

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09700

研究課題名(和文) 網膜色素上皮細胞におけるカリウムチャネルKir7.1の機能解明

研究課題名(英文) Investigation of the function of potassium channel Kir7.1 in retinal pigment epithelial cells

研究代表者

森實 祐基 (Morizane, Yuki)

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：50432646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性網膜ジストロフィの一つであるレーバー先天盲16型(LCA16)の原因遺伝子であるKCNJ13の網膜色素上皮細胞(RPE)における機能を分子生物学的に解析した。その結果、KCNJ13遺伝子が欠損すると、RPEの酸化ストレス応答が恒常的に亢進すること、外的に負荷された酸化ストレスによる細胞死が増加し、抗酸化反応に関わる遺伝子の発現が低下することが明らかになった。また、KCNJ13遺伝子はRPEにおける経上皮輸送においても重要な働きを担っていることが明らかになった。これらはLCA16の病態メカニズムの一端を分子生物学的に明らかにしたものであり、今後の治療法開発の基盤となる知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、網膜色素上皮細胞の細胞死や酸化ストレス耐性におけるKCNJ13遺伝子の機能が明らかになった。この成果は、将来的なレーバー先天盲16型の治療法開発につながる成果であるといえる。本研究の成果を基盤にして、今後はKCNJ13遺伝子の補充や酸化ストレスの抑制がLCA16の病態に及ぼす影響を検討するなど、治療に直結する課題の検討が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the function of KCNJ13, the causative gene of Leber congenital amaurosis 16 (LCA16), one of the hereditary retinal dystrophies, in the retinal pigment epithelium (RPE). As a result, it was revealed that the deletion of the KCNJ13 gene leads to a constant hyperactivation of oxidative stress response in the RPE, an increase in cell death due to externally induced oxidative stress, and a decrease in the expression of genes involved in antioxidant reactions. Furthermore, it was elucidated that the KCNJ13 gene also plays an important role in transepithelial transport in the RPE. These findings molecularly elucidate a part of the pathogenic mechanism of LCA16 and provide insights that will serve as a basis for the development of future therapeutic strategies.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素上皮細胞 カリウムチャネル

## 1. 研究開始当初の背景

網膜色素上皮細胞(以下 RPE)は網膜の恒常性維持を司る細胞であり、RPE の障害によって視覚障害の主原因である網膜色素変性や加齢黄斑変性等の網膜変性疾患を発症する。しかし網膜変性疾患の病態は未解明で根本的な治療法は存在しない。そのため、RPE 障害の原因を解明することは喫緊の課題である。近年、網膜変性疾患の一つであるレーバー先天盲の病態に膜電位の維持に重要なカリウムチャンネルの一つ(Kir7.1)が関与することが明らかにされた。

レーバー先天盲 16 型(LCA16)は遺伝性網膜ジストロフィの一つである。LCA16 患者は眼底に特徴的な濃い色素斑を認め、出生後極早期に視力障害、夜盲症、眼振、白内障を呈する。しかし、LCA16 の病態については不明な点が多い。我々はこれまでにヒト iPS 細胞に CRISPR-Cas9 システムを用いて遺伝子編集を行い、KCNJ13 を欠損した iPS-RPE (KCNJ13 KO RPE) を作製した。そして野生型 iPS-RPE と比較した結果、KCNJ13 KO RPE では貪食能が有意に低下することを報告した。また、KCNJ13 KO RPE は一部の細胞が周囲の RPE よりも突出し、細胞配列に異常を認めること、さらに、KCNJ13 KO RPE は細胞死を来した割合が野生型 RPE に比べて有意に高く、細胞死を来した細胞が有意に細胞突出部にみられることを明らかにした。しかし、Kir7.1 をノックアウトすると細胞死を来しやすくなるメカニズムについては不明であった。

## 2. 研究の目的

これまでの研究成果に基づき、我々は、RPE における Kir.7.1 が細胞の生存に重要な働きをしていると考えた。網膜でみられる細胞死の原因としては、紫外線への暴露などの外的要因や加齢に伴う酸化ストレスが重要であることから、特に、Kir.7.1 と酸化ストレスの関係を明らかにすることを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) Kir.7.1 欠損が定常状態の RPE における酸化ストレス関連遺伝子およびタンパクの発現に及ぼす影響

独自に作成した KCNJ13 KO RPE と野生型 iPS-RPE を培養し、定常状態における酸化ストレス関連遺伝子およびタンパクの発現を定量評価した。

(2) Kir.7.1 欠損が酸化ストレス負荷による RPE の細胞死および酸化型グルタチオン(GSSG)の生成に及ぼす影響

外的な酸化刺激が加わった際の RPE の酸化ストレス応答を検討するために、tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)を種々の濃度(0mM, 5mM, 15mM)で野生型 iPS-RPE、KCNJ13 KO RPE にそれぞれ負荷し、MTS アッセイを用いて細胞死を定量解析した。次に t-BHP 負荷後の GSSG、抗酸化能に関与する遺伝子である SLC7A11、GCLC、SOD2 遺伝子の発現を定量解析した。

