

令和元年5月16日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11300

研究課題名(和文) フックス角膜内皮変性症の疾患特異的iPS細胞による病態解明

研究課題名(英文) Elucidating the pathogenesis of Fuchs corneal dystrophy using disease iPSCs

研究代表者

榛村 重人 (Shimmura, Shigeto)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：00235780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、いまだに病態の解明がなされていないFuchs角膜内皮変性症の患者に由来する疾患特異的ヒトiPS細胞を樹立し、これを当教室で開発した技術を用いてiPS細胞から角膜内皮細胞への分化誘導を行い、誘導した角膜内皮細胞を用いて小胞体ストレスを中心とした疾患進行のメカニズムを解析し、Fuchs角膜内皮変性症の病態を解明することである。また、得られたin vitro実験系を角膜内皮の小胞体ストレスのモデルとして利用することで、角膜内皮細胞の細胞死メカニズムの解析や、小胞体ストレス抑制の観点から角膜内皮細胞保護作用のある新規因子・薬剤の検索を行うことである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

6人の疾患iPSより、3人の日本人においてTCF4 (rs17089925), (rs17089887), CLU (rs3087554) の3箇所にSNPs変異を認め、1人のオランダ人においてTCF4 (rs613872), (rs2286812)の2箇所にSNPs変異を認めた。角膜内皮誘導の結果、角膜内皮の分化マーカーに関してはオランダ人株でpltx2の発現が低いなど分化抵抗性の傾向をみとめた。小胞体ストレスについて健常人iPS由来角膜内皮細胞(C-CEC)を比較した結果、オランダ人株においても、日本人株においても小胞体ストレスマーカーCHOP, GRP78, XBP1の増加を検出した。

研究成果の概要(英文)： We newly established iPS cells from Fuchs' corneal endothelial dystrophy (FECD) for the investigation of this disease. Three different SNPs were found in the TCF4 gene from our FECD patients. We derived neural crest cells (NCC) from iPSCs and sorted integrin alpha 4 and p75 NTR- double positive cells. We compared the characteristics of C-NCC (control normal donor iPS derived NCC) and F-NCC (FECD patient iPS derived NCC). Real time PCR showed the upregulation of the ER stress marker (CHOP) in F-NCC. Cornea endothelial cells derived from F-NCC also showed the upregulation of CHOP, GRP78 and XBP1 indicating that these cells are ideal for screening of potential new drugs.

研究分野：眼科学

キーワード：フックス角膜変性症 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

いまだに病態の解明がなされていない Fuchs 角膜内皮変性症の患者さんに由来する疾患特異的ヒト iPS 細胞を樹立し、これを角膜内皮細胞に分化誘導させ、Fuchs 角膜内皮変性症の病態解明と新規治療法の開発を目指す

2. 研究の目的

本研究の目的は、いまだに病態の解明がなされていない Fuchs 角膜内皮変性症の患者に由来する疾患特異的ヒト iPS 細胞を樹立し、これを当教室で開発した技術を用いて iPS 細胞から角膜内皮細胞への分化誘導を行い、誘導した角膜内皮細胞を用いて小胞体ストレスを中心とした疾患進行のメカニズムを解析し、Fuchs 角膜内皮変性症の病態を解明することである。また、得られた *in vitro* 実験系を角膜内皮の小胞体ストレスのモデルとして利用することで、角膜内皮細胞の細胞死メカニズムの解析や、小胞体ストレス抑制の観点から角膜内皮細胞保護作用のある新規因子・薬剤の検索を行うことである。

3. 研究の方法

Fuchs 角膜内皮変性症 (FCD: Fuchs corneal dystrophy) は常染色体優性遺伝形式をもち、滴状角膜 (guttata cornea) という特徴的所見を伴い、原発性に角膜内皮が障害され、進行性に内皮細胞数の減少をきたす角膜内皮ジストロフィの一つである。FCD には民族差があり、白人に多く日本では稀とされる。多くの FCD は成人後 (多くは 50 代 ~ 70 代) で発症する late-onset FCD だが、10 歳未満からすでに滴状角膜が発症する early-onset FCD の家系もあり、early-onset FCD に関しては 8 型コラーゲン遺伝子異常が原因であることがわかっている¹⁾。また、一部の late-onset FCD では、SLC4A11 遺伝子異常²⁾等が指摘されている。

他の多くの late-onset FCD の原因遺伝子として最も有力なのは TCF4 である³⁾。TCF4 の SNPs (single-nucleotide polymorphism) が FCD と関連している。角膜内皮のストレスや障害が加わったときに、TCF4 の異常のため創傷治癒機転がきちんと機能しないと考えられている⁴⁾。きっかけとなる角膜内皮のストレスや障害に関しては、活性酸素説⁵⁾や異常タンパク蓄積による小胞体ストレス説が有力である⁶⁾が、いまだに病態の詳細な解明はなされていない。

