

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830037

研究課題名(和文) 直接的分化誘導法による網膜視細胞作製技術の応用-変性過程のin vitro解析

研究課題名(英文) In vitro applications of human photoreceptor-like cells derived by direct reprogramming.

研究代表者

小牟田 縁 (Komuta, Yukari)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・病院 内科・助教)

研究者番号：60566850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの眼球内の細胞は直接採取するには多大なリスクを伴い、分子生物学的解析が困難である。本研究は採取にリスクの少ない体細胞より直接的分化誘導法によって、解析に役立つ視細胞モデルを作製することを目的としている。まず体細胞として末梢血単核細胞に注目し、健常者由来の末梢血単核細胞から視細胞様細胞を作製したところ、視覚の機能に必要な多くの遺伝子が発現され、一部の細胞に光応答能を確認することができた。一方で、健常者と網膜色素変性症患者由来のヒト皮膚線維芽細胞を使用して視細胞モデルを作製し、各種変性誘導剤に曝露したところ、患者の細胞でより変性を起こしやすいことが認められた。

研究成果の概要(英文)：In ophthalmopathy study, it is risky to collect human photoreceptor cells for patients. Therefore, we planned to construct photoreceptor cell models from other available somatic cells by direct reprogramming for molecular biological analysis. We generated photoreceptor-like cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. We found that retinal disease-related genes, most of which are crucial to photoreceptor functions, were efficiently expressed. And in a part of photoreceptor-like cells, a light-induced inward current was detected. Moreover, photoreceptor-like cells were generated from human dermal fibroblasts of normal and retinitis pigmentosa (RP) patients, and analyzed for cell degeneration. We found photoreceptor-like cells from RP patients were more susceptible to apoptosis and autophagy. These induced photoreceptor-like cells might contribute to individualized drug screening and disease modeling of inherited retinal degeneration.

研究分野：神経変性、神経科学

キーワード：視細胞モデル 直接的分化誘導法 網膜色素変性症

1. 研究開始当初の背景

ヒト眼科疾患の研究において、眼球内の細胞は直接採取するには患者に多大なリスクを伴うため、分子的解析が非常に困難である。例えば、網膜の細胞が変性して罹患者の視覚を損なう網膜色素変性症 (Retinitis Pigmentosa 以下 RP) は、遺伝子変異が多様であり、かつ長期間かかって変性に至る病態であるが、その変性について網膜視細胞の分子的解析を経時的に行うことは難しい。このような場合、遺伝子変異のある細胞などにより、疾患を再現するモデルの作製が有効である。特に近年の疾患 iPS 細胞を使用した解析では多くの疾患モデルで再現された。しかし遺伝子などの先天的要因のみならず、遺伝子発現制御における個人差など後天的な要因を含むと思われる遅発性疾患の再現は難しい。このような複雑な疾患の解析への応用において、疾患モデルはまだ研究途上である。

本研究では網膜色素変性症患者の体細胞から、直接的分化誘導法によって遺伝子変異を含む視細胞モデルの作製を試み、解析に応用することを計画した。直接的分化誘導法とは、iPS 細胞の様な多能化状態を経ずに目的の細胞へ分化誘導する方法である。既にこの方法によりヒト皮膚線維芽細胞から分化させた視細胞様細胞で、光受容体能を持つまでに分化誘導されたものが存在することが確認されている (引用文献)。直接的分化誘導法は手順が少なく短期間で分化誘導する手法であり、iPS 細胞で起こる“初期化”の様な細胞に強いる変化が少ない。ゆえに遺伝子修飾など後天的な個人差が保持されている可能性があり、iPS 細胞を使用した実験のみでは得られない重要な情報を得られる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では患者の体細胞から直接的分化誘導法によって患者の持つ遺伝子変異を含む視細胞モデルを作製し、変性機構を解析できるようにすることを目的とする。RP の患者由来の体細胞 (網膜色素変性症の原因遺伝子の一つ *Eys* 遺伝子に変異を持つ患者) から網膜視細胞を作製し、細胞変性時における患者の視細胞モデルと健常者の視細胞モデルとの差異の解析を行い、直接的誘導法による視細胞モデル作製法が RP 研究に応用可能であるか、また、その応用可能な限界について、遺伝子発現やタンパク質の発現・局在など細胞生物学的・分子生物学的的手法によって解析を行う。変性が再現されるならば、将来的に患者毎の病態解明と予後予測、薬剤スクリーニングによるテーラーメイド治療の確立に応用できる。