(3) Kir.7.1 欠損が RPE における経上皮輸送に及ぼす影響

RPE の重要な機能として水や各種イオンの経上皮輸送が挙げられる。RPE における経上皮輸送が障害されると、視細胞-RPE-脈絡膜における恒常性が維持できなくなり、RPE や視細胞の細胞死を引き起こすと考えられる。そこで、RPE における経上皮輸送の主要なターゲットの一つである塩化物イオンに着目し、その輸送タンパク(CLCN2)の発現を野生型 iPS-RPE と KCNJ13 KO RPE で比較検討した。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) KCNJ13 KO RPE では野生型 iPS-RPE と比較して、抗酸化因子である CAT、GPX4、GSR 遺伝子の発現が有意に亢進した。そして、KCNJ13 KO RPE では野生型 iPS-RPE と比較して酸化ストレスの抑制に関与する総グルタチオン濃度が有意に増加した。さらに、抗酸化反応に関わる転写因子 Nrf2 の制御タンパクである Keap1、そして Nrf2 の下位にある xCT の発現を検討した結果、KCNJ13 KO RPE では野生型 iPS-RPE と比較して Keap1 の発現が有意に低下し、xCT の発現が有意に亢進した。Kir7.1 が欠損したことによって酸化ストレス応答が亢進した理由として、Kir7.1 が欠損することで RPE の細胞内にカリウムイオンが貯留し、ミトコンドリア内にカリウムイオンが流入することによって活性酸素種が産生されたためと考えられた。以上のことから、KCNJ13 KO RPE は野生型 iPS-RPE と比較して恒常的に酸化ストレス応答が亢進している可能性が示唆された。

( 2 ) KCNJ13 KO RPE は野生型 iPS-RPE と比較して t-BHP 負荷による細胞死が有意に多くみられた。さらに、KCNJ13 KO RPE では野生型 iPS-RPE に比べて GSSG の濃度が有意に増加した。また、抗酸化能に関与する遺伝子である SLC7A11、GCLC、SOD2 遺伝子の発現についても、野生型 iPS-RPE と比較して KCNJ13 KO RPE において発現が有意に亢進した。以上の結果から、KCNJ13 KO RPE では野生型 iPS-RPE と比較して酸化ストレス耐性が低下し、細胞死を来しやすくなっている可能性が示唆された。

( 3 ) 野生型 iPS-RPE と比較し、KCNJ13 KO RPE では CLCN2 の発現が有意に低下した。これは、Kir7.1 が経上皮輸送に関連していることを示す結果であり、KCNJ13 KO RPE でみられる細胞死の原因となる可能性が示唆された。

本研究によって、KCNJ13 遺伝子が欠損すると、RPE の酸化ストレス応答が恒常的に亢進すること、さらに、外的に負荷された酸化ストレスによる細胞死が増加し、抗酸化反応に関わる遺伝子の発現が低下することで酸化ストレス耐性が低下することが明らかになった。また、KCNJ13 遺伝子は RPE における経上皮輸送においても重要な働きを担っていることが明らかになった。これらの成果は LCA16 の病態メカニズムの一端を分子生物学的に明らかにしたものであり、今後の治療法開発の基盤となる知見である。現時点で LCA16 に有効な治療は存在していないため、今後は KCNJ13 遺伝子の補充や酸化ストレスの抑制が LCA16 の病態に及ぼす影響を検討するなど、治療に直結する課題の検討が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 神崎勇希	4. 巻 -
2. 論文標題 レーパー先天盲16型の病態解明：KCNJ13遺伝子ノックアウトヒトiPS細胞由来網膜色素上皮細胞の解析	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 日本眼科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanzaki Yuki, Fujita Hirofumi, Sato Keita, Hosokawa Mio, Matsumae Hiroshi, Morizane Yuki, Ohuchi Hideyo	4. 巻 63
2. 論文標題 Protrusion of KCNJ13 Gene Knockout Retinal Pigment Epithelium Due to Oxidative Stress? Induced Cell Death	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 29 ~ 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.63.12.29	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大内淑代, 神崎勇希, 藤田洋史, 佐藤恵太, 細川海音, 松前洋, 白神史雄, 森實祐基
2. 発表標題 レーパー先天性黒内障16病態モデルiPS-RPEの作製と解析
3. 学会等名 第61回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田洋史, 神崎勇希, 佐藤恵太, 細川海音, 松前洋, 森實祐基, 大内淑代
2. 発表標題 網膜色素上皮細胞におけるレーパー先天黒内障16型原因遺伝子KCNJ13のノックアウトは酸化ストレス感受性を高め細胞死を誘導する
3. 学会等名 第76回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大内淑代, 神崎勇希, 藤田洋史, 佐藤恵太, 細川海音, 松前洋, 森實祐基
2. 発表標題 カリウムチャネル遺伝子KCNJ13ノックアウト網膜色素上皮では酸化ストレスにより細胞死を生じる
3. 学会等名 第63回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神崎勇希
2. 発表標題 Protrusion of KCNJ13 Gene Knockout Retinal Pigment Epithelium Due to Oxidative Stress-Induced Cell Death.
3. 学会等名 第128回日本眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

令和5年度 日本眼科学会学術奨励賞 神崎勇希
------------------------

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	大内 淑代  (Ohuchi Hideyo)  (00253229)	岡山大学・医歯薬学域・教授    (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	神崎 勇希  (Kanzaki Yuki)		
研究協力者	藤田 洋史  (Fujita Hirofumi)		
研究協力者	佐藤 恵太  (Sato Keita)		

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