

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592647

研究課題名(和文)ヒトiPS技術を用いた網膜色素変性症に対する新規神経保護治療の開発に向けた研究

研究課題名(英文)The use of induced pluripotent stem cells to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa

研究代表者

小澤 洋子(Ozawa, Yoko)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90265885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性症は、遺伝子異常による進行性疾患で、失明原因の上位を占める。早期に診断が付いても進行を抑制する安定した治療法はないのが現状である。本研究では、患者の異常遺伝子を持つ人工多能性細胞を用いて、新規の神経保護治療法の開発に向けた病態メカニズムを解析を行った。

具体的には、網膜色素変性症患者の皮膚細胞由来のiPS細胞を樹立し、これを網膜細胞に分化誘導した。そして、視細胞特異的に発現するNRL遺伝子のプロモーター支配下にGFPを発現するベクターを、分化誘導中の細胞にウイルスを用いて感染させ標識し、病態の分子メカニズムを解析すると共に、治療のための薬剤スクリーニングの可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from an RP patient carrying a rhodopsin mutation (E181K). The cells were then subjected to retinal differentiation; the resulting rod photoreceptor cells were labeled with an Nrl promoter-driven enhanced EGFP-carrying adenovirus and purified using flow cytometry after 5 weeks of culture. Using this approach, we found a reduced survival rate in the photoreceptor cells with the E181K mutation, which was correlated with the increased expression of endoplasmic reticulum (ER) stress and apoptotic markers. The use of RP patient-derived iPSCs provided a system that can be used to explore candidate therapeutic approaches.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜 幹細胞 iPS 再生 神経保護

1. 研究開始当初の背景

京都大学の山中らが、線維芽細胞から人工多能性幹細胞 (induced-pluripotent stem cell; iPS 細胞) を作成する方法を発表した (Takahashi, Yamanaka *Cell* 2006) ことにより、遺伝子異常を持つ変性疾患の研究には、新しい可能性が生まれた。これまでヒトサンプルを得られにくい神経系等の臓器・組織の研究には、動物モデルを用いる等の工夫はされていたが、限界があった。しかし、患者遺伝子異常が保存された iPS 細胞から各臓器・組織の細胞を誘導することで、遺伝子異常を維持したヒト細胞を用いた研究の可能性が開けたと言えた。

ヒト iPS 細胞は、皮膚などの体細胞に山中らの 3 つもしくは 4 つの遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Klf4 の 3 因子もしくは c-Myc を加えた 4 因子) を導入して誘導する方法が基本である。樹立された iPS 細胞から各臓器・組織細胞を分化誘導する方法は、これまでに胚性幹細胞 (ES 細胞) で発表されたものが応用され、それにより、iPS 細胞由来の各臓器・組織細胞を得ることが可能と考えられる。それを移植治療等の再生医療に用いる可能性も研究されている。また、国内外で、患者より得た体細胞をもとに iPS 細胞を樹立したと報告された (Park et al. *Cell* 2008, Jin et al. *Plos One* 2011)。

申請者らは、これまで網膜疾患の病態解明、治療法の開発に向けた研究を行ってきた (Kurihara, Ozawa et al. *Diabetes* 2008, Sasaki, Ozawa et al. *Diabetologia* 2010)。その中で、糖尿病網膜症などの網膜疾患で視機能障害を引き起こすのは、網膜神経変性によるものであり、原因には組織内微小環境の変化に伴って網膜神経細胞内で亢進する炎症性分子の発現や酸化ストレスがあることを、高血糖モデルマウスを用いた解析から明らかにした。そして、それに対する神経保護治療の必要性和、その候補薬剤としてアンジオテンシン II 1 型受容体拮抗剤や抗酸化剤を提案するに至った。

これに対し、網膜色素変性症は、4000 ~ 8000 人に 1 人で発症するとされ、遺伝子異

常により生じる網膜視細胞もしくは網膜色素上皮細胞の変性であるが、そのメカニズムには不明の点が多い。各々の患者の遺伝子異常は多様でそれらを保存した動物モデルを各種作成するのは不可能であり、ヒト網膜細胞を入手し、研究に用いることはさらに困難であることが、その一因であった。しかし、患者体細胞から iPS 細胞を樹立して、そこから網膜細胞を分化誘導すれば、患者遺伝子異常を持つ網膜細胞を用いて病態メカニズムを研究し、新規治療法開発に向けた研究をすることが可能になると考えた。

一般に、異常タンパクが蓄積すると小胞体内の運搬が妨げられ、小胞体ストレスを起こすことがある。そこで、申請者らは網膜色素変性症で蓄積する異常タンパクも小胞体ストレスを引き起こし、網膜視細胞死を誘導する可能性があると考えた。これを網膜色素変性症患者の iPS 細胞から分化誘導した網膜細胞の培養系で解析することで、実際の患者の遺伝子異常に基づく病態を解明し、さらに将来的にはその機構を抑制する薬剤スクリーニングを行うことができると考えた。

