

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11466

研究課題名(和文)3次元組織培養によるiPS細胞を用いた網膜色素変性症の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)To explore the pathogenesis of retinitis pigmentosa using the organoid system of a patient-derived iPS cells

研究代表者

篠田 肇 (Shinoda, Hajime)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：30306766

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)：本研究では、患者の遺伝子変異を保持したiPSCを、3次元構造を持つ網膜組織オルガノイドに分化誘導し、病態解析を行った。これを用いて網膜色素変性の病態を解析し、メカニズムに介入する事で新規治療法の開発につなげるための解析を進めた。実際には、視細胞に分化誘導すると蛍光を発するレポーターを、患者由来iPS細胞に導入しておき、分化誘導して得られた視細胞の蛍光を指標とし、フローサイトメトリーにより回収した。そして、回収した網膜視細胞のサンプルを用いて、リアルタイムPCRなどを用いて病態に関連しうる分子の発現を明らかにした。主に小胞体ストレスに関する分子の動きに着目して解析し、治療開発に向けた研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性は進行性の視野欠損を呈する疾患であり、最終的には失明に至りうる。日本でも世界でも4000-8000人に1人が発症し、国内失明原因の第3位である。本疾患は遺伝子異常が原因であり、有効な治療法は国内・海外共に確立されていない。早期発見をされた症例でも、特別な進行予防法がないまま、経過観察されるのが通常である。近年では疾患iPS研究などにより研究への機運は上がってきたが、未だ実現可能な治療法は報告されていない。そこで、本疾患のメカニズムを解析し、新規治療法の開発に向けた研究はアンメットニーズに答えることにつながり学術的のみならず社会的に重要である。

研究成果の概要(英文)：The iPS cells generated from somatic cells of a patient with retinitis pigmentosa and a control were differentiated into three dimensional organoid culture to analyze the pathogenesis and to explore therapeutic approaches in the future. The organoid derived from the patient preserved the mutation. To analyze the photoreceptors, reporter gene which expresses fluorescence after differentiation was induced in the iPS cells, then the fluorescence positive cells were collected by flowcytometry to use the samples for real time PCR analyses. In particular, endoplasmic reticulum stress was analyzed for the future development of the therapeutic approach.

研究分野：網膜研究

キーワード：網膜色素変性症 iPSC細胞 3次元培養

1. 研究開始当初の背景

【網膜色素変性の現状】

網膜色素変性は日本でも世界でも 4000-8000 人に 1 人と、遺伝性疾患としては比較的多数の者が発症し、進行性の視野障害を呈する疾患である。両眼共にほぼ同時に進行し、最終的には両眼の失明に至る、国内失明原因の第 3 位の疾患である(図 1)。現代は高齢化社会であることから、今後はさらに患者数が増えると予想される。本疾患は遺伝子異常が原因であり、有効な治療法は国内・海外共に確立されていない。早期発見をされた症例でも、特別な進行予防法がないまま、経過観察されるのが通常である。近年では疾患 iPS 研究などにより研究への機運は上がってきたが、未だ実現可能な治療法は報告されていない。

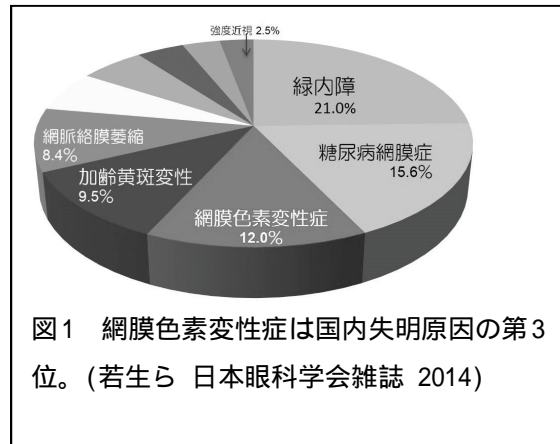


図1 網膜色素変性症は国内失明原因の第3位。(若生ら 日本眼科学会雑誌 2014)

【網膜色素変性の研究におけるハードル】

網膜色素変性は古くから知られる疾患であるが、その病態研究は進んでいない。その一因は網膜サンプルが得られないことである。生体から網膜を採取することは視野欠損を作ることになり、倫理的に許されず、海外アイバンクや剖検眼からの採取が可能でも、網膜細胞は増殖しないため、研究に必要な細胞数を確保することは不可能に近い。

