

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09833

研究課題名(和文)患者iPS細胞と3次元オルガノイドを用いた網膜色素変性の新規治療法に向けた解析

研究課題名(英文) To explore a new therapeutic approach for retinitis pigmentosa using human iPSC cells-derived organoids

研究代表者

篠田 肇 (Shinoda, Hajime)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：30306766

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)：網膜色素変性は加齢とともに徐々に網膜視細胞死による視野狭窄が進行し、最終的に視機能を喪失するため、高齢化社会においては社会問題となる。そこで本研究では、患者体細胞から樹立した人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPSC)を用いて網膜3次元オルガノイド培養を行い、網膜色素変性の病態を解析した。網膜視細胞に分化した際に蛍光標識されるようしておくことで網膜視細胞選択的解析を可能とするシステムを構築し、これを用いて網膜色素変性の病態を解析し、薬物効果のメカニズムを探った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性は4000人から8000人に一人と多数の患者がいるが、世界的に確立した治療法が無い。遺伝子治療の開発は進められているが、該当遺伝子変異以外には用いられないこと、手術を伴うこと等比較的侵襲が高いことから、治療を受けられる患者は限られる。一方、本研究では基本的には薬物療法を開発することを目的としており、多くの患者に適応される可能性を持つ。学術的には、iPS細胞を用いた研究であり、近年のテクノロジーを生かした研究である。また、メカニズムの明らかにされた神経保護治療の開発は網膜色素変性だけでなく、他の神経変性疾患にも応用可能となる発展性を持つ。

研究成果の概要(英文)：Retinitis Pigmentosa is a progressive blinding disease in which visual field defects expand with age due to retinal photoreceptor death; it is a social issue in the recent aging society. In this study, we explored the pathogenesis using organoids derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs). We developed iPSCs with fluorescent labels in the differentiated photoreceptors to selectively collect photoreceptors. Using this system, we analyzed the mechanisms of the disease and the treatment effects.

研究分野：網膜

キーワード：網膜 網膜色素変性 網膜神経保護

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は、国内の失明原因の第2位であり、有病率は世界的に4000-8000人に1人がとされる頻度の高い遺伝性疾患である。最近、失明原因の第3位から第2位と上昇した。年齢とともに進行するため高齢化社会で増加したことから、世界的に治療法が無いことが原因である。視細胞もしくは視細胞のメンテナンスを司る網膜色素上皮細胞の遺伝子変異が原因で、最終的に視細胞死を生じる。そのため中間周辺部の視野欠損が徐々に中心に向かって広がり、最終的にはトンネル視野(図1)となって失明に至る。両眼同時に進行し、視野狭窄のために行動の自由や社会的活動が妨げられ、介護者の問題も重なって社会問題となる。早期発見されても経過観察されるのみであり、治療法の開発が待たれていた。

しかし、患者生体からの網膜サンプル採取は倫理的にできないことや、海外アイバンクから採取しても網膜細胞は増殖せず細胞数を確保することは不可能に近いことから、網膜色素変性の研究は滞っていた。しかし、人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPSC) (Takahashi, Yamanaka Cell 2006)は、患者の皮膚や血球等の体細胞から樹立可能で、遺伝子変異を保持した網膜細胞に分化誘導できるため、「疾患 iPS 研究」(図2)が行われるようになった。

申請者らは、先行研究においてロドプシン変異(E181K)を持つ網膜色素変性患者由来の iPSC (#5 iPSC)を樹立し(Yoshida, Ozawa, Okano et al. Mol Brain 2014)、単層培養による簡易的な視細胞誘導法(Lamba et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006)を用いて視細胞死の原因を解析する疾患 iPS 研究を行った。患者の遺伝子変異は小胞体ストレスを亢進させアポトーシスを誘導したが、小胞体ストレス抑制薬の添加は視細胞の生存を延長させたため、治療候補薬剤となり得た。しかし、本来網膜は6種類のニューロンと1種類のグリアで構成される組織であり、単層培養では網膜の微小環境を模倣していなかった。

一方、3次元オルガノイド培養(図3) (Eiraku et al. Nature 2011, Nakano et al. Cell Stem Cell 2012)は、生体内の組織と類似の3次元構造を形成し生体網膜の微小環境を模倣できる、より優れた病態解析モデルである。すでに研究室で手法は確立したため、これを利用した研究を行うことができると考えた。

