

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09696

研究課題名(和文) 無虹彩症の病態形成における細胞老化の関与

研究課題名(英文) Roll of Cellular Senescence in the Pathogenesis of Aniridia

研究代表者

川崎 諭 (KAWASAKI, SATOSHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：60347458

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)：無虹彩症はPAX6遺伝子の片アレルの遺伝子変異から生じる疾患で、先天異常に加えて白内障、角膜輪部疲弊症、緑内障といった加齢性疾患も併発する。遺伝子編集技術を用いてPAX6遺伝子の片アレルに機能喪失型変異を導入したヒトiPS細胞(PAX6+/- iPS細胞)を作製し、in vitroにて眼球様の構造体を誘導して遺伝子発現を調べたところ、角膜上皮細胞のコア転写因子ネットワークの一つであるTP63遺伝子の発現が低下していた。PAX6遺伝子量の低下によってコア転写因子ネットワークが破綻してTP63遺伝子の発現低下をきたし、最終的にp53の機能亢進をきたして細胞老化を導いているのではないかと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

無虹彩症では白内障、緑内障、角膜輪部機能不全が若年で起こることは知られてきたが、これまでに無虹彩症で老化が促進しているという報告はなく、また無虹彩症でなぜ白内障や角膜輪部疲弊症といった老化形質が若年で生じるのかという疑問に明確に答えた報告も存在しない。本研究の結果から無虹彩症においては、PAX6遺伝子量の低下によって角膜上皮細胞のコア転写因子ネットワークが破綻してTP63遺伝子の発現低下を来し、最終的に細胞老化を来すことが示唆された。本研究の結果により、無虹彩症患者の後天異常である白内障、緑内障、角膜輪部機能不全については治療介入の可能性が示唆され、将来的な医療シーズとなるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Aniridia is a disease caused by genetic mutation of a single allele of the PAX6 gene and is associated with age-related diseases such as cataracts, corneal ring fatigue, and glaucoma in addition to congenital anomalies. Human iPS cells (PAX6+/- iPS cells) in which a loss-of-function mutation was introduced into one allele of the PAX6 gene using gene editing technology were generated, and ocular-like structures were induced in vitro and gene expression was examined to investigate the association between the PAX6 gene and senescence. It was unveiled that the expression of the TP63 gene, one of the core transcription factor network of corneal epithelial cells, was decreased. It was speculated that the downregulation of PAX6 gene levels disrupts the core transcription factor network, resulting in the downregulation of TP63 gene expression, and ultimately in the upregulation of p53 function, leading to cellular senescence.

研究分野：医歯薬学

キーワード：無虹彩症 PAX6 細胞老化 p53 角膜上皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 無虹彩症の臨床病態

無虹彩症は PAX6 遺伝子の片アリの遺伝子変異により生じる疾患で常染色体優性遺伝を示す。約 10 万人に一人の割合で生じ、先天的に虹彩の無形成ないし低形成、黄斑低形成、斜視や眼振などを呈する。成人期までの視力は主に黄斑低形成により 0.2~0.4 程度であるが、成人期以降に白内障、角膜輪部疲弊症、緑内障などを発症してさらなる視力低下を来す。PAX6 遺伝子は眼球発生のマスターコントロール遺伝子とも呼ばれ、眼球発生に主導的な役割をもつ一方、眼球以外にも脳、嗅上皮、膵臓の および 細胞にも発現しており、それぞれの機能不全により、発達不全、無嗅覚症、糖尿病を生じる。

(2) 無虹彩症の動物モデル

無虹彩症の動物モデルとしては、自然発症変異体として分離された Sey マウスがあり、遺伝性の小眼球症を示す。無虹彩症の臨床表現型には、出生時点で存在する虹彩異常、黄斑低形成などの先天疾患と出生後に生じる後天疾患の二つが存在する。後天疾患である白内障、角膜輪部疲弊症、緑内障はすべて加齢性疾患であることから、無虹彩症では PAX6 遺伝子を発現する組織において加齢が進行している可能性がある。