【人工的多能性幹細胞を用いた疾患研究】

人工的多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPSC)は、2006年に山中らが報告した体細胞を元に樹立した多能性幹細胞である(Takahashi, Yamanaka Cell 2006)。遺伝子情報を保持したまま、三胚葉すべての細胞に分化誘導しうることが知られ、「疾患 iPS 研究」と呼ばれる研究手法が、近年盛んに行なわれるようになってきた(図 2)。患者 体細胞由来の iPSC に対して適切な分化誘導法を用いれば、遺伝子変異を保持した状態で、研究対象となる臓器・組織の細胞を培養により得られ、そのサンプルを用いて病態解明をするとともに薬剤スクリーニングを行う研究が可能となった。

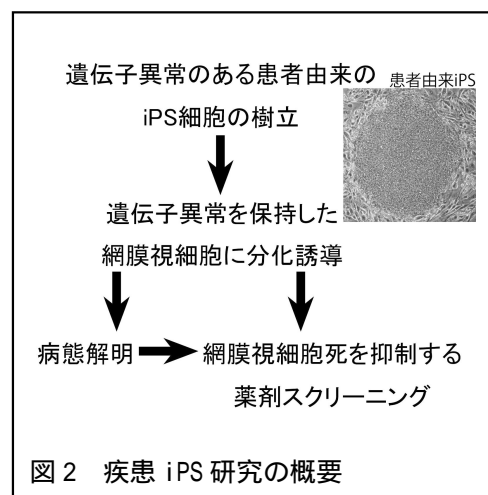


図2 疾患 iPS 研究の概要

【3次元培養による網膜細胞の分化誘導法】

網膜細胞の分化誘導法にはいくつかの方法が報告され、初期には単層培養が複数報告されたが、近年 3次元培養が開発された。網膜神経細胞は 6 種類のニューロンと 1 種類のグリアから成るが、3次元培養においては、これらの細胞が生体内の組織と類似の 3次元構造を形成しており、生体網膜の微小環境を模倣できる。単層培養より優れた病態解析モデルである。

先行研究として、単層培養を用いたロドプシン変異(E181K)を持つ網膜色素変性の疾患 iPS 研究を行った(Yoshida, Ozawa, Okano et al. Mol Brain 2014)。ロドプシンは視物質の一つで桿体視細胞の代表的機能タンパクであり、その変異は網膜色素変性の中でも大きな割合を占める。

そこで得られた結果では、小胞体ストレスとアポトーシスのマーカーの一部が変動し、ラパマイシンや AMP-related protein kinase (AMPK) 活性化剤といった小胞体ストレスを抑制する試薬を添加すると視細胞の生存は延長した。しかし、小胞体ストレスでは様々な細胞内イベントが起こりうるということが知られ(Lin et al. Nature Neurosci 2009) (図 3)、脳の神経変性であるアルツハイマー病で治療標的として検討される小胞体関連分解(endoplasmic reticulum-associated degradation; ERAD) (Kaneko et al. J Pharmacol Sci 2012)等の機構も治療標的となる可能性がある。

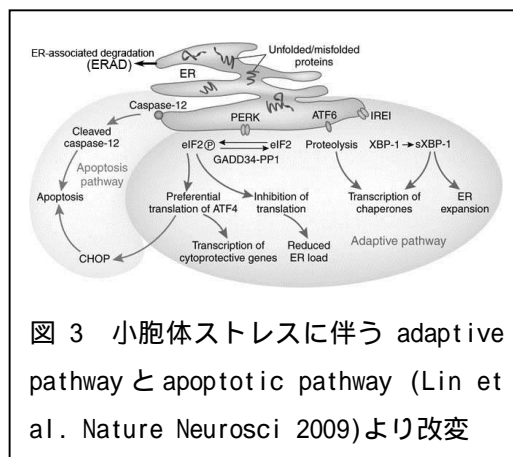


図 3 小胞体ストレスに伴う adaptive pathway と apoptotic pathway (Lin et al. Nature Neurosci 2009)より改変

