

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06820

研究課題名(和文) 網膜色素変性患者由来iPS細胞を利用した新規治療開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment for retinitis pigmentosa using patient-derived iPS cells

研究代表者

大石 明生(Oishi, Akio)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：50572955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：EYS遺伝子のc.8805C>A変異をhomozygousに持つ網膜色素変性患者3名をリクルートし、同意を得てたうえで末梢血を採取、プラスミドを用いた遺伝子導入でiPS細胞を樹立した。これらの細胞株、また正常のiPS細胞株を分化誘導し、視細胞のマーカとなる遺伝子群の発現に伴って、EYS遺伝子の発現レベルが上昇することを確認した。薬剤の効果につき引き続き検討中である。また当該疾患の原因遺伝子変異と表現型の関連を検討する過程で、非典型的な網膜所見を呈す症例の特徴、および環境因子、特に喫煙による表現型の修飾について新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、網膜色素変性の原因として本邦で特に頻度の高い変異をもつiPS細胞を樹立した。本細胞株は理研BRCに寄託しており、他の研究者も自由に使用することが出来るため更なる発展につながる可能性がある。また本研究で得られた環境因子(喫煙)による病態の修飾という知見については、直ちに臨床に還元することも可能なものであり、確立した治療法のない本疾患にとって重要なものになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We established disease-specific iPS cells from retinitis pigmentosa patients with homozygous EYS c.8805C>A mutations. These cells will be available through Riken BioResource Center after a certain period. Two-dimensional retina-like cell culture was established from these iPS cells. Candidate drugs are screened for their potential to modulate expression of EYS mRNA and protein. In addition, while we reviewed genotype-phenotype correlations in patients with retinitis pigmentosa, we found that environmental factors such as tobacco smoking may affect clinical course.

研究分野：眼科

キーワード：網膜色素変性 疾患特異的iPS細胞 stop codon readthrough 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は遺伝性、進行性に網膜、特に視細胞が障害される疾患である。本疾患は日本の視覚障害の原因の第三位を占めており(最新の統計では二位になっている)その治療法の開発は公衆衛生上重要な課題である。本疾患に対してはこれまで神経細胞保護治療や、幹細胞移植など様々な治療戦略が研究されているが、いまだ罹患者全員が対象となるような治療法は確立されていない。その理由の一つに本疾患は90以上の原因遺伝子が報告されるなど、遺伝的に多様であることがあげられる。これまで行われてきた神経細胞保護治療についても原因遺伝子が違えば、おそらく治療効果にも差があり、対象者全体としてみると治療効果が検出できないという可能性がある。原因遺伝子を特定したうえで、治療効果をみることで、より正確な結果が得られる可能性がある。

また近年、特定の遺伝子変異に対しては遺伝子治療が実現しつつある。これを適応するためにも、個々の症例で原因となっている遺伝子変異を確定することが必須である。ここでもより多くの症例で正確な遺伝子診断を行うことの重要性が確認される。

一般的に遺伝子治療と言った場合、欠損する遺伝子の補充という戦略が用いられることがほとんどであり、最近欧米で認可されたものもこの原理を用いている。一方このような一つの遺伝子の治療では、全体のうちごく一部の症例しか対象とならない、また原因遺伝子によっては遺伝子自体が大きすぎてベクターに搭載することができない、また正常のコピーを補うだけではgain of functionの変異には対応が難しい、という限界がある。

そこで我々はstop codon read throughと呼ばれる機序に注目した。メッセンジャーRNAの本来の終端より上流にstop codonを生じさせるような変異はpremature termination変異と呼ばれる。このような変異は途中で途切れた活性のない(低い)タンパクを生じるか、またはこのような変異を含むメッセンジャーRNAがnonsense mediated decayにより分解されることで、タンパクの発現をまったくなくしてしまう。Stop codon readthroughという現象は、変異によりpremature termination codonが生じた箇所に他のアミノ酸を割り当てることで翻訳が継続するというものである。(例:UAA、UAGはstop codonであるが、これをUAUまたはUACと誤認するとチロシンとなり、翻訳が継続される。)この現象は通常でも1%未満の低い確率で生じているが、特定の薬剤によりその頻度を高めることが出来る。遺伝性疾患の原因となる変異のうち約11%はpremature termination変異と推定されているので、この作用を制御できれば、原因遺伝子によらず多くの症例を対象とした治療につながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、上記の背景を踏まえ、