(3) 無虹彩症の遺伝病態と老化への関係

無虹彩症の遺伝病態としては、一般的には PAX6 遺伝子の片アリの機能喪失性変異によって遺伝子量が半減するためにハプロ不全となり病的表現型が生じると考えられている。これまでに無虹彩症で老化が促進しているという報告はなく、また無虹彩症でなぜ白内障や角膜輪部疲弊症といった老化形質が若年で生じるのかという疑問に明確に答えた報告も存在しない。

2. 研究の目的

(1) 我々は無虹彩症でみられる白内障等の老化形質は、PAX6 遺伝子量が半減することにより何らかのメカニズムによって細胞老化が促進し、その結果として組織老化が生じることが原因ではないかと考えている。本研究ではこれらの問いに答えるべく、PAX6 遺伝子量と細胞老化との関係について我々が構築した無虹彩症の *in vitro* 病態モデルを用いて検討することとする。

3. 研究の方法

(1) 無虹彩症モデル iPS 細胞の樹立および未分化能、三胚葉分化能の確認

201B7 株 iPS 細胞をベースとして、CRISPR/Cas9 システムを用いて PAX6 遺伝子の片アリ (PAX6+/-) および両アリ (PAX6-/-) のノックアウト細胞を樹立した。さらに免疫染色によって未分化マーカーの発現について検討し、三胚葉分化能とそれにかかわる分化マーカーの発現について検討した。

(2) 無虹彩症モデル iPS 細胞の SEAM 形成能についての検討

SEAM 培養を定法通り行い、SEAM 形成やその大きさなどの形質について検討した。

(3) 無虹彩症モデル iPS 細胞から角膜上皮細胞への誘導効率の検討

SEAM 培養ののちにフローサイトメトリーを用いて角膜上皮前駆細胞を分取して誘導効率について検討した。

(4) 無虹彩症モデル iPS 細胞から誘導した角膜上皮細胞についてシングルセル RNA 発現解析を行い、細胞集団の分布や遺伝子発現について検討した。

(5) 無虹彩症モデル iPS 細胞から誘導した角膜上皮細胞について、いくつかの重要遺伝子については real-time PCR を用いて遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) B7 株 iPS 細胞をベースとした PAX6+/- 細胞の樹立

従来は D2 株 iPS 細胞をベースとした PAX6+/- 細胞において無虹彩症発症モデルを作製していたが、角膜上皮細胞への分化誘導効率が不良であるために 201B7 株 iPS 細胞をベースとした PAX6 遺伝子の片アリ (PAX6+/-) および両アリ (PAX6-/-) のノックアウト細胞の樹立を行った。樹立した PAX6+/- iPS 細胞 (1 株) では、PAX6 遺伝子の Exon 5 において 28 塩基の欠失が見られ、PAX6-/- iPS 細胞 (2 株) では PAX6 遺伝子の同じく Exon 5 において 13 塩基、19 塩基の欠失が見られた。いずれもフレームシフト変異であり、non-sense mediated mRNA decay のメカニズムによって変異 mRNA が分解されて遺伝子量の減少または消失に至ると推察される。

これらのことから、樹立した PAX6^{+/-}-および PAX6^{-/-}-iPS 細胞では PAX6 遺伝子内部に PAX6 遺伝子量を減少させる病的変異が存在することを意味し、無虹彩症のモデル細胞としての遺伝的資質を持つことが分かった。

(2) 樹立した PAX6^{+/-}-および PAX6^{-/-}-iPS 細胞における未分化状態の維持についての検討
樹立した PAX6^{+/-}-および PAX6^{-/-}-iPS 細胞において、未分化マーカー（アルカリフォスファターゼ、OCT3/4、NANOG、TRA-1-60、SSEA-4）の発現を野生型 iPS 細胞と比較したところ、有意な差は認められなかった。また三胚葉分化について検討したところ、いずれの細胞においても三胚葉分化能を維持していた。

