

令和 3 年 8 月 18 日現在

機関番号：15301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K09410
研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた網膜における長寿遺伝子の機能解明：加齢黄斑変性の予防戦略

研究課題名(英文) Investigation of the role of longevity genes in the retina using genome editing technology

研究代表者
森實 祐基 (Morizane, Yuki)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50432646
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性は加齢による網膜色素上皮細胞(RPE)の機能低下(老化)を背景に発症する。本研究ではRPEの機能に関連すると考えられる遺伝子の中で、サーチュイン(SIRT)と、RPEにおけるカリウムチャネルの一つであるKCNJ13を対象とし、これらがRPEの機能に及ぼす影響をゲノム編集技術を用いて明らかにすることを目的とした。SIRTについてはゲノム編集には成功したが、iPS-RPEへの分化誘導を行うことができなかった。KCNJ13遺伝子については、KCNJ13遺伝子が、iPS-RPEの配列や細胞死の誘導に機能していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
網膜色素上皮細胞におけるKCNJ13遺伝子の役割をゲノム編集によって得たiPS-RPEを用いて解明した。網膜色素上皮細胞はタイトジャンクションを形成し血液眼関門の機能を有することから、KCNJ13遺伝子の異常が様々な網膜疾患の病態に関与している可能性が示唆された。今後、本研究の成果を基盤としてKCNJ13遺伝子の機能がさらに解明されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Age-related macular degeneration (AMD) is an intractable ocular disease that leads to blindness, and the number of patients with AMD is expected to increase rapidly. In this study, we targeted sirtuins (SIRT) and KCNJ13, one of the potassium channels in RPE, among the genes thought to be related to the function of RPE, and aimed to clarify the effects of these genes on the function of RPE using genome editing technology. As for KCNJ13 gene, we found that the KCNJ13 gene in iPS-RPE is regulated by genome editing, but not by genome editing. Since the RPE is essentially a monolayer epithelial cell that forms tight junctions and functions as a blood-eye barrier, the deletion of the KCNJ13 gene may affect other RPE and retinal functions. Therefore, the deletion of the KCNJ13 gene may affect other RPE and retinal functions, and may be involved in the pathogenesis of AMD.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(Age-related macular degeneration,以下 AMD)は失明に至る難治性の眼疾患であり、本邦の高齢者の視覚障害の原因の第2位であり、今後患者数が急増すると考えられている。AMDは加齢による網膜色素上皮細胞(以下 RPE)の機能低下(老化)を背景に、網膜に病的な血管新生が起こり、視力が低下する。現在、AMDに対して抗 VEGF 抗体の投与が行われているが、視力の回復は難しく患者の期待に真にこたえる治療法ではない。研究者らのグループは、抗 VEGF 抗体治療の経験(3000例/年)から、AMDは予防が極めて重要であり、加齢による RPEの機能低下を未然に防ぐ方法の開発が必要であると考えた。

近年、ゲノム編集技術が進歩し、細胞や動物における遺伝子の機能を高い精度で解析することが可能になっている。ゲノム編集技術では、CRISPR/Cas9等のヌクレアーゼを用いて、目的とする遺伝子のノックアウトや発現制御を行う。この技術によって、これまで手間と時間を要した遺伝子改変細胞や遺伝子改変動物(マウス、ゼブラフィッシュ)の作成を簡便に短時間でできるようになった。

研究者らのグループはこれまでに、長寿遺伝子の一つである AMP 活性化プロテインキナーゼ(以下 AMPK)に着目し、RPEにおける AMPKの活性を薬剤によって変化させ、AMPKの活性化が様々な眼疾患の病態を改善することを明らかにしてきた。そこで本研究では RPEの機能に関連すると考えられる遺伝子について、ゲノム編集技術を用いて RPEの遺伝子を改変し、その RPEの機能に対する影響を明らかにすることを目的とする。具体的な目的遺伝子としては、AMPKと同じく主要な長寿遺伝子であるサーチュイン(以下 SIRT)と、RPEにおけるカリウムチャネルの一つで、細胞膜電位の維持に重要な Kir7.1(コード遺伝子 KCNJ13)を対象とする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、長寿遺伝子である SIRT とカリウムチャネルコード遺伝子である KCNJ13 が RPE や機能に及ぼす影響を、ゲノム編集技術を用いて作成した遺伝子改変 RPE を用いて明らかにし、AMD の予防法開発の基盤となる成果を得ることである。