ERAD) (Kaneko et al. J Pharmacol Sci 2012)等の機構も治療標的となる可能性がある。ヒト新規治療法の開発のためには先行研究の結果だけでは情報量不足で更に研究を進める必要があると考えた。

2 . 研究の目的

網膜色素変性は、中年で発症し徐々に進行して失明に至る遺伝性疾患であり、国内失明原因の第3位である。有病率は1:4000-8000人と比較的高いが、これまでに確立された治療法はない。そこで、本研究では、患者の体細胞から樹立した人工的多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPSC)を用いて網膜3次元培養を行い、網膜色素変性の病態を解析した。この方法では、患者の遺伝子変異を保持した iPSC 由来の網膜細胞を、3次元構造により網膜の微小環境を模倣した状態で分化誘導することが可能であり、疾患病態の研究に適している。これを用いて網膜色素変性の病態を解析すると共に、そのメカニズムに介入することで世界初の新規治療法の開発につなげることにした。

3 . 研究の方法

【方法1】分化誘導した際に網膜組織の中でも桿体視細胞を選択的に標識するコンストラクトを iPSC 細胞株に導入した。

桿体視細胞のマーカーである Nr1 遺伝子のプロモーター支配下に GFP の蛍光を発するコンストラクトを作製した。このコンストラクトは米国 NIH の Anand Swaroop 博士より供与されたコンストラクトをもとに作製した。これを、患者由来およびコントロールに用いる 201B7 iPSC 細胞株にノックイン (Homma K et al., Genes Cells. 2017)により導入して stable cell line を作製した。標識コンストラクト導入済みの iPSC 細胞株を用いて研究すれば、効率よく病態解明や治療効果の解析をすることにつながる。今後は、この標識コンストラクト導入済みの iPSC 細胞株を用いて研究した。

【方法 2】標識コンストラクト導入済みの iPS 細胞株を 3 次元培養により分化誘導した。

患者由来およびコントロールの標識済み iPS 細胞株を分化誘導し、3 次元網膜組織を作製した。理化学研究所、笹井芳樹チームリーダーらがマウスおよびヒト ES 細胞から神経組織である網膜の 3 次元培養による分化誘導に成功した報告(Eiraku et al., Nature 2011, Nakano et al., Cell Stem Cell 2012)をもとに、申請者らの改良を加えて作製した。

【方法 3】分化誘導した 3 次元網膜組織において標識のために導入したコンストラクトが発現するかどうかを解析した。

まず、分化誘導した 3 次元網膜組織を GFP の蛍光を発するかどうかにライブ観察した。そして、その切片を作製し、ロドプシンと GFP を共染色した。また、GFP 陽性細胞を選択するためのフローサイトメトリーを行った。

【方法 4】分化誘導した 3 次元網膜組織において回収した標識細胞における ER ストレスマーカーの PCR を行った。

方法 3 で回収した標識細胞が視細胞であることをロドプシンマーカーで確認するとともに ER ストレスマーカーである BiP, CHOP といった分子のリアルタイム PCR を行った。

4 . 研究成果

分化誘導した際に網膜組織の中で桿体視細胞を標識するコンストラクトを iPS 細胞株に導入したことは、PCR により確認され、3 次元網膜組織培養には成功し、組織学的手法により標識に用いた GFP を桿体視細胞で発現させることに成功した。また、GFP を指標とした選択的視細胞の回収のためのフローサイトメトリーを行い、PCR を試みた。