より多くの遺伝性網膜変性疾患症例の原因遺伝子を特定すること

変異と表現型の関係を調べることで、介入を考える際にどのような症例でどのようなタイミングで行うべきかの基礎的なデータを得ること

これまでの遺伝子検査で診断が確定した変異のうち、終止変異を持つ症例から疾患特異的iPS細胞を樹立し、stop codon readthrough作用のある複数の化合物、特にPTC124による効果を検証すること

Stop codon readthroughの効果については、平行して動物モデルも用いて検証すること

を目的とした。

3. 研究の方法

・遺伝子診断

網膜色素変性およびその類縁疾患の症例について同意を得たうえで末梢血を採取し、DNAを抽出、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析を行ったのち、正常データベースでの変異の頻度やinsilicoprediction toolなどにより、出来るだけ多くの症例で遺伝子診断を確定する。患者家族についても可能な限り採血や唾液採取によりDNAを採取し結果の確認に用いる。

遺伝子診断が確定した症例での臨床像と遺伝子変異を照合することで、変異と表現型の関係について検討を行う。これらの結果については人種による差を検討することも含め、他国の研究者とも連携して検討を行う。

・疾患特異的iPS細胞

過去の研究で原因遺伝子が確定した網膜色素変性患者のうち、特にEYS遺伝子のc.8805C>A変異を持つ患者を対象に、説明を行ったうえで同意書を取得し、末梢血を採取する。末梢血から単核球を抽出して、プラスミドを用いOCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYCを導入し疾患特異的iPS細胞を樹立する。これを既報の方法で培養することで、網膜様組織に分化させる。個体差や細胞株の違いを確認するため、複数の株を樹立し、分化誘導を行う。

樹立した網膜様組織に対し候補化合物を投与、タンパクの発現に与える影響を検討する。安全性の点から PTC124 が第一候補であるが、gentamicin, amikacin, kanamycin, neomycin, negamycin, spiramycin, josamycin, tylosin など stop codon readthrough 作用を持つ他の薬剤も効果の比較のため検討対象とする。候補薬剤を様々な濃度で一週間（または二週間）投与したのちウエスタンブロッティングでタンパクの発現量を半定量的に測定し対照群と比較する。Stop codon の下流にあたる exon の mRNA の量もリアルタイム RT-PCR で測定する。また毒性の評価のため、生/死細胞をそれぞれ染色しフローサイトメトリーで計数する。

・動物モデル

pde6b 遺伝子 exon7 にナンセンス変異をもつ rd1 系統のマウスを用い、硝子体注射で PTC124 を投与し用量依存性、および経口投与との効果の差を検討する。効果の評価には *pde6b* タンパクのウエスタンブロッティングと、mRNA のリアルタイム RT-PCR を用いる。毒性評価には野生型のマウスも用い、網膜電図、組織切片での各細胞層の厚み、TUNEL 染色などによって判定する。

4 . 研究成果

・遺伝子診断

550 人の網膜色素変性患者に全ゲノム解析を行い、254 人で遺伝子診断を確定することが出来た。原因遺伝子としてとくに多かったのはこれまでの研究と同様に *EYS*, *USH2A*, *RPGR* であり、*PDE6B*, *CNGA1*, *RP1*, *SNRNP200*, *PRPF8* がこれに続く結果であった。(図 1)