3. 研究の方法

1) iPS 細胞における SIRT のゲノム編集

細胞は iPS 細胞(454E2 株)を使用した。作製した guide-RNA をエレクトロポレーション法を用いて iPS 細胞に導入し、CRISPR-Cas9 システムによって SIRT1 遺伝子を欠損させた。野生型 iPS 細胞、および SIRT1 遺伝子欠損 iPS 細胞を RPE(iPS-RPE)へと分化誘導した。

2) iPS 細胞における KCNJ13 のゲノム編集と RPE への分化誘導

細胞は iPS 細胞(454E2 株)を使用した。作製した guide-RNA をエレクトロポレーション法を用いて iPS 細胞に導入し、CRISPR-Cas9 システムによって KCNJ13 遺伝子を欠損させた。野生型 iPS 細胞、および KCNJ13 遺伝子欠損 iPS 細胞を RPE(iPS-RPE)へと分化誘導した。

3) KCNJ13 遺伝子欠損 iPS-RPE の細胞形態、細胞配列

KCNJ13 遺伝子変異が iPS-RPE 細胞同士の配列および iPS-RPE 細胞 1 つ 1 つの形態に及ぼす影響を評価するために野生型 iPS-RPE と KCNJ13 遺伝子欠損 iPS-RPE をそれぞれ免疫染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。また、透過型電子顕微鏡にて観察した。

4) KCNJ13 遺伝子欠損 iPS-RPE における細胞死

アポトーシス、およびネクローシスが生じているか検討するために Annexin、Ethidium Homodimer にて共染色を行い、共焦点顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

1) iPS 細胞における SIRT のゲノム編集

iPS 細胞に CRISPR-Cas9 システムを用いて

SIRT1 遺伝子欠損 iPS 細胞を作製した。エレクトロポレーション法においては、全細胞に SIRT1 遺伝子欠損が生じるわけではなく野生型が混在した細胞群となる為、エレクトロポレーション法後に、iPS 細胞をシングルセルになるよう薄く播種し、遺伝子欠損

が生じた細胞のみを単離し増殖させた(図1)。その後、SIRT1 遺伝子欠損 iPS 細胞を RPE へ分化

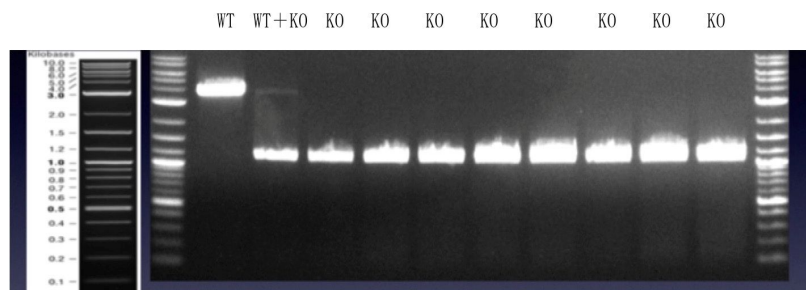
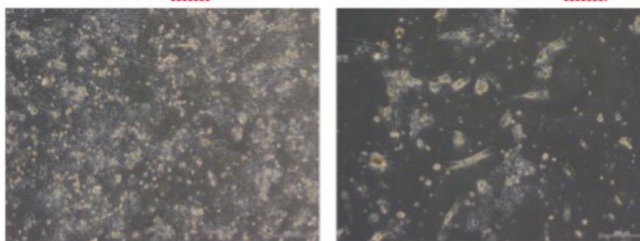