今回の研究では、GFP を指標にフローサイトメトリーで回収した桿体視細胞の細胞数が少なかったことから、マーカーの PCR の結果はさらに確認が必要であるが、研究手法として利用することが示された。この手法はほかの変異を持つ網膜色素変性の iPS 細胞を用いた解析にも使えるばかりか、ほかの分野にも応用可能であり、今後の国内外の科学の発展に寄与するといえる。また、さらに改良を加えることで、研究成果を確実に期待できる第一歩となったといえた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hayashi Isami, Shinoda Hajime, Nagai Norihiro, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 98
2. 論文標題 Retinal inflammation diagnosed as an idiopathic macular hole with multiple recurrences and spontaneous closures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicine(Baltimore)	6. 最初と最後の頁 e14230 ~ e14230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000014230	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 Iyama Chigusa, Shigeno Yuta, Hirano Eri, Kamoshita Mamoru, Nagai Norihiro, Suzuki Misa, Minami Sakiko, Kurihara Toshihide, Sonobe Hideki, Watanabe Kazuhiro, Shinoda Hajime, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 9
2. 論文標題 QD laser eyewear as a visual field aid in a visual field defect model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-018-37744-8	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 Kawashima Hirohiko, Nagai Norihiro, Shinoda Hajime, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 97
2. 論文標題 Optic neuropathy causing vertical unilateral hemianopsia after pars plana vitrectomy for a macular hole	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicine(Baltimore)	6. 最初と最後の頁 e0321 ~ e0321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000010321	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 Nagai N, Ibuki M, Shinoda H, Kameyama K, Tsubota K, Ozawa Y.	4. 巻 96
2. 論文標題 Maculopapular rash after intravitreal injection of an anti-vascular endothelial growth factor, aflibercept, for treating age-related macular degeneration: A case report.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore)	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) 10.1097/MD.0000000000006965.	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 Minami S, Nagai N, Suzuki M, Kurihara T, Sonobe H, Kamoshita M, Uchida A, Shinoda H, Takagi H, Sonoda S, Sakamoto T, Tsubota K, Ozawa Y	4. 巻 8
2. 論文標題 Benefits of aflibercept treatment for age-related macular degeneration patients with good best-corrected visual acuity at baseline.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	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) 10.1038/s41598-017-18255-4.	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 Ozawa Y, Shigeno Y, Nagai N, Suzuki M, Kurihara T, Minami S, Hirano E, Shinoda H, Kobayashi S, Tsubota K.	4. 巻 17
2. 論文標題 Absolute and estimated values of macular pigment optical density in young and aged Asian participants with or without age-related macular degeneration.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 161-166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12886-017-0557-5.	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Minami S, Shigeno Y, Shinoda H, Nagai N, Kurihara T, Kamoshita M, Watanabe K, Sonobe H, Hidaka Y, Tsubota K, Ozawa Y.
2. 発表標題 Predictive factors for better short-term outcome in idiopathic epiretinal membrane after pars plana vitrectomy
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木美砂、永井紀博、南早紀子、園部秀樹、鴨下衛、渡邊一弘、栗原俊英、篠田肇、坪田一男、小沢洋子
2. 発表標題 視力良好例の網膜中心静脈分枝閉塞症に伴う黄斑浮腫に対するラニズマブ投与の検討.
3. 学会等名 第57回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 南早紀子, 永井紀博, 鈴木美砂, 栗原俊英, 内田敦郎, 鴨下衛, 園部秀樹, 篠田肇, 園田祥三, 坂本泰二, 坪田一男, 小沢洋子.
2. 発表標題 視力良好な滲出型加齢黄斑変性におけるアフリベルセプト硝子体内注射の脈絡膜の解析.
3. 学会等名 第121回日本眼科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永井紀博, 鈴木美砂, 南早紀子, 栗原俊英, 鴨下衛, 篠田肇, 坪田一男, 小沢洋子.
2. 発表標題 糖尿病黄斑浮腫の嚢胞反射強度とラニビズマブ硝子体内注射後の網膜外層変化.
3. 学会等名 第121回日本眼科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木美砂, 永井紀博, 栗原俊英, 南早紀子, 鴨下衛, 園部秀樹, 内田敦郎, 篠田肇, 坪田一男.
2. 発表標題 網膜中心静脈分枝閉塞症の黄斑浮腫に対するラニビズマブ投与後の視力と再発予測因子
3. 学会等名 第71回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永井紀博, 鈴木美砂, 南早紀子, 栗原俊英, 篠田肇, 坪田一男, 小沢洋子.
2. 発表標題 健常者の黄斑色素密度とOCT所見の相関.
3. 学会等名 第71回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 南早紀子, 永井紀博, 鈴木美砂, 栗原俊英, 鴨下衛, 園部秀樹, 篠田肇, 坪田一男, 小沢洋子.
2. 発表標題 日本人健常者のEvokeDx網膜電図所見.
3. 学会等名 第71回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2017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	小澤 洋子 (Ozawa Yoko) (90265885)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	