2. 研究の目的

網膜色素変性症は、遺伝子異常を原因とし、徐々に進行する疾患で、失明原因の上位を占める。早期に診断が付いても進行を抑制する安定した治療法はないのが現状である。異常遺伝子が明らかになっても、網膜神経細胞障害 (死) のメカニズムは今のところ、わかっていないものが多いためである。そこで、患者の異常遺伝子を持つ人工多能性細胞 (induced-pluripotent stem cell; iPS 細胞) を用いて病態メカニズムを解析し、新規の神経保護治療法の開発に向けた研究を行うこととした。

3. 研究の方法

【方法の概要】

網膜色素変性症患者の体細胞から樹立した iPS 細胞を網膜細胞 (特に視細胞) に分化誘導し、その培養系を用いて細胞死のメ

カニズムを解明する。今回は遺伝子異常が既知である患者の iPS 細胞を用いる。患者 iPS 細胞とコントロール iPS 細胞を網膜細胞に分化誘導した細胞で細胞死の頻度を比較する。また、誘導した細胞内で生じる小胞体ストレスについて、分子生物学的手法等を用いて解析する。その上で、これらの阻害剤の効果を解析する。

【具体的な方法】

(1) 網膜色素変性症患者体細胞由来およびコントロールの iPS 細胞を網膜視細胞に分化誘導する系を確立した。

申請者は、既に成人のヒト皮膚細胞を用いて京都大学・山中研究室で樹立された iPS 細胞 (201B7 クローン) を、共同研究者の慶應義塾大学医学部生理学教室・岡野栄之教授を通じて同研究室から入手し、網膜細胞への分化誘導をした。これをコントロール iPS 細胞とした。一方、申請者らは網膜視細胞特有の遺伝子の異常を診断された網膜色素変性症患者の皮膚細胞を採取し、それを用いて iPS 細胞株 (図 1) を 50 株樹立し、その中でも特に効率よく網膜視細胞に分化誘導される株を選出した。そして患者遺伝情報を保持した効率よい網膜視細胞の分化誘導系を構築した。分化誘導は、ロドプシン mRNA の発現レベルにより判断した (変異の有無にかかわらず検出する方法を用いた)。

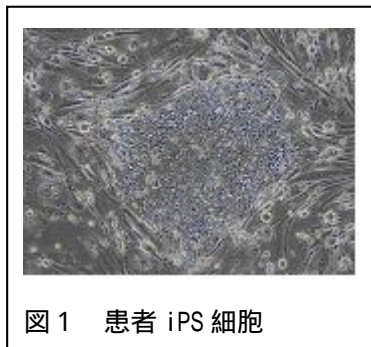


図 1 患者 iPS 細胞

(2) 分化誘導した網膜細胞の中で視細胞を標識しフローサイトメトリーで生細胞数を測定した。

今回は網膜細胞の中でも、視細胞の異常を検出する必要がある。そこで、網膜細胞

の分化誘導の過程で、桿体視細胞に特異的に発現する転写因子 Nr1 のプロモーター支配下に GFP を発現するウイルスを、患者 iPS 細胞から誘導した網膜細胞に感染させ、培養中で視細胞を GFP の蛍光発色により標識した。標識された細胞を生存視細胞として、フローサイトメトリーを用いて経時的に計測した。また、死んだ細胞をアネキシン等で染色して、GFP 陽性細胞に含まれる死んだ細胞の割合を計測した。

(3) 分化誘導した視細胞において小胞体ストレスの有無を解析した。

遺伝子異常により異常タンパクが蓄積すると、小胞体ストレスを生じることが予想された。そこで、(2) で標識した視細胞をフローサイトメトリーで回収し、mRNA を抽出して cDNA を作成し、リアルタイム PCR により小胞体ストレスのマーカーである CHOP、Bip などの発現を解析した。

(4) 分化誘導した視細胞において小胞体ストレス経路の阻害剤の効果を解析した。

小胞体ストレスにはいくつかの経路があることが知られている。関与する各分子の阻害剤を、患者 iPS 細胞から分化誘導させた視細胞の培養に添加し、フローサイトメトリーを用いて、標識した生存視細胞数を計測した。また、そのときの小胞体ストレスマーカーを、(3) と同様にリアルタイム PCR を用いて解析した。阻害剤としてはラパマイシン、PP242、AICAR、NOD1-1、およびサルプリナールを用いた。

4. 研究成果

分化誘導培養後 4 週目までは、患者 iPS 細胞由来の視細胞も、コントロール iPS 細胞由来の視細胞も、生存細胞数は同等でいずれも徐々に増加していた。しかし、5 週目になると、患者 iPS 細胞由来の視細胞はコントロール iPS 細胞由来の視細胞に比べて、生存細胞数は少ないという結果となった (図 2)。

