

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15H04998

研究課題名(和文) 網膜変性疾患に対する網膜再生分化の技術を応用した新規治療の開発

研究課題名(英文) Applied research for new preventive strategy for congenital retinal degenerative diseases using differentiation / regeneration technology

研究代表者

世古 裕子 (SEKO, YUKO)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所 感覚機能系障害研究部・研究部長

研究者番号：60301157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子遺伝子CRX, NeuroD1, RAX, OTX2のミックスをヒト皮膚線維芽細胞、ヒト末梢血単核細胞に導入すると、約2週間で光応答する視細胞様の細胞に分化した。線維芽細胞の種類の違いによって視細胞様の細胞の光応答の様式が違い、元細胞の性格の違いを反映することも示唆された。網膜色素変性患者由来の視細胞様の細胞における転写産物の解析が病態解析の一助になる可能性も示された。一方、視細胞様の細胞は、細胞ごとに光応答の大きさが違い、それが初代培養細胞の細胞集団の異質性に加え、1細胞あたりでの転写因子間の量や割合の違いによることが推測された。ポリシストロニックベクターの構築や前駆細胞の作製にも取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工多能性幹細胞(iPSC)作製(Takahashi and Yamanaka, 2006)と同様の方法で、転写因子遺伝子ミックス(CRX, NeuroD1, RAX)をレトロウィルスベクターによってヒト虹彩細胞に導入し光応答のある視細胞様の細胞へ分化誘導することができた。OTX2の追加、あるいは細胞質型RNAウィルスベクターを用いることで、汎用性の高いヒト線維芽細胞やヒト末梢血単核細胞からも視細胞様の細胞を作製した。また、網膜色素変性患者由来の皮膚線維芽細胞から変性視細胞モデルを作製し、病態解析の一助になること、臨床応用への可能性を示した。しかし、誘導細胞の細胞ごとの性質の違いは課題として残された。

研究成果の概要(英文)：Direct reprogramming or redirect differentiation of somatic cells is a promising, simple, low-cost approach to generate target cells from somatic cells. We previously demonstrated that transduction of the combination, CRX, RAX, NeuroD and OTX2 genes, up-regulated expression of the photoreceptor-specific genes in human fibroblasts, where a photoresponse was detected. We here revealed that human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) can also be converted into photosensitive photoreceptor-like cells. We next produced photoreceptor-directed fibroblasts from retinitis pigmentosa patients as a replacement for the degenerative retinas using this differentiation technique. We analyzed defective transcripts of the causative gene in these cells. The results suggested that the redirect differentiation method could be a valuable tool for disease modeling despite some limitations. Major limitation of this method may be relatively higher heterogeneity in the induced photoreceptor-like cells.

研究分野：眼科学、再生医学、遺伝性網膜変性疾患

キーワード：網膜視細胞 ダイレクト・リプログラミング ヒト体細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

感覚の 90%を占める重要な機能である視覚におけるセンサーである網膜は、1度損傷を受けると回復は困難である。視力を司る網膜視細胞（錐体）が集中している黄斑が変性に陥ると不可逆的な視力低下にいたる。失われた視覚の再生を目指して網膜の再生研究が行われ、加齢黄斑変性に対しては、iPS 細胞由来の網膜色素上皮細胞のヒトへの移植が今年実現した（神戸理化学研究所）。網膜は 10 層構造から成り、網膜色素上皮は最外層に位置し、視覚を司る 9 層から成る神経網膜を支える役割を担っている。加齢黄斑変性は網膜色素上皮の移植により視覚回復が期待できるが、就労学齢期の失明原因の第 1 位を占める網膜色素変性症は神経網膜、その中でも最初に光を感受する細胞である視細胞を再生しないと視覚回復は期待できない。この視細胞の再生は未だ研究段階である。近年、マウスやヒトの ES/iPS 細胞から網膜様組織がつくられ（Eiraku M et al. *Nature*, 2011, Zhong X et al. *Nat Commun*, 2014）、移植によるシナプス形成や光応答も報告されている。しかし誘導に数か月を要することがひとつの課題となっている。

