

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16957

研究課題名(和文) レーベル遺伝性視神経症の発症予防・治療を目指した病態研究

研究課題名(英文) Pathological research to prevent and treat of Leber Hereditary Optic Neuropathy

研究代表者

上田 香織 (Ueda, Kaori)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70792232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： LHON患者iPS細胞由来の網膜組織から、最も効率よく網膜神経節細胞を単離する手法を検討した。培養期間の変更により網膜神経節細胞の回収数を増加させ、単離した細胞を比較的安定して維持することが可能となった。

LHON発症後の網膜神経節細胞の残存状況を臨床所見から検討した。視野検査の条件を変更して他の検査結果と組み合わせで解析し、LHON発症例においても中心視野に感度が残存し、特定の視野領域において視力との関連を認めた。この結果からLHONを発症しても視機能に関連する特定の網膜神経節細胞は残存することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LHONは希少疾患であり詳細な病態も明らかにされていない。しかし少数例ながら自然に視機能が回復する症例があること、またLHONの発症者は10歳代から30歳代の若年者が中心であることから、有効な治療法や、保因者に対する発症予防法の開発は社会的な貢献が大きいものと考えられる。

また本研究は臨床所見から着想を得て基礎研究を行っていることから、研究成果を臨床に直接還元できるものと考えられる。上記の点から本研究の社会的意義は大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： We investigated the most efficient method for isolating retinal ganglion cells from retinal tissue derived from iPS cells of LHON patients. By changing the culture period, the number of retinal ganglion cells recovered was increased, and the isolated cells could be maintained relatively stably.

The residual amount of retinal ganglion cells after the onset of LHON was examined from clinical findings. The visual field test conditions were changed and analyzed in combination with other test results. Sensitivity remained in the central visual field even in LHON patients, and visual acuity was related to the specific residual visual field region. This result suggests that specific retinal ganglion cells related to visual function remain even after the onset of LHON.

研究分野：眼科学

キーワード：レーベル遺伝性視神経症 iPS細胞 網膜神経節細胞

1. 研究開始当初の背景

レーベル遺伝性視神経症 (LHON) は、ミトコンドリア遺伝子 (mtDNA) の点変異により母系遺伝する視神経症で、視力低下と中心視野欠損が起こり、視神経が両眼性に萎縮する疾病で、難病に指定されている。遺伝子変異は mt3460, mt11778, mt14484 が 90% を占めている。本疾患は 2014 年に国内で初めての疫学調査が行われ、年間発症者は 117 名、国内の総患者数は 4400 名程度と推測された。これは海外の既報と比較して最も高い有病率であった。

LHON の発症病態は、ミトコンドリア遺伝子変異を有する細胞が、外的要因に暴露された際に過剰な酸化ストレスを生じ、アポトーシスを誘導されると予測されてきた。しかしながら遺伝子変異は全身のすべての細胞に存在するが、大多数の症例で臨床的な症状は眼に局限されていることから発症の中心は網膜神経節細胞であると考えられている (図 1)。またごく一部の症例ではあるが発症から一定期間が経過して視神経萎縮に至った後でも視機能が回復する症例が報告されている。これら LHON に特徴的な発症と臨床経過の理由は明らかにされていない。

これまでの検討により LHON 患者由来 iPS 細胞から分化誘導した三次元網膜組織は、低酸素により mtDNA コピー数を減ずるが、その減少数は健常者由来網膜組織と比較して少ないことを確認した。このことから、LHON 患者網膜組織では外的要因に対しミトコンドリアの余剰が生じる可能性が示唆されていた (図 2)。

図 1 既報から想定されている LHON の発症仮説。網膜神経節細胞内でミトコンドリア遺伝子異常があると酸化ストレスが生じ細胞死が誘導される。外的要因の関与が示唆されている。