3. 研究の方法

(1) 体細胞を使用した視細胞モデル作製と解析

市販のヒト皮膚線維芽細胞 (Promocell 社) にレトロウィルスを介して *RAX*, *CRX*, *NeuroD1*, *Otx2* を導入し、視細胞様細胞への分化誘導を行った。コントロール実験には、GFP 遺伝子をレトロウィルスによって導入した細胞群を使用した。RP では視細胞がアポトーシスを起こしているという報告があるため (引用文献)、作製した視細胞様細胞に対し、変性誘導剤を処理した。アポトーシス誘導試薬 (一般によく使用されている Actinomycin、Camptothecin、Cyclohexamide (TNF 添加)、Dexamethasone、Etoposide)、小胞体ストレス誘導試薬 (Tunicamycin、Thapsigargin)、オートファジー誘導試薬 (Rapamycin) を使用した。2 週間分化誘導培地で培養した後の細胞を、各変性誘導剤を添加し、およそ 16 時間培養した。その後、細胞を 4% パラホルム液で固定し、抗 Active Caspase-3 抗体で免疫染色し、アポトーシスを観察した。

皮膚線維芽細胞の他の体細胞として末梢血由来単球細胞を使用する試みを行った。線維芽細胞では直接的分化誘導に必須と考えられている *RAX*, *CRX*, *NeuroD1* の遺伝子導入を、ウィルスを介して行った後、視細胞様細胞へ分化誘導されたかに関して視細胞マーカーの発現を指標として解析を行った。また遺伝子導入後の細胞が光受容体能を獲得するかに関して、光刺激による電気生理学的手法によって解析した。これは暗下で細胞培地にシスレチノールを添加し 30 分培養後、パッチクランプ法により光を当てた直後の細胞膜に流れる電流を測定することで行われた。

(2) 健常者と RP 患者の変性視細胞モデルを使用した視細胞変性の解析

健常者と RP 患者由来の皮膚線維芽細胞から作製した視細胞様細胞を使用した。患者は網膜色素変性症の原因遺伝子の一つ *Eys* 遺伝子に変異を持つことが確認されている方である。分化程度の指標や、得られた視細胞様細胞の遺伝子背景を知るために、Gene Chip によって遺伝子の発現変化を網羅的に解析し、比較した。また各種細胞変性剤を使用し、Caspase-3 (アポトーシスのマーカー)、LC3 (オートファジーのマーカー) の各マーカータンパクを主な指標として変性の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 体細胞を使用した視細胞モデル作製と解析

市販のヒト皮膚由来線維芽細胞を使用した視細胞モデル作製

各変性誘導剤に対し暴露したコントロール細胞と視細胞様細胞で比較すると、Rapamycin 以外の誘導剤で Active Caspase-3 陽性細胞が、視細胞様細胞の方で多く観察された。Actinomycin、Camptothecin、

Cyclohexamide では高濃度で両者ともアポトーシスが起ることが確認されたが、Etoposide、Thapsigargin、Tunicamycinでは視細胞様細胞にのみアポトーシスが確認された。一方、Dexamethasone、Rapamycinではアポトーシスに関しての顕著な差は確認されなかった。