一方最近では、普通の線維芽細胞などの細胞（体細胞と呼ばれる）に数種類の転写因子遺伝子をミックスして導入すると 1～2 週間で必要な細胞が得られるという“ダイレクト・リプログラミング”と呼ばれる技術も開発され、すでに心臓、膵臓、神経などがつくられている。申請者の世古らは、この方法で網膜視細胞を作製した。CRX,NEUROD,RAX の 3 種類の転写因子遺伝子をレトロウィルスベクターを用いてヒト虹彩細胞に導入すると、約 1 週間で視細胞特異的な光トランスダクションに関わる遺伝子・蛋白の発現がみられ、錐体と杆体との運命決定に NEUROD の有無に関わる可能性が示唆された（Seko Y et al. *PLoS One*, 2012）。さらに、CRX,NEUROD,RAX,OTX2 の 4 種類の転写因子遺伝子をヒト皮膚線維芽細胞に導入すると、約 1 週間で網膜視細胞に特異的に発現する遺伝子・蛋白を発現し、光刺激に応答する視細胞様の細胞に分化することがわかった（Seko Y et al. *Genes Cells*, 2014）。同じ方法で、網膜変性疾患の患者由来細胞やゲノム編集した細胞を分化誘導し変性視細胞モデルを作製すれば、薬剤のスクリーニングなどに応用可能である。

2. 研究の目的

網膜の個体発生に基づいた分化誘導モデルを展開し、ヒト体細胞から成熟した視細胞へと分化するプロセスを生体外で再現する。ダイレクト・リプログラミングによる網膜視細胞作製を完成させ、応用範囲を広げることを目指し、1、細胞ソースをヒト皮膚線維芽細胞からヒト末梢血単核細胞に広げ、2、ゴールを“視細胞様細胞”から“最終分化した網膜杆体細胞”、“最終分化した網膜錐体細胞”と“網膜前駆細胞”へと進め、3、病態解析、薬剤のスクリーニング、細胞移植に幅広く応用できるツールを作り、網膜変性疾患の治療法開発に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

分化誘導の手法としては、“ダイレクト・リプログラミング”を用い、*in vivo*に近い条件で培養するため、網膜色素上皮細胞との共培養も行った。

また、CRX,RAX,NEUROD,OTX2 などの転写因子を本来の発生過程に近い時系列で導入するために、レトロウィルスベクターと RNA ウィルスとを使用した。誘導した網膜視細胞あるいは前駆細胞の **phenotype** を、視細胞特異的遺伝子/蛋白質の発現の有無によって調べるとともに、微細形態を電子顕微鏡で観察し、外節特有の構造の有無を調べる。機能評価として、電気生理学的な光応答を調べる。

誘導視細胞の評価として、網膜色素変性患者から分化誘導した変性視細胞モデルの転写産物/蛋白質の解析を行うとともに、網膜変性ゼブラフィッシュモデルにおける転写産物/蛋白質の解析

を行うことで視細胞誘導の方法を評価することも試みた。

4. 研究成果

I. 直接的分化誘導による網膜視細胞様細胞作製のための細胞ソースの検討

a. 末梢血由来細胞—末梢血単核細胞と血管内皮前駆細胞

①末梢血単核細胞では、網膜特異的転写因子である *CRX* 遺伝子を細胞質型 RNA ウィルスベクターを介して導入すると、錐体細胞のマーカに加え杆体細胞のマーカ遺伝子 Rhodopsin もわずかではあるが発現するようになり、光応答能を持った細胞（誘導視細胞様細胞）も検出された。また、ラット初代培養網膜色素上皮細胞の培養上清の添加によって誘導視細胞様細胞における Rhodopsin の発現が上昇することが観察された（日本医大、成育医療センター、ID ファーマとの共同研究、業績欄）。