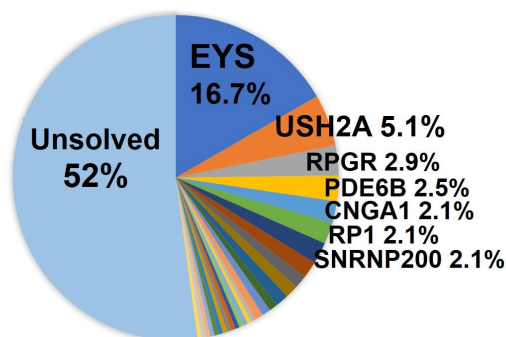


図 1
網膜色素変性症例の遺伝子診断の結果
既報と同様 *EYS*, *USH2A* の比率が比較的高いが、それ以外では多数の遺伝子がそれぞれ数%ずつの症例で原因となっている。

なお診断が確定した中には今回の疾患特異的 iPS 細胞での検討対象である *EYS* c.8805c>a 変異を有する患者が 20 人以上含まれていた。また診断が確定した症例のほかにも、正常者では極めて頻度の低いバリエーションを持つ症例を多数認めており、その病原性について評価を進めている。また本疾患について多くの症例を持つドイツのグループと共同研究を行い、*CNGB1* 変異による網膜色素変性ではしばしば嗅覚障害を伴うことや、遺伝子診断が確定しない症例は臨床的にも非典型的な検査所見や自己免疫疾患の合併など通常と異なった特徴を有する率が高いことを報告した。

さらに表現型に関する検討で、一部の症例では視機能低下が網膜画像検査で評価した視細胞死に先行していることを見出した。(図 2)これは介入の対象やタイミングを考えるうえで、重要な知見になるものと思われた。

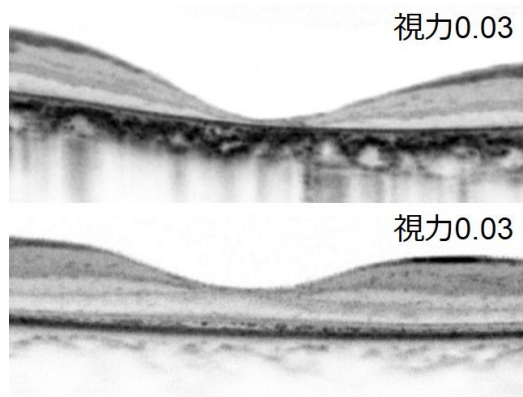


図 2
遺伝性網膜変性疾患の網膜断層像と視力
どちらの症例も視力は 0.03 と不良だが、下の症例では中心窩の外顆粒層厚が比較的保たれており、視細胞の機能障害があるものの、細胞死はまだ生じていないことが示唆される。

また環境因子として喫煙が症状の悪化に寄与している可能性を見出し報告した。このことは現実的な介入手段の確立につながることを期待された。

・疾患特異的 iPS 細胞

EYS 遺伝子に c.8805C>A の変異を homozygous に有する患者 3 名から同意を得て、疾患特異的 iPS 細胞株を樹立した。正常の iPS 細胞株およびこの疾患特異的 iPS 細胞株を網膜様組織に分化誘導した。(図 3)

