

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16865

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞由来網膜神経節細胞におけるミトコンドリア機能障害の検討

研究課題名（英文）Mitochondrial dysfunction in human iPS cell-derived retinal ganglion cells

研究代表者

小林 航（Kobayashi, Wataru）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20646442

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：健常者及びADOA患者由来のiPS細胞から作製した立体網膜組織を最長50日間培養し、網膜組織から網膜神経節細胞をMACSを用いて分離した。JC-1 MitomP Detection Kitを用いてミトコンドリア膜電位を染色したところ、神経突起中の高膜電位のミトコンドリアが有意に減少していた。Alamar blue assayによる細胞生存率の比較では、両群間に有意差は見られなかった。これらの細胞に過酸化水素による酸化ストレスを与え、細胞生存率を比較したところ、ADOA群では正常群に比べ、細胞生存率が有意に低下していた。また、ADOA群では神経突起の伸長密度が正常群に比べ有意に低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から常染色体優性視神経萎縮症の患者網膜では生まれつき神経線維の密度が低い可能性が示唆された。さらに高膜電位のミトコンドリアが少ないことで酸化ストレスなどの神経変性を来す障害に対して脆弱であるため早期に神経萎縮を来す病態であることが考えられる。遺伝子編集により原因遺伝子を修復することで神経線維密度を改善することが出来る可能性が示唆され、今後は薬剤スクリーニングを行いこの脆弱性から保護出来るような新規薬剤の同定が出来れば視機能障害の進行を抑制できる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Retinal organoids derived from normal subject and ADOA patient-derived iPS cells were cultured for up to 50 days, and retinal ganglion cells were isolated from the organoids using MACS. Comparison of cell viability by Alamar blue assay showed no significant difference between the groups. When these cells were subjected to oxidative stress with hydrogen peroxide and cell viability was compared, cell viability was significantly decreased in the ADOA group compared to the normal group. The density of neurite outgrowth in the ADOA group was significantly lower than that in the normal group.

研究分野：眼科学

キーワード：常染色体優性視神経萎縮症 ミトコンドリア機能障害 iPS細胞由来網膜神経節細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

視神経萎縮を来す代表的な疾患は緑内障であるが、緑内障は高眼圧だけでなく、様々な要因が複雑に交絡した多因子疾患と考えられており、それゆえ動物モデルや細胞による疾患モデルを的確に作製することが困難である。類似した神経変性所見を示す遺伝性視神経症では ADOA 及び LHON が代表的な疾患として知られており、ともに視覚系に異常を来す疾患である。このような遺伝子疾患は iPS 細胞を使用する研究として良いモデルと考えられている。LHON では、mtDNA の変異が呼吸鎖の Complex I subunit 遺伝子に影響を及ぼし、網膜神経節細胞 (Retinal ganglion cell: RGC) の選択的変性と視神経萎縮を引き起こすことが知られている。最終的に著明な視力低下、中心暗点といった視覚異常を来す予後不良な遺伝性視神経疾患である。LHON は、3 つの一般的なミトコンドリア DNA (mtDNA) 変異 (m.11778G.A/MT-ND4, m.3460G.A/MT-ND1, m.14484T.C/MT-ND6) が疾患原因の約 90% を占めており、根治的な治療法も存在しない。ADOA は LHON と同様に視神経障害を来す疾患であるが、10 歳までに発症することが多く、視神経の早期変性により進行性の視力障害に至る。ADOA の原因として、いくつかの OPA1 遺伝子の変異が報告されている (Pesch et al. Hum Mol Genet, 2001, Inoue et al. Acta Ophthalmologica, 2016)。OPA1 遺伝子は、ミトコンドリア膜間隙に局在する GTPase で、ミトコンドリアの内膜の融合、クリステの構造形成に中心的な役割をしていると報告されている (Ban et al. Nat Cell Biol, 2017)。ミトコンドリア機能障害の違いによる神経変性の共通点及び相違点ができることで、それぞれの遺伝子変異が関与する病態が明らかになる可能性が高い。