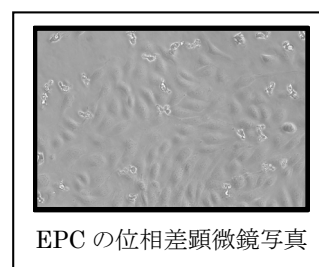
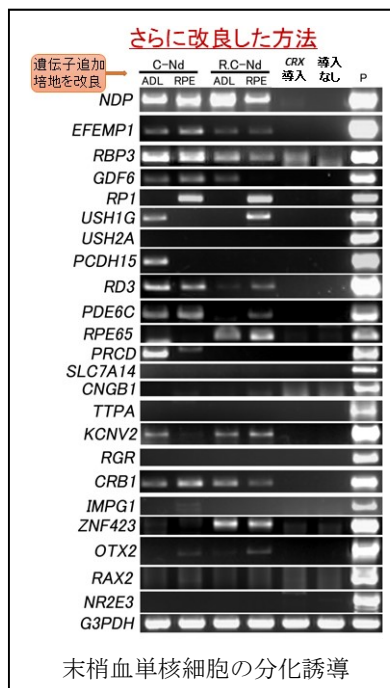
②平成 29 年度には、皮膚線維芽細胞の網膜視細胞への分化誘導に必須であった 4 種類の転写因子をシストロニックに連結し、細胞質型 RNA ウィルスベクターを介して導入、末梢血単核細胞を用いてその有効性を検討した（ID ファーマとの共同研究）。その結果、4 因子をシストロニックに

連結したタンデムベクターでは *CRX* 遺伝子を単独で導入した場合よりも杆体細胞のマーカ遺伝子 Rhodopsin の発現が高くなることがわかった。しかし、4 因子をシストロニックに連結した細胞質型 RNA ウィルスベクターを末梢血単核細胞に導入した場合よりも、4 因子それぞれをレトロウィルスベクターに搭載してミックスして線維芽細胞に導入した場合の方が、杆体細胞のマーカ遺伝子 Rhodopsin の発現が明らかに高かった。また、4 因子をシストロニックに連結した細胞質型 RNA ウィルスベクターを末梢血単核細胞に導入した場合と、*CRX* 遺伝子のみを高濃度で細胞質型 RNA ウィルスベクターを介して導入した場合との比較では、明らかな差は見られなかった。4 因子をシストロニックに連結した細胞質型 RNA ウィルスベクターを高濃度で導入することが良い結果を生むことが予想されたが、技術的な限界があるようだった。

一方、作製した 2 種類のタンデムベクター C とタンデムベクター N では、誘導視細胞における Rhodopsin の発現がタンデムベクター C の方が明らかに高かった。タンデムベクター C は、最も 5' 側に *CRX* を連結し、タンデムベクター N は、最も 5' 側に *NeuroD1* を連結したものである。この結果は、モノシストロニックで作製した細胞質型 RNA ウィルスベクターを時系列的に *CRX*、*NeuroD1* の順番で導入した方が *NeuroD1*、*CRX* の順番で導入するよりも誘導細胞におけるオプシンの発現が有意に高かったことと一致していた。

③以上の限界を克服するため、浮遊細胞である末梢血単核細胞ではなく、末梢血由来であるが接着細胞である血管内皮前駆細胞

(EPC) を単離・培養することを試みた。血管内皮前駆細胞を末梢血から単離・培養する技術を確立することはできたが、ドナーによっては、細胞増殖の速度が著しく遅い場合があり、安定した細胞ソースとすることは難しいと考えられた。



II. 直接的分化誘導による網膜視細胞様細胞の質的検討

皮膚線維芽細胞では、4種類の転写因子遺伝子をレトロウイルスベクターを介してミックスして導入すると網膜視細胞様細胞に分化するが、線維芽細胞の種類によって、分化誘導された網膜視細胞様細胞の光応答の様式が異なることがわかった。一方、細胞によって光応答の大きさも異なり、細胞ごとに分化のレベルに違いがあることが明らかになった。その違いは、初代培養細胞を用いたことによる細胞集団の異質性に加え、4種類の転写因子をモノシストロニックベクターのミックスとして遺伝子導入したことによって、1細胞あたりでの転写因子間の量や割合の違いによって生じたことが推測された。(日本医大と成育医療センターとの共同研究、業績欄)