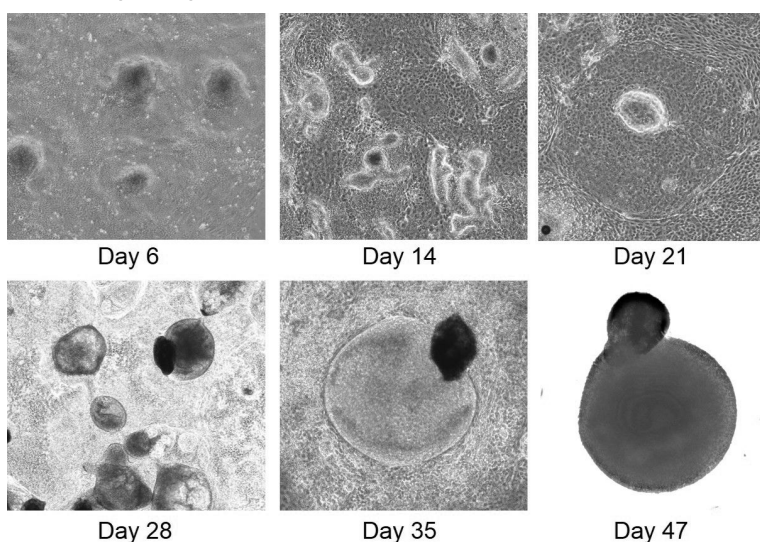


図 3

iPS 細胞からの網膜様細胞の分化誘導

培養 28 日目頃から色素上皮様の細胞が現れ、その後神経網膜のマーカを発現する細胞の分化が確認できた。

分化した組織では iPS 細胞の状態ではほぼ発現のない *PAX6*, *CHX10*, *CRX*, *リカバリン*, *ロドプシン* など視細胞のマーカとなる遺伝子の発現を確認した。*EYS* 遺伝子についても分化誘導開始 2 週間前後で発現が確認できた。RT-PCR で mRNA の発現量の変動を調べたが、c.8805C>A の変異では nonsense mediated decay が起こらないことが他のグループからも報告されつつあり、(Seko et al. Stem Cell Res Ther 2018) 変異株と正常株の差は確認できていない。ウェスタンブロッティングによるタンパクの定量も試みたが、よい抗体がないためか安定した結果が得られていない。変異の影響と介入の効果については、光照射ストレスによる細胞死など他の条件も含め検討中である。

・動物モデル

rd1 マウスによる実験では PTC124 投与により *pde6b* 遺伝子およびタンパクの発現上昇が確認できた一方、発現上昇の幅は最大でも 1 割程度と予想よりその効果は小さく、網膜の機能や形態のうえでは明らかな変化を認めなかった。投与量や投与時期、他の薬剤や他の系の動物を用いることを検討中である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Miyata M, Oishi A, Hasegawa T, Ishihara K, Oishi M, Ogino K, Sugahara M, Hirashima T, Hata M, Yoshikawa M, Tsujikawa A. Choriocapillaris flow deficit in Bietti crystalline dystrophy detected using optical coherence tomography angiography. Br J Ophthalmol. 2018;102(9):1208-1212.

Charbel Issa P, Reuter P, Kuhlwein L, Birtel J, Gliem M, Tropitzsch A, Whitcroft KL, Bolz HJ, Ishihara K, MacLaren RE, Downes SM, Oishi A, Zrenner E, Kohl S, Hummel T. Olfactory dysfunction in patients with CNGB1-associated retinitis pigmentosa. JAMA Ophthalmol 2018;136:761-769

Oishi A, Oishi M, Miyata M, Hirashima T, Hasegawa T, Numa S, Tsujikawa A. Multimodal imaging for differential diagnosis of Bietti crystalline dystrophy. Ophthalmology Retina 2018, 1071-1077

Miyata M, Oishi A, Ogino K, Oishi M, Hasegawa T, Nagasaki Y, Ikeda HO, Ohtsuki H, Tsujikawa A. Relationship between ocular deviation and visual function in retinitis pigmentosa. Sci Rep. 2018;8(1):14880.

Gattoussi S, Buitendijk GHS, Peto T, Leung I, Schmitz-Valckenberg S, Oishi A, Wolf S, Deák G, Delcourt C, Klaver CCW, Korobelnik JF; European Eye Epidemiology (E3) consortium. The European Eye Epidemiology spectral-domain optical coherence tomography classification of macular diseases for epidemiological studies. Acta Ophthalmol. 2018 in press

Miyata M, Oishi A, Hasegawa T, Oishi M, Numa S, Otsuka Y, Uji A, Kadomoto S, Hata M, Ikeda HO, Tsujikawa A. Concentric choriocapillaris flow deficits in retinitis pigmentosa detected using wide-angle swept-source optical coherence tomography angiography. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2019;60(4):1044-1049