進行した FCD は水疱性角膜症を生じ視力が著しく低下する。現在のところ視力の回復のためには角膜移植以外に方法がなく、薬物療法等の保存的治療は開発されていない。

FCD の病因解明、治療法開発のためには、患者さん自身の病的角膜内皮組織を用いた研究が最も望ましいが、その入手は倫理的あるいは技術的な問題により非常に困難である。一方、当眼科学教室では、2012 年に神経堤細胞から角膜内皮細胞への分化誘導方法を開発し⁷⁾、さらにこの方法を応用してヒト iPS 細胞から角膜内皮細胞への分化誘導方法をほぼ完成させている。FCD の患者さんに由来するヒト iPS 細胞を樹立することができれば、この方法を用いて FCD の原因遺伝子を有する角膜内皮細胞を誘導することが可能となる。そのため、検体採取において患者さんに強い負担を大きく軽減出来るとともに、生体からの入手が困難な角膜内皮細胞を大量に入手することが可能となり、従来にない観点からの疾患研究が期待できる。さらに、安全で有効な治療基盤の確立のためには、目的とする組織を繰り返し、多量に用いて検討を行う必要があるが、FCD の疾患特異的 iPS 細胞を用いれば、目的とする角膜内皮細胞を繰り返し作成することが可能であり、有効性・安全性を担保するための研究の進展に大きく寄与できることが予測される。これらの基盤技術を有効に活用することにより、疾患原因研究・疾患治療研究において多大な進展が期待され、FCD に苦しんでおられる患者さんにとって大きな福音となることが期待される。本研究では、患者さんの同意のもと、患者さんの血液もしくは皮膚等の体組織試料を採取し、iPS 細胞を樹立し、試験管内で分化誘導や免疫不全マウスへの移植実験を行い、生理学的、病理学的、細胞生物学的特性を解析し、病態解明と新規治療法の開発を試みる。

4. 研究成果

Fuchs 角膜内皮変性症 (FCD: Fuchs corneal dystrophy) は滴状角膜という特徴的所見を伴い、原発性に角膜内皮が障害され、加齢とともに進行性に内皮細胞数の減少をきたし浮腫性の角膜混濁 (水疱性角膜症) をきたす角膜内皮ジストロフィの一つである。病因の詳細は明らかになっていない。遺伝形式は基本的に常染色体優性遺伝形式とされてきたが、近年になってそれ以外の遺伝形式も報告されるようになった。本研究では、疾患患者 6 名から採血を行い、iPS 細胞を樹立し、神経堤細胞 (NCC; Neural Crest Cells) へまず誘導後に、角膜内皮細胞へと分化誘導を行った。その誘導細胞を用いて角膜内皮マーカーの発現を確認し、また病態解明のため小胞体ストレスマーカーの発現を評価した。

遺伝子解析の結果、3 人の日本人において TCF4 (rs17089925), (rs17089887), CLU (rs3087554) の 3 箇所に SNPs 変異を認め、1 人のオランダ人において TCF4 (rs613872), (rs2286812) の 2 箇所に SNPs 変異を認めた。本年は日本人の変異株から角膜内皮を誘導し、分

化状態および疾患表現型の評価を行った。

角膜内皮誘導は既報(Zhao et al, IOVS 2016;57:6878-6884) の培養期間を延長するなど一部改変した方法で行った。角膜内皮の分化マーカーに関してはオランダ人株で pltx2 の発現が低いなど分化抵抗性の傾向をみとめた。いずれの内皮細胞も免疫組織学的検討では ZO1 を染色し、tight junction の形成を確認した。小胞体ストレスの発現の検証においては、TCF4 変異を有する FE CD-iPS 由来角膜内皮細胞(F-CEC)と健常人 iPS 由来角膜内皮細胞(C-CEC)を比較した real time PCR 解析から、F-CEC においてオランダ人株においても、日本人株においても小胞体ストレスマーカーCHOP, GRP78, XBP1 の増加を検出した。これらに関して real time PCR 法を追試し、F-CEC では C-CEC と比較し、C HOP は約 15 倍の発現増加を認め(p<0.01)。さらに疾患表現型に関連する CLU 分子の発現はいずれも疾患株で上昇していた。疾患表現型をレスキューするドラッグスクリーニングに現在着手している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Yamazaki R, Fusaki N, Hatou S, Miyashita H, Inagaki E, Tsubota K, Okano H, Shimmura S. Upregulation of endoplasmic reticulum stress (ER stress) in human iPSC derived neural crest cells from patients with Fuchs' endothelial corneal dystrophy. ISSCR 2017, 2017/6/14-17
2. Yamazaki R, Fusaki N, Hatou S, Miyashita H, Inagaki E, Tsubota K, Okano H, Shimmura S. Upregulation of endoplasmic reticulum stress (ER stress) in human iPSC derived corneal endothelial cells from patients with Fuchs' endothelial corneal dystrophy. Cornea and Ocular Surface Biology and Pathology Gordon Research Conferences, Ventura Beach Marriott in Ventura, 2018/2/18-23
3. 山崎梨沙, 房木ノエミ, 羽藤晋, 稲垣絵海, 宮下英之, 吉田悟, 坪田一男, 榛村重人. Fuchs 角膜内皮変性症患者由来 iPSC 細胞を用いた小胞体ストレスの病態関与の検討. 角膜カンファランス 2017, 2017/2/16-2/18.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：房木 ノエミ

ローマ字氏名：FUSAKI, Noemi
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部
職名：特任准教授
研究者番号(8桁)：40278635

研究分担者氏名：羽藤 晋
ローマ字氏名：HATOU, Shin
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部
職名：特任講師
研究者番号(8桁)：70327542

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。