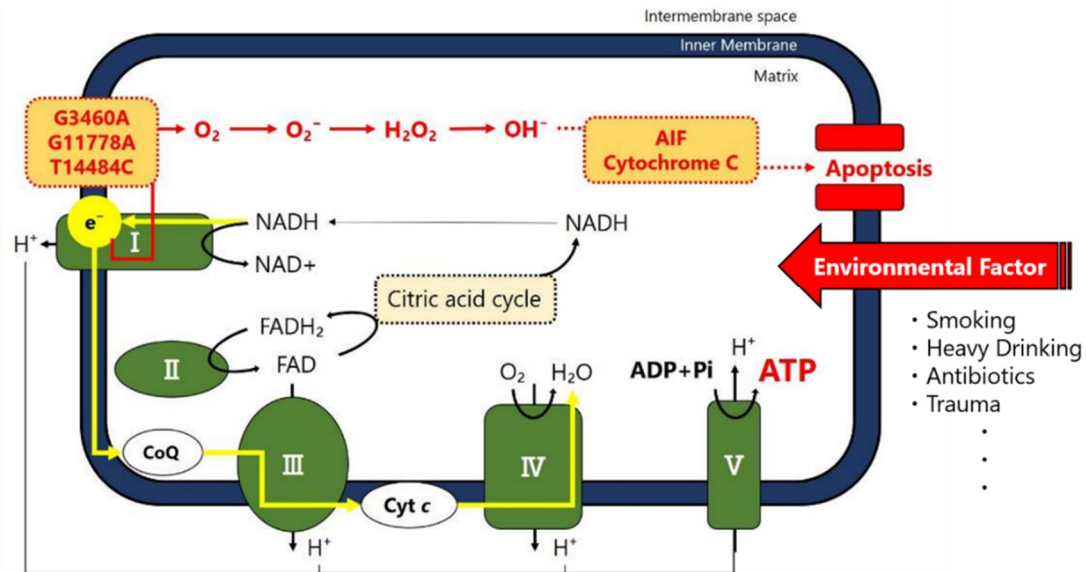
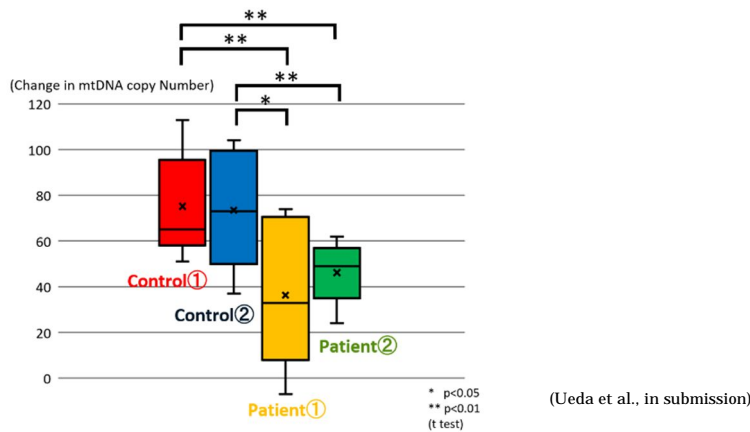


図 2 LHON 患者及び健常者由来網膜組織について、低酸素に 3 日間暴露した前後での mtDNA コピー数を計測したものを。患者組織において mtDNA コピー数の減少が少なく、ストレス下でのミトコンドリアの余剰が細胞ダメージとなる可能性が示唆された。



2. 研究の目的

疾患 iPS 細胞を用いた細胞実験および、臨床研究によって LHON の発症病態を明らかにし、有効な治療法や発症予防法の開発の一助とすること。

3. 研究の方法

LHON 患者および健常者由来 iPS 細胞から、SFEBq 法により三次元網膜組織を分化誘導し、臨床所見に近い状態を再現して細胞死の評価に差異が生じるか比較した。また、三次元網膜組織から網膜神経節細胞を単離し、性状の比較を行った。