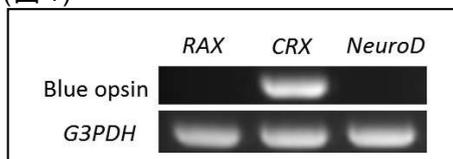
これらの結果より、4因子を導入して視細胞様細胞に分化させた細胞はアポトーシス誘導に対し感受性が高まり、また小胞体ストレスからアポトーシスを起こす機序が形成されている可能性が示唆された。この実験で得られた結果をもとに、(2)で行う健常者もしくは患者のボランティアから採取した、ヒト皮膚線維芽細胞の誘導剤の濃度など各種条件を設定した。特に顕著であった Actinoycin、Cyclohexamide、Etoposide、Thapsigargin、Tunicamycin に関して、解析を行うこととなった。

健常者末梢血単球細胞を使用した視細胞モデルの作製と解析(参考文献: 図の幾つかを抜粋・改変して以下に記載)

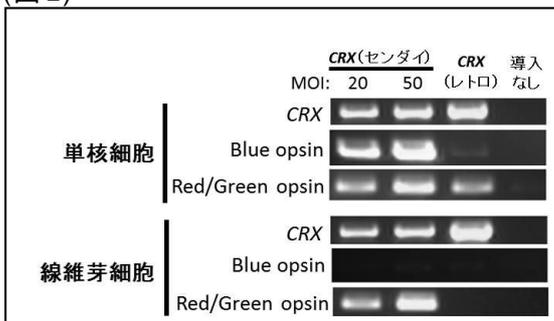
i) 単球細胞へのウイルスを介した遺伝子導入による分化誘導効率についての検証

RAX、CRX、NeuroD1をレトロウイルスと細胞質型RNAベクター(センダイウイルスを使用)によって末梢血単球細胞への遺伝子導入を試みた。また細胞による違いを確認するために市販のヒト由来皮膚線維芽細胞も使用し、比較を行った。すると末梢血単球細胞ではCRX単独の導入でも視細胞マーカーのBlue Opsinが高発現することが分かった(図1)。さらにCRXの導入後の細胞において、レトロウイルスよりもセンダイウイルスを介した場合の方が視細胞マーカー遺伝子の発現が高く、分化誘導効率が高いことが示された。線維芽細胞にCRX単独を導入した場合、Blue Opsinは発現せず、別の視細胞マーカーのRed/Green Opsinはセンダイウイルスを介した場合のみ発現がみられた(図2)。

(図1)



(図2)



以上の結果より、単球細胞に対しては、レトロウイルスよりもセンダイウイルスの方が、分化誘導効率は高かったといえる。しかしこの効果は、細胞種によって異なっていた。これはウイルスの遺伝子発現機構の違いの他に、細胞が元々持っている遺伝子と導入した遺伝子の相互作用による効果と考えられる。これらの結果より、分化誘導させる細胞種と、遺伝子の導入媒体となるウイルスの種類との組み合わせの選択も、分化誘導効率に大きく影響することが予想される。

また、CRXによって発現誘導される遺伝子をPCRによって詳細な解析を行った。一般に公開されている網膜疾患の遺伝子情報(RetNet: Retinal information network <https://sph.uth.edu/retnet/>)より単球細胞でもともと高発現する遺伝子以外の遺伝子群について解析した。

PCRを行った遺伝子:

ABCA4, ADAMTS18, ARL6, ARMS2, BBS1, BBS2, BBS5, BBS7, BBS12, Blue opsin, C2orf71, C8orf37, CA4, CACNA1F, CC2D2A, CDH3, CEP164, CERKL, C1B2, CLRN1, CNGA1, CNGA3, CNGB1, CNGB3, COL2A1, COUPTF1, CRB1, DTHD1, EFEMP1, ESRRB, FAM161A, FSCN2, FZD4, GDF6, GNA11, GNA13, GNA14, GNA15, GNAT1, GNAT2, GNAT3, GPR98, GRIPAP1, GTF2IRD1, GUCA1A, GUCA1B, GUCY2D, IMPG1, IMPG2, JAG1, KCNV2, LCA5, LZTFL1, MAK, Melanopsin, MKS1, MTPP, NDP, NPHP1, NPHP4, NR1D1, NR2E3, NR2F1, OTX2, PCDH15, PDE6A, PDE6B, PDE6C, PDE6G, PDE6H, PDZD7, Peripherin 2, PGK1, PITPNM3, PLA2G5, PLP1, PRCD, PROM1, PRPH2, RAX2, RBP3, RBP4, RD3, RDH12, Red opsin, Green opsin, Recoverin, RGR, Rhodopsin, RIMS1, ROM1, RP1, RP1L1, RPE65, RPGR, RPGRIP1, RPGRIP1L, SAG, SLC7A14, TLR3, TSPAN12, TTC8, TTPA, TUB, TULP1, TRPC3/6/7, UNC119, USH1C, USH1G, USH2A, ZNF423 (計 111)