2. 研究の目的

レーベル遺伝性神経症 (Leber's hereditary optic neuropathy: LHON) 患者由来 induced pluripotent stem (iPS) 細胞を作製し、先行研究で作製した常染色体優性視神経萎縮症 (autosomal dominant optic atrophy: ADOA) 患者由来 iPS 細胞と共に人工的立体網膜組織に分化誘導し、異なったタイプのミトコンドリア障害がどのように共通した視神経萎縮をもたらすのかを解明する。

3. 研究の方法

(1) LHON 患者及び ADOA 患者由来疾患 iPS 細胞の作製

東北大学病院に通院中で遺伝子検査により遺伝子異常を確認した患者の皮膚を採取し、線維芽細胞を培養する。この線維芽細胞にセンダイウイルスベクターを用いて山中因子を遺伝子導入し iPS 細胞を作製する。作製した iPS 細胞に対して、同様の OPA1 遺伝子変異が存在することを DNA シークエンス法で確認する。また、iPS 細胞であることを確認するために多能性幹細胞マーカーである抗 Oct3/4 抗体で免疫染色を施行する。

(2) iPS 細胞から人工的 3 次元立体網膜組織への分化

作製した iPS 細胞から既報の方法に基づいて人工的 3 次元立体網膜組織へ分化誘導する (Kobayashi et al. IOVS, 2018)。分化誘導した ADOA 患者由来立体網膜組織から凍結切片を作製し、網膜神経節細胞マーカーである抗 Pou4F2 抗体で免疫染色を施行し、正常人由来立体網膜組織中の網膜神経節細胞数と比較検討する。また、この LHON 及び ADOA 患者由来立体網膜組織と正常人由来立体網膜組織から神経培養を行い、神経突起の状態を比較検討する。さらに神経突起を mitotracker で染色し、ミトコンドリアの状態を評価する。同様に JC-1 MitoMP Detection Kit を用いてミトコンドリア膜電位を評価する。

(3) iPS 細胞由来立体網膜組織から網膜神経節細胞の単離培養

LHON 及び ADOA 患者由来立体網膜組織と正常人由来立体網膜組織から auto MACS pro® を用いて CD90 microbeads で網膜神経節細胞を単離し維持培養を施行する。維持培養による網膜神経節細胞の生存、神経突起伸長に関して比較検討を施行する。単離した網膜神経節細胞に対しても同様に JC-1 MitoMP Detection Kit を用いてミトコンドリア膜電位を評価する。

(4) グルタミン酸障害、酸化ストレス、オートファジー及びミトファジーの評価

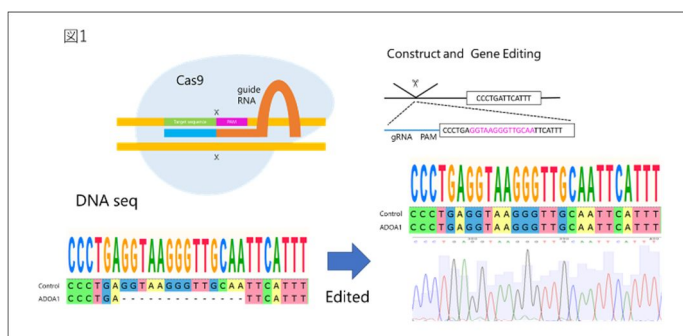
緑内障では網膜神経節細胞死にグルタミン酸障害や酸化ストレスが関連していると考えられており、作製した立体網膜組織でその障害モデルの検討を行う。また、ミトコンドリアが障害を受けると細胞はオートファジーの機構を利用して、機能不全に陥ったミトコンドリアを処理すると考えられている。LHON 及び ADOA 患者由来立体網膜組織と正常人由来立体網膜組織から単離した網膜神経節細胞からタンパク抽出を行い、オートファジーに関連するタンパク発現を比較検討する。

4. 研究成果

(1) LHON 及び ADOA 患者由来 iPS 細胞の作製

コロナウイルス感染流行下であったため大学通院中で m.11778G.A/MT-ND4 の遺伝子変異を有する LHON 患者から口頭で iPS 細胞作製の同意を得たが、この2年間一向にコロナウイルス感染の終息が見えず、高度な視力障害で通院も困難な LHON 患者では大学受診して iPS 細胞を作製する事は困難でコロナウイルス感染が落ち着き、病院の感染対策が緩和され次第 iPS 細胞を作製する方針となった。