これらのことから、樹立した PAX6^{+/-}-および PAX6^{-/-}-iPS 細胞においては、野生型 iPS 細胞と同程度の未分化状態の維持が得られており、眼球オルガノイドである SEAM 形成を行うにあたっての問題はないものと考えられた。

(3) 樹立した PAX6^{+/-}-および PAX6^{-/-}-iPS 細胞における SEAM 形成能についての検討
樹立した PAX6^{+/-}-および PAX6^{-/-}-iPS 細胞において SEAM 形成能を比較した。PAX6^{-/-}-iPS 細胞では明瞭な SEAM 構造を形成するに至らず、PAX6^{+/-}-iPS 細胞では SEAM 構造を形成したものの、野生型と比較して SEAM が有意に小型化していることが分かった。さらに PAX6^{-/-}-iPS 細胞と野生型 iPS 細胞の SEAM をゾーンごとに詳しく調べると、PAX6^{+/-}-iPS 細胞では野生型 iPS 細胞と比較して神経網膜に相当するゾーン 2 の面積が小さく、一方で角膜上皮細胞に相当するゾーン 3 の面積が大きいことが分かった。（図 1）また遺伝子発現について検討したところ、水晶体および眼杯形成にかかわる遺伝子の発現が PAX6^{+/-}-および PAX6^{-/-}-iPS 細胞において低下していた。

これらのことから、樹立した PAX6^{-/-}-iPS 細胞においては恐らく機能的な PAX6 遺伝子がないことから眼球発生が生じないことが分かった。このことは PAX6 遺伝子のホモ遺伝子変異がマウスにおいて出生直後に死亡することやヒトにおいて無脳症や潜伏眼球となることを反映しているものと推察された。また PAX6^{+/-}-iPS 細胞では SEAM を形成するものの小型化していた。このことはヒトやマウスにおいて小眼球となることを反映しているものと推察された。

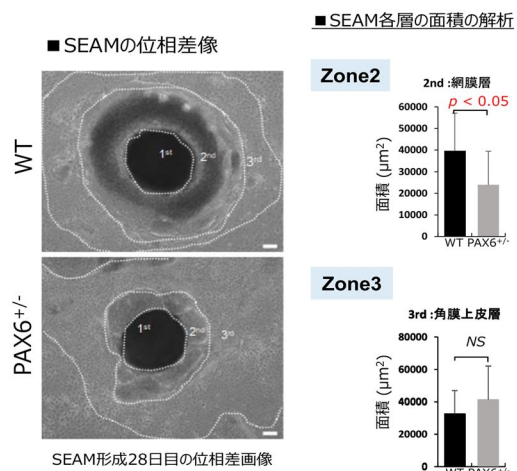


図 1

(4) 樹立した PAX6^{+/-}-および PAX6^{-/-}-iPS 細胞における角膜上皮前駆細胞の分化誘導についての検討

樹立した PAX6^{+/-}-および PAX6^{-/-}-iPS 細胞において、SEAM 形成後にフローサイトメトリーによって角膜上皮前駆細胞(SSEA-4⁺/CD104⁺の分画)への誘導効率について検討したところ、PAX6^{-/-}-iPS 細胞においては角膜上皮前駆細胞をほぼ誘導することができず、PAX6^{+/-}-iPS 細胞においては角膜上皮前駆細胞(CD104⁺SSEA-4⁺)を誘導したが、その効率は野生型 iPS 細胞と比較して有意に低下した。また PAX6^{+/-}-iPS 細胞においては、野生型 iPS 細胞と比較して誘導した角膜上皮前駆細胞の増殖が遅く細胞面積も大きいことが確認された。（図 2）

これらのことから、PAX6^{+/-}-iPS 細胞においては角膜上皮前駆細胞を誘導可能ではあるが、その誘導効率は低いことが分かった。このことは無虹彩症患者の角膜上皮細胞への分化が少ないことを示唆していると考えられた。