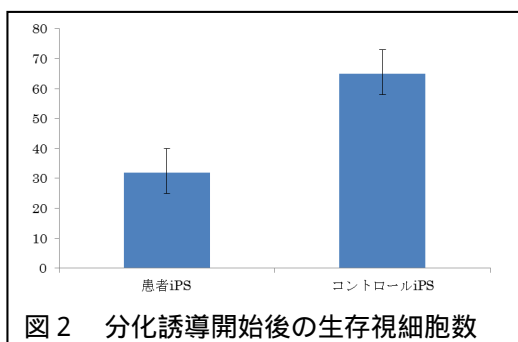


図2 分化誘導開始後の生存視細胞数

分化誘導5週目の患者iPS細胞由来とコントロールiPS細胞由来の視細胞を比べると、前者では明らかに死んだ細胞数が増加した。

それぞれのiPS細胞由来の視細胞において、小胞体ストレスのマーカーをリアルタイムPCRを用いて計測したところ、患者iPS細胞由来の視細胞ではコントロールiPS細胞由来の視細胞に比べてCHOP、Bipなどのマーカーの発現は明らかに上昇していた。

次に、各阻害剤を患者iPS細胞由来の視細胞に添加したところ、どの阻害剤でも明らかに、分化誘導5週後の生存細胞が増加した。この時小胞体ストレスマーカーの発現は低下していた。生存細胞増加の程度としてはラパマイシン添加時が最も顕著であった。

このように、網膜色素変性症患者の体細胞から樹立したiPS細胞を分化誘導した網膜視細胞では細胞死が促進されており、そのメカニズムとして小胞体ストレスが影響することが示された。そして、小胞体ストレスに対する阻害剤の視細胞保護効果が、患者iPS細胞由来の培養系で示された。

これまで網膜色素変性症の病態メカニズムは、主にマウスなどの動物モデルを用いて研究されてきた。しかし、本研究はヒト網膜細胞を用いて分子レベルで病態を解析するところが特色であり独創的であった。この研究が成功したことで、将来的には網膜色素変性症の中でもさまざまな遺伝子異常による病態メカニズムを次々と解析することが可能になると予測される。また、本手法は、将来、他の神経保護治療薬のスク

リーニングのためにも用いることができる可能性があり、発展性のあることが明らかにされた。これまで治療法のない分野に対して、積極的治療法の開発の動きを与える出発点となる研究であった。

また、最近では生活習慣病に伴う網膜疾患においても遺伝的素因の関与が考えられており、遺伝子の違いによる細胞反応性の相違のある可能性が指摘される。本研究の成果は、将来的には、より広い分野の網膜疾患研究に役立つ可能性を持つ重要な研究である可能性を示すことにつながることを予測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Fujinami K, Jana Zernant, Ravinder K Chana, Genevieve A Wright, Tsunoda K, Ozawa Y, Tsubota K, Anthony G Robson, Graham E Holder, Rando Allikmets, Michel Michaelides, FACS; Anthony T Moore. Clinical and Molecular Characteristics of Childhood-onset Stargardt Disease. *Ophthalmology*. 2015 Feb; 122(2):326-34. 査読あり

doi: 10.1016/j.ophtha.2014.08.012.

(2) Yoshida T, Ozawa Y*¶, Suzuki K, Yuki K, Ohshima M, Akamatsu W, Matsuzaki Y, Shimmura S, Mitani K, Tsubota K, Okano H. The use of induced pluripotent stem cells to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa. *Mol Brain*. 査読あり 2014 Jun 16;7:45. doi: 10.1186/1756-6606-7-45. *Corresponding author ¶ Equally Contributed.

〔学会発表〕(計4件)

(1) Ozawa Y. Neuroprotection against oxidative stress in the retina. 2015 Asia ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2015.2.16.-19.

Yokohama, Japan

(2)吉田哲, 小沢洋子, 鈴木啓一郎, 平林由香, 鈴木禎史, 小泉春菜, 結城賢弥, 小林哲郎, 大山学, 天谷雅行, 岡田洋平, 赤松和土, 松崎有未, 三谷幸之介, 榛村重人, 坪田一男, 岡野栄之. iPS 細胞を用いた網膜色素変性症における視細胞の変性機構の解析 第 12 回 日本再生医療学会 2013/3/21-23 神奈川 横浜 横浜パシフィコ

(3)小沢洋子. 網膜変性疾患の治療の展望 浜松眼科フォーラム 2013/3/15 静岡

(4)Yoshida T, Ozawa Y, Hirabayashi Y, Suzuki K, Mitani K, Kobayashi T, Ohyama M, Amagai M, Okada Y, Akamatsu W, Tsubota K, Shimmura S, Okano H. An analysis of the mechanisms of degradation of photoreceptor cells in a retinitis pigmentosa patient using iPS cells. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th annual meeting. 2012/6/13-6/16. Yokohama, Japan

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.keio-eye.net/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小沢 洋子 (Yoko Ozawa)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90265885

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

吉田 哲 (Tetsu Yoshida)

慶應義塾大学・医学部・特任助教(参画当時)

赤松 和土 (Wado Akamatsu)

慶應義塾大学・医学部・講師(参画当時)

研究者番号：60338184

馬淵 春菜 (Haruna Mabuchi)

慶應義塾大学・医学部・特任研究員(参画当時)

研究者番号：70465011