LHON 患者の網膜神経節細胞の機能がどの程度残存するのか、また網膜神経節細胞のうち、特定の種類の網膜神経節細胞が残存するなど、細胞死に偏りが生じるのか臨床的に検討した。具体的には LHON 患者の中心視野欠損領域について提示する視標を変更して残存視野を検出した。中心視野欠損のなかに感度の残存する部位を検索し、これを他の視機能の検査パラメータと比較して線形混合効果モデルにて解析を行い、視機能に関連する特定の視野領域があるか検討した。また残存視野が固視位置と一致するか検討した。

4. 研究成果

1. 網膜神経節細胞の単離操作そのものが細胞への負荷となりその後の培養継続が困難となりやすいため、できるだけ多くの網膜神経節細胞を回収できる培養条件を検討した。その結果とくに LHON 患者では網膜神経節細胞の単離に要する期間を短縮することにより網膜神経節細胞の回収数とその後の神経線維の伸長・維持に有効であることを確認した。具体的には分化誘導した網膜神経節細胞を 100~120 日間維持して単離操作を行っていたが、80 日程度に短縮させることで網膜神経節細胞の単離数が増加し、単離後に網膜神経節細胞のみが比較的安定して生着することを確認した。

図 3 : iPS 細胞の作製から網膜神経節細胞の単離までのフローチャート

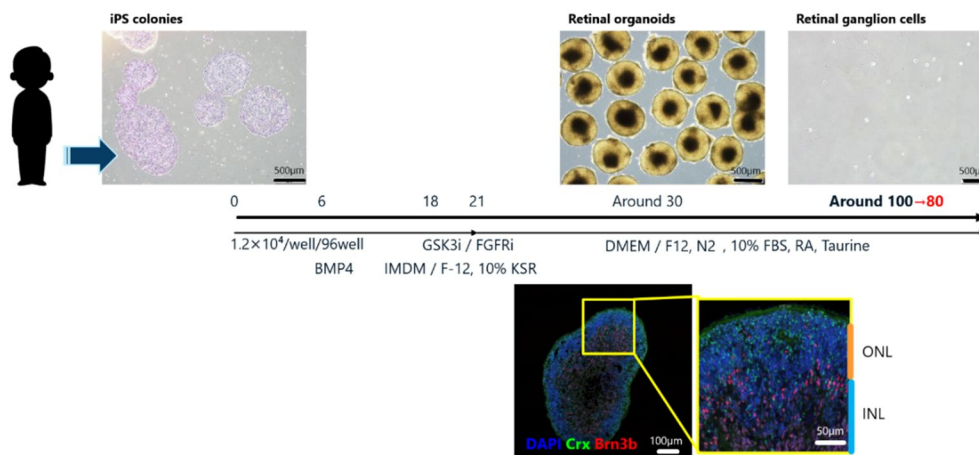
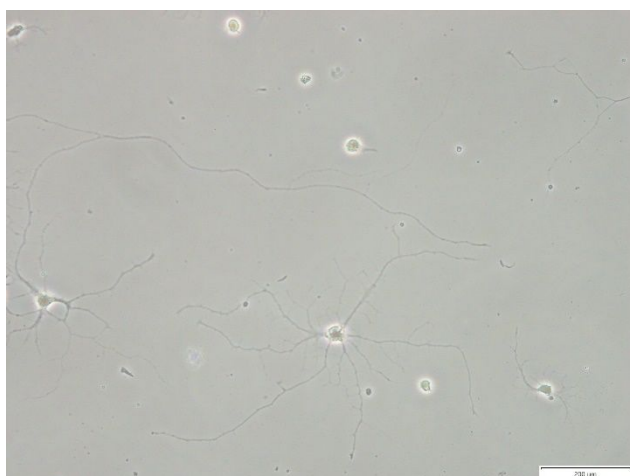
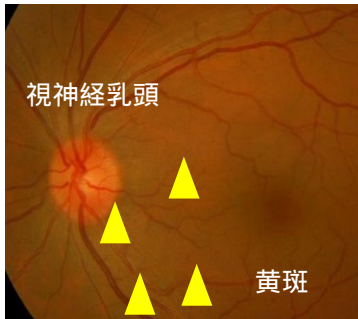