図1:PCR 野生型(WT):3000bp SIRT1遺伝子欠損(KO):1100bp

誘導試みた。しかし、SIRT1 遺伝子欠損 iPS 細胞は増殖速度が非常に遅く(図 2)、RPE 分化誘導における上限継代数を超過した。また RPE に特異的な色素沈着も認めなかった。最終的に、研究期間内に iPS-RPE への分化誘導を行うことは困難であった。

図2: 野生型 iPS 細胞 SIRT1 遺伝子欠損型 iPS 細胞



2) iPS 細胞における KCNJ13 のゲノム編集と RPE への分化誘導

iPS 細胞に CRISPR-Cas9 システムを用いて KCNJ13 遺伝子欠損 iPS-RPE 作製した。作製した KCNJ13 遺伝子欠損 iPS-RPE は野生型 iPS-RPE と同様に色素沈着を認める敷石状の配列を呈していた(図 3)。

3) KCNJ13 遺伝子欠損 iPS-RPE の細胞形態、細胞配列

iPS 細胞に CRISPR-Cas9 システムを用いて KCNJ13 遺伝子欠損 iPS-RPE 作製した。作製した KCNJ13 遺伝子欠損 iPS-RPE は野生型 iPS-RPE と同様に色素沈着を認める敷石状の配列を呈していた(図 3)。

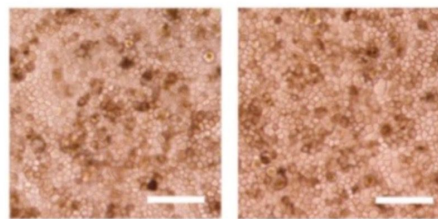


図3: 野生型iPS-RPE KCNJ13遺伝子欠損iPS-RPE
スケールバー = 100 μm

免疫染色の結果、野生型 iPS-RPE は単層のシート状配列を示すのに対して、を示した。突出した部分は RPE65 染色陽性であり、RPE の性質をもった細胞であることが示唆された(図 4)。また、透過型電子顕微鏡では KCNJ13 遺伝子欠損 iPS-RPE にて RPE の下に異常構造を呈する RPE を認めた(図 5)。

4) KCNJ13 遺伝子欠損 iPS-RPE における細胞死

KCNJ13 遺伝子欠損が iPS-RPE の生死に及ぼす影響を調べるため、iPS-RPE に免疫染色(Annexin、Ethidium Homodimer)を施行した結果、KCNJ13 遺伝子欠損 iPS-RPE では Ethidium Homodimer 陽性細胞が有意に多かった。一方で、Annexin については KCNJ13 遺伝子欠損による有意な影響はみられなかった。<図 6、7>これらの結果から KCNJ13 遺伝子欠損によって iPS-RPE にネクローシスが優位に誘導されることが示された。

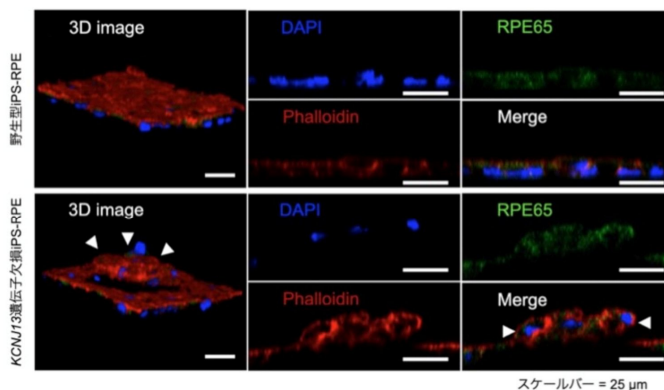
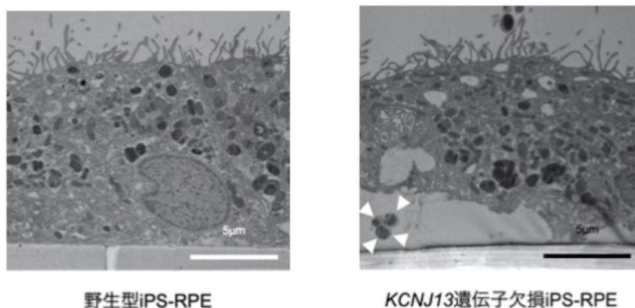