Otsuka Y, Oishi A, Suda K, Tsujikawa A, Kurakazu T. Multiple subretinal fluid blebs after pars plana vitrectomy for rhegmatogenous retinal detachment repair. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2019 in press
Nishikawa K, Oishi A, Hata M, Miyake M, Ooto S, Yamashiro K, Miyata M, Tamura H, Ueda-Arakawa N, Takahashi A, Kawashima Y, Tsujikawa A. Four-Year Outcome of Aflibercept for Neovascular Age-Related Macular Degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. Sci Rep. 2019;9(1):3620.
Birtel J, Gliem M, Oishi A, Muller PL, Herrmann P, Holz FG, Mangold E, Knapp M, Bolz HJ, Charbel Issa P. Genetic testing in patients with retinitis pigmentosa: Features of unsolved cases. Clin Exp Ophthalmol 2019 in press
Oishi A, Miyata M, Numa S, Otsuka Y, Oishi M, Tsujikawa A. Wide-field fundus autofluorescence imaging in patients with hereditary retinal degeneration: A Literature Review. Int J Retina Vitreous 2019 in press

〔学会発表〕(計 10 件)

大石明生、荻野顕、宮田学、石原健司、大石真秀、長谷川智子、沼尚吾、辻川明孝 小口病考 京都眼科学会 京都 2017/6/4
大石明生 網膜橋渡し研究 update 遺伝子治療(インストラクションコース) 日本臨床眼科学会 東京 2017/10/12
大石明生 網膜色素変性はいつまで単一疾患か? 日本臨床眼科学会 東京 2017/10/13
野田和誉、大石明生、宮田学、長谷川智子、大石真秀、沼尚吾、辻川明孝 網膜色素変性患者の視機能に対する喫煙の影響 日本網膜硝子体学会 東京 2017/12/3
西川慶一、大石明生、大音壮太郎、山城健児、宮田学、田村寛、上田奈央子、畑匡侑、若園知尊、高橋綾子、川島祐、辻川明孝 滲出型加齢黄斑変性に対する実臨床でのアフリベルセプト硝子体内投与4年成績 日本網膜硝子体学会 東京 2017/12/3
大石明生、石原健司、辻川明孝、Johannes Birtel, Peter Charbel Issa CNGB1 変異による嗅覚障害を伴う症候性網膜色素変性 日本眼科学会総会 東京 2018/4/20
Akio Oishi, Maho Oishi, Manabu Miyata, Takako Hirashima, Tomoko Hasegawa, Shogo Numa, Akitaka Tsujikawa Multimodal imaging for differential diagnosis of Bietti crystalline dystrophy EURETINA Wien 2018/9/22
Akio Oishi, Kazunori Noda, Johannes Birtel, Masahiro Miyake, Maho Oishi, Manabu Miyata, Tomoko Hasegawa, Shogo Numa, Peter Charbel Issa, Akitaka Tsujikawa Detrimental effect of smoking on retinitis pigmentosa EURETINA Wien 2018/9/22
谷垣裕子、大石明生、宮田学、長谷川智子、大石真秀、沼尚吾、大塚悠生、辻川明孝 錐体機能不全による視機能障害が疑われる網膜変性疾患の症例群 日本臨床眼科学会 東京 2018/10/12
大石明生 網膜橋渡し研究 update 遺伝子治療(インストラクションコース) 日本臨床眼科学会 東京 2018/10/12

〔図書〕(計 2 件)

大石明生 網膜変性疾患における OCT の活用 OCULISTA 全日本病院出版会 2018, 85-89
大石明生 特集マルチモーダルイメージング ジストロフィ 先端医学社 Retina Medicine 2019;8:49-54

〔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

<http://www.opthalmol.kuhp.kyoto-u.ac.jp/research/rp.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：宮田学、沼尚吾、大塚悠生

ローマ字氏名：Manabu Miyata, Shogo Numa, Yuki Otsuka

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。