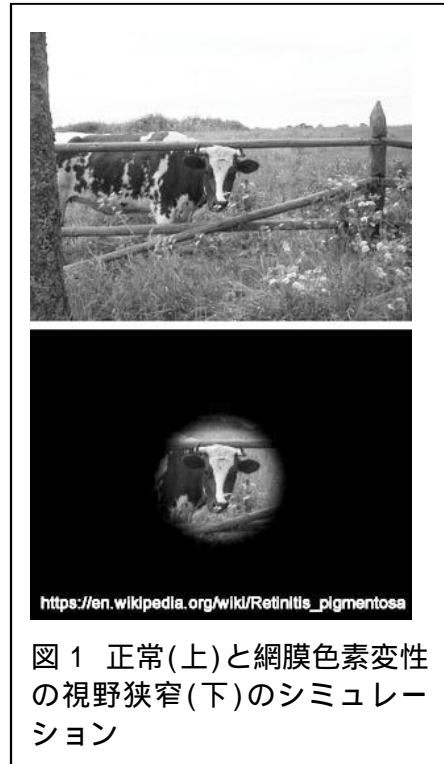


図1 正常(上)と網膜色素変性の視野狭窄(下)のシミュレーション

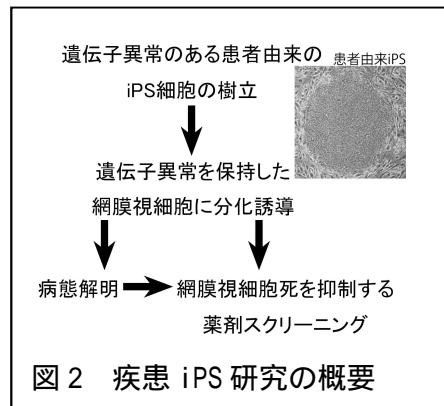


図2 疾患 iPS 研究の概要



図3 iPSC細胞由来3次元網膜オルガノイド (Shinoda, Ozawa unpublished)

2. 研究の目的

網膜色素変性は、世界的に頻度の高い遺伝性の失明疾患であり、治療法が無い。これに対し世界初の新規治療法の開発につなげることが本研究の目的であった。本研究では、視細胞の遺伝子変異を持つタイプの網膜色素変性を解析することとした。そのため、視細胞に分化すると蛍光を発するように標識した iPSC の 3 次元オルガノイドを用い、生体の微小環境を模倣したモデルを用いた解析を行った。動物実験と比べ薬剤の網膜視細胞への効果を直接的にみられる利点があり、また薬剤スクリーニングすることも可能であった。網膜組織は脳と同様神経組織であり、網膜神経細胞に対する保護効果を持つ薬剤は、脳の変性疾患にも効果を持つ可能性があり、本研究で詳しいことがわかれば、眼科のみならず他の分野の疾患研究にも役立つ可能性があり発展性があると考えられた。

3. 研究の方法

本研究では、ロドプシン変異を持つ網膜色素変性を解析したため、ロドプシンを視物質として用いる桿体視細胞に特異的な転写因子である Nr1 遺伝子のプロモーター支配下に GFP 蛍光を発する標識を行った。これを Eiraku らの方法を改変して研究室の本間がすでに立ち上げた方法(Homma et al. Genes Cells 2017)(図 4)により分化誘導すると桿体視細胞のみが蛍光を発した。オルガノイドを Dissociation したのち、GFP 蛍光陽性細胞をフローサイトメトリーで回収してリアルタイム PCR などの手法を用いて解析した。

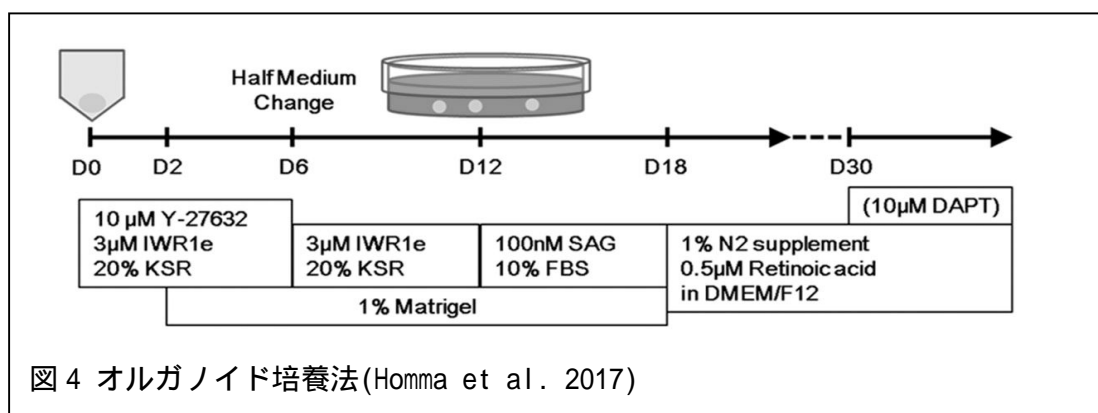


図 4 オルガノイド培養法(Homma et al. 2017)