ADOA 患者の iPS 細胞は先行研究で作製した細胞を使用し、Crispr cas9 の技術を利用したゲノム編集で OPA1 遺伝子変異を修復した iPS 細胞を作製した (図1)。

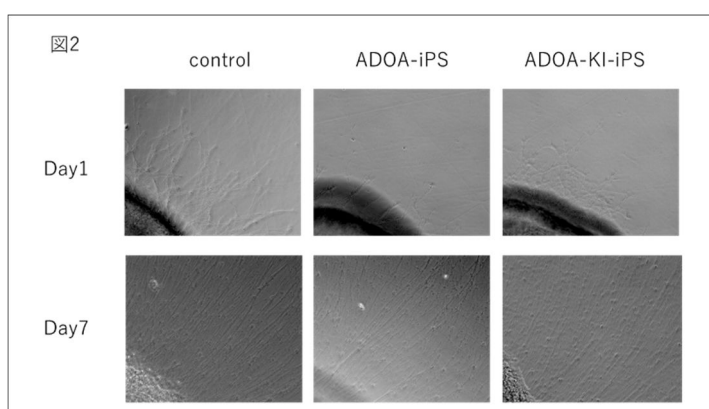


(図1)
ゲノム編集した iPS 細胞の DNA シー
クエンス

ADOA 患者の OPA1 遺伝子変異を修復し、正常群と同じ配列であることを確認した。

(2) 神経突起伸長の比較

正常人由来 iPS 細胞(control)及び ADOA 患者由来 iPS 細胞(ADOA-iPS)及び OPA1 遺伝子異常を修復した iPS 細胞(ADOA-KI-iPS)から既報に基づき立体網膜組織を作製した。分化誘導 50 日の立体網膜組織を接着培養し、神経突起伸長を比較検討した (図2)。OPA1 遺伝子異常を修復することにより神経線維の密度が有意に上昇した。最も長い神経突起の長さにも有意差は認められなかった。OPA1 遺伝子は神経突起の密度に関与している可能性が高いことが示唆された。



(図2)
Control、ADOA-iPS、ADOA-KI-iPS 細胞由来立体網膜組織の神経伸長比較

ADOA-iPS 由来立体網膜組織の神経伸長と比較して、ADOA-KI-iPS では有意に密な神経伸長を認めていた。

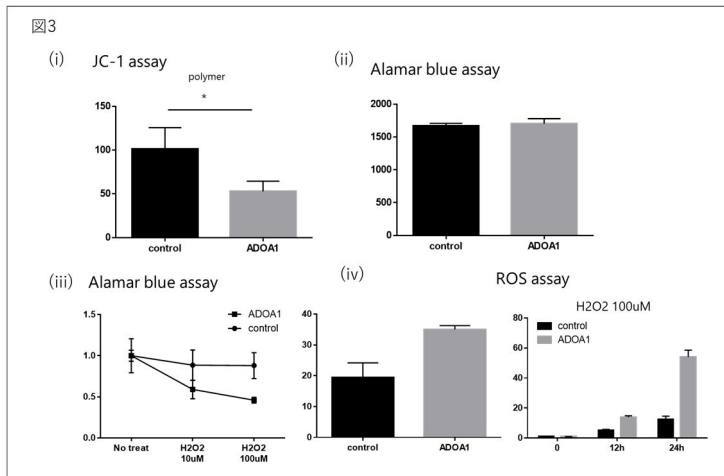
(3) OPA1 遺伝子異常によるミトコンドリア機能、神経細胞生存、酸化ストレスへの影響

正常人及び ADOA 患者由来 iPS 細胞から作製した立体網膜組織を維持培地で 50 日まで培養した。Auto MACS pro®を用いて CD90 microbeads で立体網膜組織から網膜神経節細胞を単離した。既報で使用した培地を用いて維持培養した。単離 2 週間後に JC-1 MitoMP Detection Kit を用いてミトコンドリア膜電位を染色した。同様に正常人由来立体網膜組織から単離した網膜神経節細胞と比較検討したところ、神経突起中のミトコンドリアが有意に減少していた。Almar blue assay で細胞生存率を比較したところ群間に明らかな有意差を認めなかった。