図4:KCNJ13遺伝子欠損iPS-RPEの突出した細胞配列
スケールバー = 25 μm

本研究では当初、主な長寿遺伝子である SIRT のゲノム編集を行い、SIRT が RPE の機能に果たす役割を明らかにする予定であった。ゲノム編集そのものには成功したが、SIRT を欠失した iPS 細胞は増殖能を失い、iPS-RPE への分化誘導を行うことができなかった。この結果は、SIRT が iPS 細胞の機能に大きく関与していることを示す結果であるといえる。SIRT の結果は想定外の結果であったが、並行して行っていた KCNJ13 遺伝子のゲノム編集によって、

図5:iPS-RPEの透過型電子顕微鏡像



iPS-RPE における KCNJ13 遺伝子が、iPS-RPE の配列や細胞死の誘導に大きな役割を担っていることが明らかになった。RPE は本来単層上皮細胞であり、タイトジャンクションを形成し血液眼関門の機能を有することから、今回みられた KCNJ13 遺伝子欠失による現象はその他の RPE や網膜の機能にも影響を及ぼしている可能性があり、引いては AMD をはじめとした RPE の機能低下による様々な網膜疾患の病態に関わっている可能性がある。今後、本研究で得られたゲノム編集細胞を活用して、KCNJ13 遺伝子欠失が RPE の機能に及ぼす影響をさらに解明していくことが必要である。

図6:KCNJ13遺伝子欠損iPS-RPEにおける細胞死

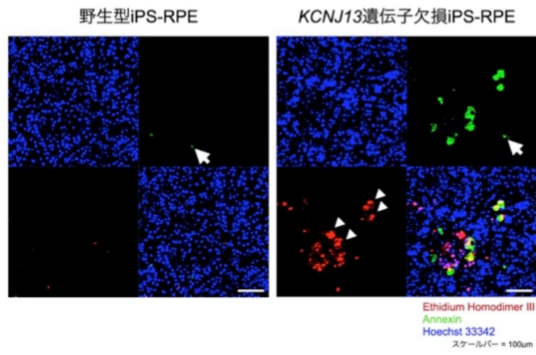
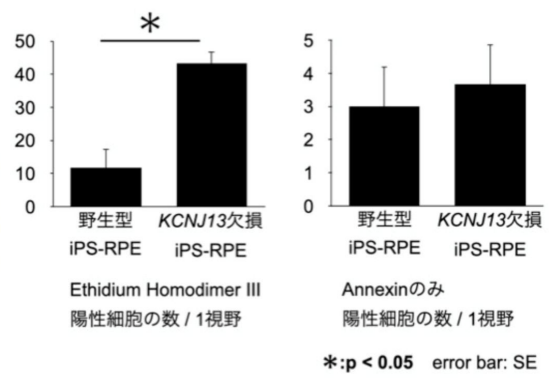


図7: *KCNJ13*遺伝子欠損iPS-RPEにおける細胞死



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanzaki Yuki, Fujita Hirofumi, Sato Keita, Hosokawa Mio, Matsumae Hiroshi, Shiraga Fumio, Morizane Yuki, Ohuchi Hideyo	4. 巻 61
2. 論文標題 KCNJ13 Gene Deletion Impairs Cell Alignment and Phagocytosis in Retinal Pigment Epithelium Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 38 ~ 38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.61.5.38	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuki Kanzaki; Hirofumi Fujita; Keita Sato; Mio Hosokawa; Hiroshi Matsumae; Fumio Shiraga; Yuki Morizane; Hideyo Ohuchi
2. 発表標題 KCNJ13 gene deletion impairs phagocytosis in retinal pigment epithelium derived from human-induced pluripotent stem cells.
3. 学会等名 ARVO Annual Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020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	大内 淑代 (Ohuchi Hideyo) (00253229)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	米澤 朋子 (Yonezawa Tomoko) (30304299)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------