4. 研究成果

iPSC の 3 次元オルガノイドを作製したところ、GFP を発する細胞は網膜組織と類似した層構造をなしていた(図 5)。そこで、この GFP 陽性細胞を含み層構造を形成しているオルガノイドの部分を取り取ったうえで、フローサイトメトリーで解析した。

GFP 陽性細胞と陰性細胞を分けて細胞を選択的に回収し、それらの遺伝子発現の差を確認した。殊に GFP 陽性細胞群では Nr1 の mRNA の発現が明らかに高く、GFP 陰性細胞群ではほとんどないことを確認した。



図 5 GFP 蛍光を発した視細胞(白い部分) Shinoda Ozawa et al.

また、視細胞で発現し得る *Opn1SW*, *Opn1MLW*, *Gnat2*, *Cnga3*, *Pde6H* などの発現も解析し、GFP 陽性細胞群が桿体視細胞に特徴的な遺伝子発現をしていることを明らかにした。

この系を用いて、GFP 陽性細胞、すなわち桿体視細胞の生存に効果を持つ薬物をスクリーニングした。まず、そのまま培養したのでは明らかに経時的に生存細胞が増加していくことを確認した。そして薬剤もしくはコントロール溶剤を添加した後、GFP 発現の経時的な低下が抑制される薬剤を複数得た。今後は、その効果の分子メカニズムの解析を進める必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Minami S, Uchida A, Nagai N, Shinoda H, Kurihara T, Ban N, Terasaki H, Takagi H, Tsubota K, Sakamoto T, Ozawa Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Shorter Axial Length Is a Risk Factor for Proliferative Vitreoretinopathy Grade C in Eyes Unmodified by Surgical Invasion.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 3944
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm10173944.	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 Shinojima A, Ozawa Y, Uchida A, Nagai N, Shinoda H, Kurihara T, Suzuki M, Minami S, Negishi K, Tsubota K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Assessment of Hypofluorescent Foci on Late-Phase Indocyanine Green Angiography in Central Serous Chorioretinopathy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 2178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm10102178.	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 Akino K, Nagai N, Watanabe K, Ban N, Kurihara T, Uchida A, Shinoda H, Tsubota K, Ozawa Y.	4. 巻 105
2. 論文標題 Risk of newly developing visual field defect and neurodegeneration after pars plana vitrectomy for idiopathic epiretinal membrane.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Br J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 1683-1687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bjophthalmol-2020-317478	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 Norihiro, Minami Sakiko, Suzuki Misa, Shinoda Hajime, Kurihara Toshihide, Sonobe Hideki, Watanabe Kazuhiro, Uchida Atsuro, Ban Norimitsu, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 9
2. 論文標題 Macular Pigment Optical Density and Photoreceptor Outer Segment Length as Predisease Biomarkers for Age-Related Macular Degeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1347 ~ 1347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm9051347	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 Norihiro, Suzuki Misa, Uchida Atsuro, Kurihara Toshihide, Ban Norimitsu, Minami Sakiko, Shinoda Hajime, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 9
2. 論文標題 The Area and Number of Intraretinal Cystoid Spaces Predict the Visual Outcome after Ranibizumab Monotherapy in Diabetic Macular Edema	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1391 ~ 1391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9051391	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 Sakiko, Nagai Norihiro, Suzuki Misa, Uchida Atsuro, Shinoda Hajime, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 9
2. 論文標題 Ocular and Systemic Effects of Antioxidative Supplement Use in Young and Healthy Adults: Real-World Cross-Sectional Data	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 487 ~ 487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9060487	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 Mushiga Yasuaki, Minami Sakiko, Uchida Atsuro, Nagai Norihiro, Suzuki Misa, Kurihara Toshihide, Sonobe Hideki, Ban Norimitsu, Watanabe Kazuhiro, Shinoda Hajime, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 9