バラつきを改善する方法として、4種類の転写因子をシストロニックに連結したレトロウイルスベクターを構築することができれば線維芽細胞に高効率に、しかも4因子を均等に細胞導入することが可能になることが推測された。4種類の転写因子をシストロニックに連結するベクターは24種類考えられるが、これまでの実験から、特に3種類を考案した。研究期間内に構築は完了したが、分化誘導実験は、継続して採択された次の研究に持ち越した。

III. 直接的分化誘導による網膜視細胞様細胞の質的検討—直接的分化誘導による変性網膜細胞モデルの作製と評価

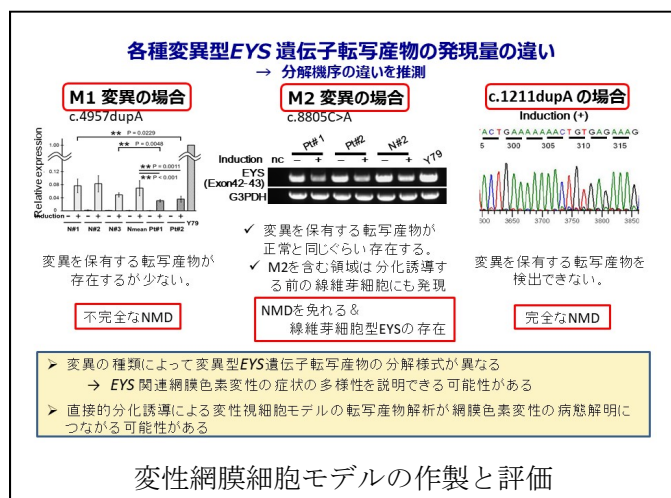
網膜色素変性の主要原因遺伝子 EYS について、網膜にのみ発現する EYS 転写産物の研究に、直接的分化誘導の技術を応用した。EYS 変異の遺伝子型と表現型の相関に関する機序を明らかにすること、直接的分化誘導によって作製する誘導視細胞様細胞の変性視細胞モデルとしての有用性を検証することを目的として、患者の細胞から変性視細胞を作出した。視覚障害の原因の2位を占める網膜色素変性の細胞モデルが確立されれば、この疾患の新しい診断・治療法の手がかりを得ることにつながると思われた。結果は以下のとおりである。

①当研究室で凍結・保存された皮膚線維芽細胞のドナーとなった5名の網膜色素変性患者のうち、3名について、変異型 EYS 遺伝子の転写産物を解析した。フレームシフト変異(c.4957dupA)を保有する変異型 EYS 転写産物は、検出はされたが野生型 EYS よりも発現量が低く、ナンセンス変異(c.8805C>A)を保有する変異型 EYS 転写産物は、野生型 EYS 転写産物とほぼ同様の発現量であった。一方、短縮型変異(c.1211dupA)を含む EYS 転写産物は全く検出されなかった。細胞内の異常蛋白質が作られないようにするための機序とされる NMD (ナンセンス変異による mRNA 分解)が、変異の種類によって部分的に抑制されていることが推測された。

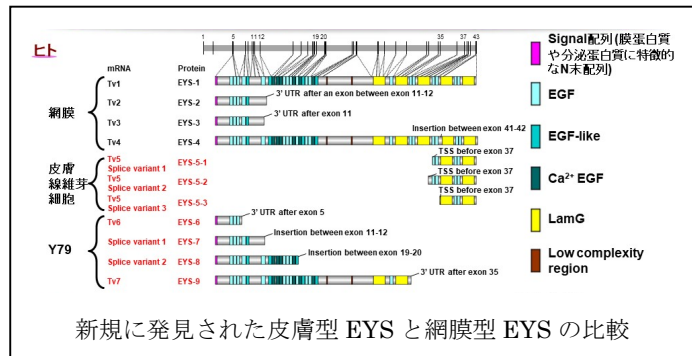
この違いは、変異によって生じた終始コドンの下流にある塩基配列の特徴による分解様式の違いによることが考察された。変異の種類によって臨床像の多様性を部分的にも説明できる可能性について、蛋白レベルでの検討を加えた上で、多数例で検討する必要がある。(業績欄)