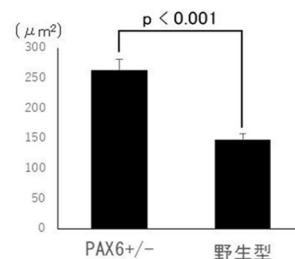
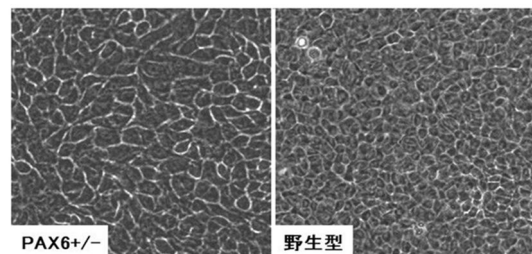


図 2

(5) 樹立した PAX6^{+/-}-iPS 細胞から誘導した角膜上皮前駆細胞の遺伝子発現についての検討
誘導角膜上皮前駆細胞はフローサイトメトリーにて分取しているものの単一の細胞腫ではない可能性が考えられたためにシングルセル RNA 発現解析を行った。UMAP 解析の結果、誘導した細胞はいくつかの細胞腫に分類され、PAX6^{+/-}-iPS 細胞から誘導された細胞は野生型 iPS 細胞から誘導された細胞とは異なる分布を示した。

PAX6+/- iPS 細胞から誘導された細胞では、輪部から球結膜上皮の形質をもつ細胞が多く含まれており、一方で野生型 iPS 細胞から誘導された細胞では角膜上皮の形質をもつものが多く含まれていた。また遺伝子発現で見ると、PAX6+/- iPS 細胞から誘導された細胞では結膜上皮細胞のマーカであるケラチン 4/13 の遺伝子発現が亢進し、角膜上皮細胞のマーカであるケラチン 3/12 の遺伝子発現が低下していた。

これらのことから、PAX6+/- iPS 細胞から誘導された細胞においては、角膜上皮細胞への分化が少なく、結膜上皮細胞への分化が多いという結果となった。

(6) TP63 遺伝子発現についての検討

特に注目すべき重要な遺伝子として、TP63 遺伝子の発現が PAX6+/- iPS 細胞から誘導された細胞では有意に低下していた。TP63 遺伝子の中でも、N 末端が短いトランスクリプトである Np63 について real-time PCR を行ったところ、PAX6+/- iPS 細胞から誘導された細胞では有意にその発現が低下していた。(図 3)

Np63 は N 末端の転写活性ドメインが失われているために p53 と競合することが知られている。Np63 発現が低下することは p53 の機能抑制をきたしてその結果として p53 の活性が亢進することとなると考えられる。p53 はがん抑制因子の中でもレチノblastoma 遺伝子と並んで特に強力な因子として知られており、その機能亢進は細胞増殖抑制、細胞老化、アポトーシスを誘導する。さらに興味深いことには、TP63 と PAX6 遺伝子はともに角膜上皮細胞のコア転写因子ネットワークに含まれている。おそらく、PAX6 遺伝子量の低下によってコア転写因子ネットワークが機能不十分となって TP63 遺伝子の発現低下をきたし、最終的に p53 の機能亢進を来して細胞老化を亢進させるのではないかと推察された。

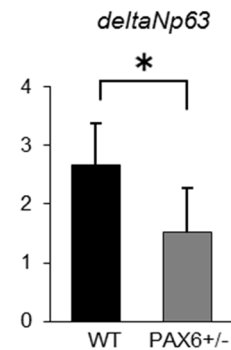


図 3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Satoshi Kawasaki , Kohji Ohmoto , Kohji Nishida
2. 発表標題 GENERATION OF AN IN VITRO DISEASE MODEL OF ANIRIDIA BY INTRODUCING HETEROZYGOUS LOSS-OF-FUNCTION MUTATION OF PAX6 GENE IN HUMAN IPS CELLS
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research
4. 発表年 2021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	馬場 耕一 (BABA KOUICHI) (00436172)	大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授 (14401)	

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