図 4 : 患者組織から網膜神経節細胞を単離した所見。最大約 6 週間にわたり神経線維の接着と伸長を確認することができた。



2. LHON 発症直前～発症早期の眼底では、視神経乳頭から黄斑に向かう毛細血管の拡張蛇行所見を認める。先行実験により、低酸素が LHON の発症に関与する可能性が示唆されており、この毛細血管の所見変化は、低酸素の代償機構を示唆するものと予測された。毛細血管の拡張の代表的な因子である一酸化窒素は一酸化窒素は細胞死の保護作用と細胞死を誘導する作用の両方を有しており、LHON 患者網膜では一酸化窒素への反応が健常者網膜とは異なることが予測され、網膜への影響について検討を開始した。

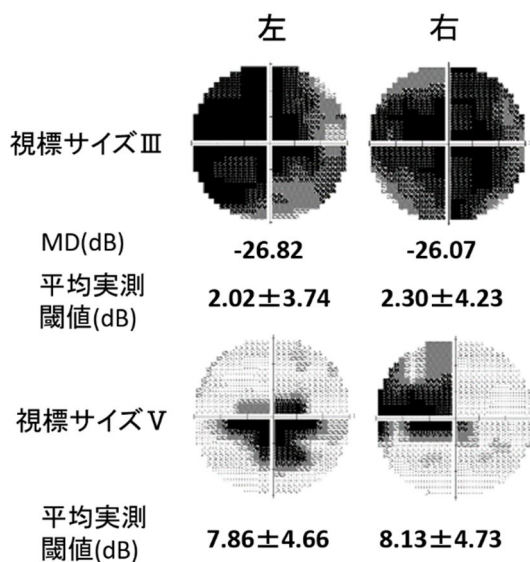
図 5 : LHON 発症直後の眼底所見、視神経乳頭から黄斑の間の毛細血管の拡張蛇行所見 (黄矢印) を認める (telangiectasia)。



臨床研究として、12 名の LHON 患者 (mt11778 変異) を対象として視野解析を行った。ハンフリー自動視野計にて通常の視野検査で使用するサイズ III の視標から面積を拡大したサイズ V の視標を使用して、中心 30° の視野を計測した。中心感度の残存する領域を検出し、視力・限界フリッカー値・OCT で計測した網膜内層 (網膜神経節細胞層 + 内網状層) 厚と線形混合効果モデルを用いて関連を検索した。

網膜神経節細胞のうち、視力と限界フリッカー値の検出に関与するものはそれぞれ異なるとされているが、LHON ではこれらのうちの一方のみが細胞を起こすのか、あるいは両方の網膜神経節細胞においてアポトーシスが誘導されるのかはまだ結論が得られていない。本研究により LHON の視機能には異なる網膜神経節細胞が関与していること、その分布には偏りがあることが示唆された。

図 6 : LHON 患者でハンフリー自動視野計で計測した中心視野について、提示する視標のサイズを変更したところ、残存視野を検出した症例。このような症例について、残存視野と他の視機能パラメーターの関連について検討した (論文作成中)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上田香織
2. 発表標題 レーベル遺伝性視神経症の発症メカニズム
3. 学会等名 日本神経眼科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸本真椰、上田香織、高野史生、村井佑輔、盛崇太郎、坂本麻里、栗本拓治、中西裕子、中村誠
2. 発表標題 レーベル遺伝性視神経症における中心残存視野の評価
3. 学会等名 日本神経眼科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田香織
2. 発表標題 iPS細胞を用いたレーベル遺伝性視神経症の病態解明
3. 学会等名 日本眼科学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------