②患者由来変性視細胞モデルと正常

ボランティア由来の視細胞様細胞における転写産物について、網羅的遺伝子発現解析を行った。変性機序を示唆する複数のパスウェイが抽出され、定量的 RT-PCR による検証を行った。結果は、EYS ノックアウトゼブラフィッシュ網膜についての既報とも一致していた(未発表)。

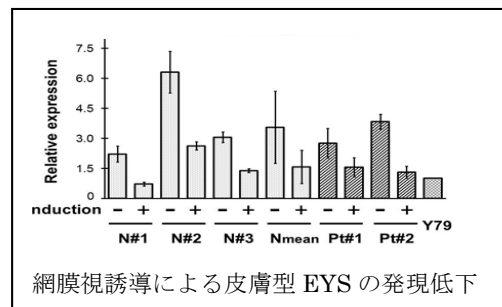


③①の研究を進める過程で、日本人常染色体劣性網膜色素変性の原因として2番目に多い変異である、ナンセンス変異(c. 8805C>A)の部位を含む EYS 遺伝子転写産物が、分化誘導前のデフォルトの皮膚線維芽細胞に多く発現していることが発見された。網膜に特異的に発現するとされてきたEYS遺伝



子は、エクソンの数が44個、mRNAは10Mbと巨大であり、転写産物の調査も必要であると考えた。正常皮膚線維芽細胞に発現するEYSの新規転写産物について全長配列を決定し、さらに、ヒトとゼブラフィッシュにおけるEYS遺伝子転写産物の全長配列の決定も行い、新規転写産物も複数発見された。(業績欄)

ナンセンス変異(c. 8805C>A)の部位は、34番目のエクソンにあるが、これを含み皮膚にも発現するEYS遺伝子転写産物の転写開始点は37番目のエクソン上にあることがこの研究でわかった。長大なEYS遺伝子のうちC末端のみからなる蛋白は、網膜には存在せず、皮膚のみに存在し、N末端側からC末端側までの全長のEYSは網膜のみに存在することがわかった。C末端のみからなる転写産物(皮膚型EYS)の発見につながったエクソン42からエクソン43までのフラグメントは、皮膚線維芽細胞を直接的分化誘導によって誘導視細胞へと誘導することによって発現量が著明に減少することがわかったが、誘導視細胞様細胞においても発現が認められた。このフラグメントは、全長の転写産物とC末端のみからなる転写産物(皮膚型EYS)との両者を検出するものであり、皮膚型EYSのみを検出する方法は現時点で明らかになっていない。この方法が見つかれば、直接的分化誘導によって作製した誘導細胞が、網膜視細胞特異的遺伝子/蛋白を発現する一方で、皮膚の性格も保持し続けるのかどうかを明確にすることができる。将来的に、誘導視細胞の純化を進める際には、この皮膚型EYSも指標のひとつとして使用できる可能性がある。



④転写産物の定量解析では、スモールスケールで行う必要がある。誘導視細胞の定性的発現解析実験では、多数のターゲットについて検討していたが、平成31年度からは検討項目を数種類に絞り、24ウェルプレートを用いた分化誘導を開始した。短期誘導実験によって、このスケールでも定量的な発現解析実験が可能であることがわかった。将来的には、ハイスループットでの薬剤スクリーニングも視野に入れ、さらなるスモールスケール化に取り組んでいく。