結果、センダイウイルスによるCRX単独の遺伝子導入後に、発現した、もしくは増加した遺伝子は以下であった。

Blue opsin, C2orf71, CC2D2A, CNGA1, CNGA3, CNGB3, COUPTF1, FZD4, GNA14, GPR98, Green opsin, GUCA1A, GUCA1B, GUCY2D, MAK, NPHP1, PDE6A, PDE6H, RBP4, Red opsin, RDH12, RP1L1, RPGRIP1, SAG, TLR3, TSPAN12, TUB (計 27)

これらの遺伝子は光受容体など視細胞としての機能に必要なものが含まれ、CRXが単球細胞の視細胞様細胞への直接的分化誘導において、主導的な役割をすることが示唆された。

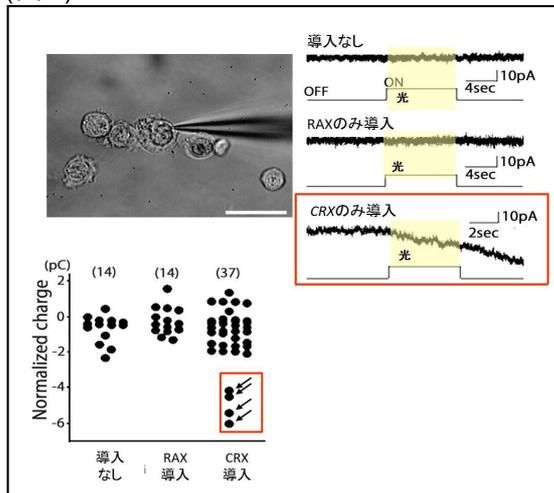
ii) センダイウイルスによってCRXを導入した単球細胞の光応答性能について(図3)

センダイウイルスによってCRXを導入した単球細胞では視細胞の機能に必要な多くの

遺伝子が発現していることが確認されたため、日本医科大学生理学教室の金田誠教授と石井俊行助手と共同研究を行い、光刺激に応答するかの解析を行った。すると CRX 感染細胞の 37 個の細胞中 4 個の細胞で電流に 3pC 異常の変化が確認された。感染を行わなかった細胞 (14 個) 対照実験として RAX のみをセンダイウィルスで遺伝子導入した細胞 (14 個) では電流に 3pC 異常の変化は確認されなかった。

以上の結果より、センダイウィルスによって CRX を導入した単球細胞の一部 (37 個中 4 個の細胞) は、光への応答能を持つまでに分化誘導されたことがわかった。

(図 3)



本研究により、遺伝子導入するためのウィルスと細胞の組み合わせは、分化誘導効率に大きく影響することが分かった。末梢血単球細胞から視細胞様細胞への直接的な分化誘導の場合、細胞質型 RNA ウィルスであるセンダイウィルスが適していることがわかった。またこの時、CRX は主導的な役割をし、センダイウィルスを介して末梢血単球細胞に導入されると、多数の視細胞マーカーの発現を誘導し、さらに一部の細胞を、光受容機能を持つまでの視細胞様細胞へ分化誘導ができることがわかった。