2. 論文標題 Hyperreflective Material in Optical Coherence Tomography Images of Eyes with Myopic Choroidal Neovascularization May Affect the Visual Outcome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 2394 ~ 2394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9082394	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 Asato Teru, Nagai Norihiro, Suzuki Misa, Uchida Atsuro, Kurihara Toshihide, Ban Norimitsu, Minami Sakiko, Shinoda Hajime, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 36
2. 論文標題 Closure of macular hole secondary to ischemic hemi-central retinal vein occlusion by retinal photocoagulation and topical anti-inflammatory treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lasers in Medical Science	6. 最初と最後の頁 469 ~ 471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10103-020-03133-9	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 Akino Kunihiko, Nagai Norihiro, Watanabe Kazuhiro, Ban Norimitsu, Kurihara Toshihide, Uchida Atsuro, Shinoda Hajime, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Risk of newly developing visual field defect and neurodegeneration after pars plana vitrectomy for idiopathic epiretinal membrane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Ophthalmology	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) 10.1136/bjophthalmol-2020-317478	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 Sato Maho, Minami Sakiko, Nagai Norihiro, Suzuki Misa, Kurihara Toshihide, Shinojima Ari, Sonobe Hideki, Akino Kunihiko, Ban Norimitsu, Watanabe Kazuhiro, Uchida Atsuro, Shinoda Hajime, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 15
2. 論文標題 Association between axial length and choroidal thickness in early age-related macular degeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0240357	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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 荻野麟太郎, 栗原俊英, 伴紀充, 内田敦郎, 堀内直樹, 藤岡俊平, 根岸一乃, 篠田肇.
2. 発表標題 慶大病院における裂孔原性網膜剥離に対する小切開硝子体手術の術後成績.
3. 学会等名 第60回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植田壮胤, 栗原俊英, 内田敦郎, 伴紀充, 堀内直樹, 藤岡俊平, 秋野邦彦, 根岸一乃, 篠田肇.
2. 発表標題 黄斑上膜に対する硝子体手術の術後に視野障害が出現した症例の3年経過.
3. 学会等名 第60回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伴紀充, 和田伊織, 堀内直樹, 内田敦郎, 栗原俊英, 根岸一乃, 園田康平, 篠田肇.
2. 発表標題 新型コロナウイルスによる二度の緊急事態宣言が大学病院における眼科手術に与えた影響.
3. 学会等名 第75回 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 楊麗珠, 堅田侑作, 藤波芳, 角田和繁, 伴紀充, 堀内直樹, 内田敦郎, 篠田肇, 根岸一乃, 栗原俊英.
2. 発表標題 Visual function change of retinitis pigmentosa: A retrospective 5-year analysis.
3. 学会等名 第75回 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸本ゆりえ, 伴紀充, 園部秀樹, 小澤紘子, 藤岡俊平, 安里輝, 栗原俊英, 内田敦郎, 堀内直樹, 根岸一乃, 篠田肇.
2. 発表標題 両眼の閉塞性網膜血管炎を契機に診断され急速な転機を辿った悪性リンパ腫の1例.
3. 学会等名 第75回 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加山結万, 栗原俊英, 伴紀充, 秋野邦彦, 堀内直樹, 内田敦郎, 篠田肇
2. 発表標題 先天網膜分離症に対する硝子体手術の形態的機能的効果.
3. 学会等名 第125回 日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八木瞳, 栗原俊英, 伴紀充, 秋野邦彦, 堀内直樹, 内田敦郎, 篠田肇.
2. 発表標題 生後早期より網膜血管異常を合併し自然軽快した色素失調症の一例.
3. 学会等名 第125回 日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Minami S, Uchida A, Mushiga Y, Nagai N, Suzuki M, Watanabe K, Sonobe H, Kurihara T, Shinoda H, Tsubota K, Ozawa Y
2. 発表標題 Factors associated with visual outcome after anti-vascular endothelial growth factor therapy in myopic choroidal neovascularization.
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋野邦彦, 渡邊一弘, 篠田肇, 永井紀博, 栗原俊英, 内田敦郎, 伴紀充, 園部秀樹, 坪田 一男, 小沢洋子
2. 発表標題 黄斑円孔に対する硝子体手術における内境界膜剥離の術後視野障害への影響.
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠島亜里, 小沢洋子, 内田敦郎, 永井紀博, 篠田肇, 栗原俊英, 鈴木美砂, 南早紀子, 坪田一男
2. 発表標題 中心性漿液性脈絡網膜症のマルチモダルイメージングによる異常領域の検討
3. 学会等名 第59回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋野邦彦、永井紀博、篠田肇、栗原俊英、内田敦郎、伴紀充、渡邊一弘、堀内直樹、坪田一男、小沢洋子
2. 発表標題 黄斑円孔に対する硝子体手術における内境界膜剥離の術後視野障害への影響.
3. 学会等名 第59回日本網膜硝子体学会総会
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	小澤 洋子 (Ozawa Yoko) (90265885)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任准教授 (32612)	

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