⑤疾患モデルの質的検討を行う上で、動物モデルを用いた検証も必要と考えた。平成28年度には、国内では初めて、EYS遺伝子の組換え動物モデル(ゼブラフィッシュ)作製を開始し進行予防法開発に向け体制を整え、平成30年度までにEYSノックアウトゼブラフィッシュが国内で初めて樹立された。国外でも相次いで樹立され表現型が報告され、EYS遺伝子変異によってゼブラフィッシュにおいても網膜変性がみられることが明らかになった(参考文献)。ゼブラフィッシュモデルの研究で明らかになったことは、ヒト皮膚線維芽細胞の直接的分化誘導によって変性視細胞モデルの誘導開始時点からの経時的な観察によって細胞変性としてとらえられていた変化はEYS遺伝子変異の結果としては遅い変化であり、さらに早期にとらえられる変化に注目していく必要があるということである。次の研究としてすでに開始されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takita S, Miyamoto-Matsui K and Seko Y	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Intra- and inter-species comparison of EYS transcripts highlights its characteristics in the eye	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J	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 Seko Y, Iwanami M, Miyamoto-Matsui K, Takita S, Aoi N, Umezawa A, Kato S	4. 巻 9 (1) : 279
2. 論文標題 The manner of decay of genetically defective EYS gene transcripts in photoreceptor-directed fibroblasts derived from retinitis pigmentosa patients depends on the type of mutation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ishii T, Yin C, Seko Y, Umezawa A, Kaneda M	4. 巻 85 (2)
2. 論文標題 Variation in the phenotype of photosensitive cells produced from human fibroblast cell lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Nippon Med Sch	6. 最初と最後の頁 110-116
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 Seko Y, Azuma N, Yokoi T, Kami D, Ishii R, Nishina S, Toyoda M, Shimokawa H, Umezawa A.	4. 巻 0
2. 論文標題 Anteroposterior Patterning of Gene Expression in the Human Infant Sclera: Chondrogenic Potential and Wnt Signaling.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cur Eye Res	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 0	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 Komuta Y, Ishii T, Kaneda M, Ueda Y, Miyamoto K, Toyoda M, Umezawa A, Seko Y	4. 巻 May 11
2. 論文標題 In vitro transdifferentiation of human peripheral blood mononuclear cells to photoreceptor-like cells.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio.016477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.016477	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 2件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takita S and Seko Y
2. 発表標題 Global gene expression analysis of zebrafish eye with digenic eys+/-; lrp5+/- retinitis pigmentosa-candidate mutations
3. 学会等名 XXIII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research – ISER (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takita S, Miyamoto-Matsui K and Seko Y
2. 発表標題 Insights into EYS protein function(s) by deciphering the novel transcripts expressed in human dermal fibroblasts and zebrafish eye
3. 学会等名 ARVO (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seko Y
2. 発表標題 Generation and analysis of induced photoreceptor-like cells from fibroblasts of patients with retinitis pigmentosa
3. 学会等名 Biennial Meeting of the International Society for Eye Research – ISER (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第38回 日本分子生物学会・第88回 日本生化学会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 世古裕子
2. 発表標題 ヒト体細胞から網膜視細胞へのダイレクトリプログラミング
3. 学会等名 感覚器セミナー（招待講演）
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 世古裕子
2. 発表標題 網膜リプログラミング研究の進展
3. 学会等名 第15回再生医療学会総会 シンポジウム10「幹細胞・リプログラミング研究の新展開」（招待講演）
4. 発表年 2016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	梅澤 明弘 (UMEZAWA AKIHIRO) (70213486)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・再生医療センター・副所長/再生医療センター長 (82612)	

6. 研究組織（つづき）

	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	東 範行 (AZUMA NORIYUKI) (10159395)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・感覚器・形態外科部・医長 (82612)	
研究協力者	宮本一松井 潔子 (MIYAMOTO-MATSUI KIYOKO)		
研究協力者	小牟田 縁 (KOMUTA YUKARI)		
研究協力者	瀧田 真平 (TAKITA SHIMPEI)		
研究協力者	ライ ディリップ (RAI DILIP)		
連携研究者	金田 誠 (KANEDA MAKOTO) (30214480)	日本医大・886・20 (32666)	