本実験は CRX 導入によって発現誘導できる遺伝子のメッセンジャー RNA 配列や下流の遺伝子発現カスケードの解析に応用できる。目的の遺伝子が眼球内の細胞に特有なものならば、非常に有効である。さらに本研究を発展させ疾患を再現できれば、将来的にそれぞれの患者に適した薬剤の迅速なスクリーニング法の確立にもつながる。

(2) RP 患者の変性視細胞から作製した視細胞モデルによる細胞変性の解析

ボランティアから提供された細胞の実験に関して、代表者の前所属である国立リハビリテーションセンター研究所で承諾を得た研究であることと、「人を対象とする医学系

研究に関する倫理指針」の一部改正に伴う調整のため、詳細なデータの開示は現時点で控えている。現在、データの保管、今後の研究及びその発表は国立リハビリテーションセンター研究所で遂行されている。ここでは健常者と RP 患者の各 1 名分の皮膚線維芽細胞の結果を示す。

提供された皮膚線維芽細胞から作製された視細胞様細胞の網羅的な発現解析では、主な視細胞マーカーに関して健常者と患者で大きな差は確認されなかった。

(1)の市販の線維芽細胞の実験結果をもとに、健常者と患者から提供された皮膚線維芽細胞に対し直接的な分化誘導を行った後、各変性誘導剤に暴露した。

結果、Actinomycin はどの場合も特に顕著な差は確認されなかった。Cycloheximide によるアポトーシス・オートファジーは分化誘導に関係なく患者の細胞でより感受性が高かった。Etoposide では分化誘導前の患者の細胞でオートファジーが促進していた。Thapsigargin では、アポトーシスが分化誘導によって増え、さらに患者細胞ではより感受性が高くなっていた。Tunicamycin に関してはアポトーシスが分化誘導に関係なく患者の細胞で増加し、オートファジーは患者・健常者の細胞の分化誘導後に減少する様子が見られた。これらの結果からは、患者の細胞ではオートファジーの感受性が高い傾向と、分化誘導後に、健常者と患者の細胞のアポトーシスとオートファジーの経路のバランス制御の相違がより顕著になることがうかがわれた。

網膜色素変性症の原因遺伝子の一つ *Eys* 遺伝子に変異を持つ患者から提供された皮膚線維芽細胞を使用して解析が行われたが、*Eys* がどの様に疾患に関与するかは不明である。細胞の変性に伴う *Eys* タンパクの局在や発現、視細胞様細胞の光受容能等に関して詳細な解析が必要である。

<引用文献>

Seko Y, Azuma N, Ishii T, Komuta Y, Miyamoto K, Miyagawa Y, Kaneda M, Umezawa A.

Derivation of human differential photoreceptor cells from adult human dermal fibroblasts by defined combinations of CRX, RAX, OTX2 and NEUROD. *Genes Cells*.19(3):2014, 198-208.

Komuta Y, Ishii T, Kaneda M, Ueda Y, Miyamoto K, Toyoda M, Umezawa A, Seko Y. In vitro transdifferentiation of human peripheral blood mononuclear cells to photoreceptor-like cells. *Biol Open*. 15;5(6):2016, 709-19

Cottet S, Schorderet DF.

Mechanisms of apoptosis in retinitis pigmentosa.
Curr Mol Med. 9(3):2009, 375-83.

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Komuta Y, Ishii T, Kaneda M, Ueda Y, Miyamoto K, Toyoda M, Umezawa A, Seko Y.
In vitro transdifferentiation of human peripheral blood mononuclear cells to photoreceptor-like cells.
Biol Open. 査読あり、15;5(6):2016, 709-19
DOI: 10.1242/bio.016477.

〔学会発表〕(計1件)

小牟田 縁、石井 俊行、金田 誠、上田 泰次、豊田 雅士、梅澤 明弘、世古 裕子
末梢血単核細胞から網膜視細胞様細胞への直接的分化誘導
BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)
2015年12月1日
神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小牟田 縁 (KOMUTA, Yukari)
防衛医科大学校・神経内科・助教
研究者番号：60566850

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：

(4)研究協力者
なし ()