of phagocytosis in induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells established from patients with retinitis pigmentosa carrying Mer tyrosine kinase mutations. Exp Eye Res. 205, 108503
5. Kinoshita, M., Tanaka, S., **Inoue, Y.**, Namba, K., Aizawa, S.-I. & Minamino, T. (2020) The flexible linker of the secreted FliK ruler is required for export switching of the flagellar protein export apparatus. Sci.Rep. 10:838(12pp).

6. Nakamura, S., Hanaizumi, Y., Morimoto, Y.V., **Inoue, Y.**, Erhardt, M., Minamino, T. & Namba, K. (2020) Direct observation of speed fluctuations of flagellar motor rotation at extremely low load close to zero. *Mol. Microbiol.* 113, 775-765.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------