この細胞に対してそれぞれ過酸化水素による酸化ストレスを付加し、細胞生存率を比較検討したところ、ADOA-iPS 群では control 群と比較して有意に細胞生存率が低下していた。ADOA-iPS では酸化ストレスに対して脆弱であることが示唆された。

また ROS detection kit にて過酸化水素による酸化ストレスを付加した際の ROS を測定した。

ここでも ADOA-iPS で 12 時間後以降に有意な ROS の発生を認めていた (図3)。

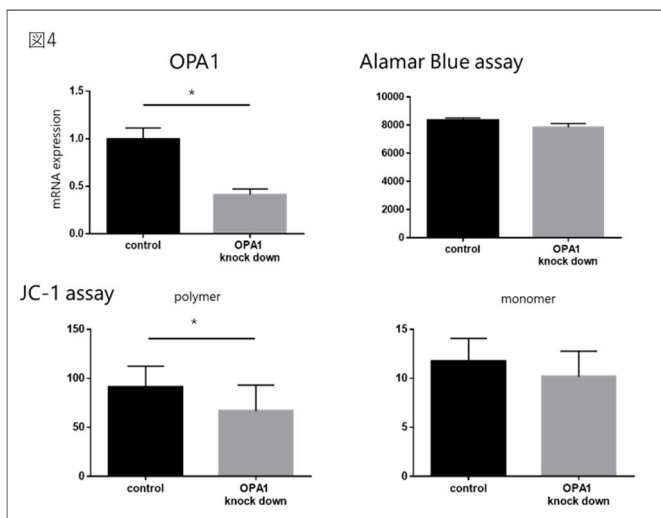


(図 3)
ミトコンドリア機能、神経細胞生存、酸化ストレスへの影響

- (i) JC-1 assay によるミトコンドリアの比較
- (ii) Alamar blue assay による細胞生存率の比較
- (iii) 酸化ストレス負荷による細胞生存率の比較
- (iv) 酸化ストレス負荷による ROS 発生量の比較

(4) 正常人由来 iPS 細胞由来網膜神経節細胞の OPA1 遺伝子ノックダウン

正常人由来 iPS 細胞から作製した立体網膜組織を維持培地で 50 日まで培養し、Auto MACS pro® を用いて CD90 microbeads で立体網膜組織から網膜神経節細胞を単離した。この細胞に対して siRNA を利用し OPA1 のノックダウンを施行した。RT-qPCR で OPA1 の mRNA での発現が低下していることを確認し、Alamar blue assay での細胞生存率の比較、JC-1 assay でのミトコンドリアの比較検討を施行した (図 4)。OPA1 遺伝子をノックダウンした網膜神経節細胞では有意に高膜電位のミトコンドリアが存在していた。低膜電位のミトコンドリアに有意差を認めなかった。

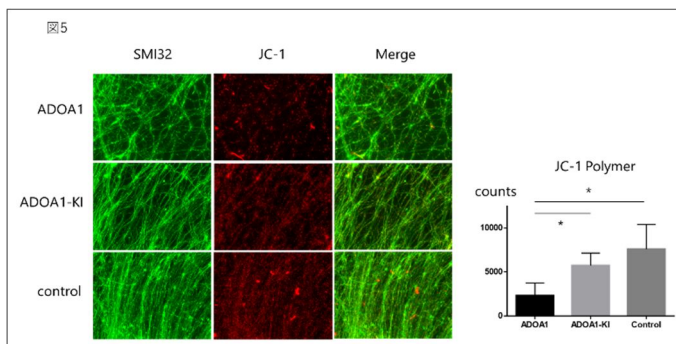


(図 4)
正常人由来 iPS 細胞由来網膜神経節細胞の OPA1 遺伝子ノックダウン

RT-qPCR での OPA1 遺伝子発現を確認し、ノックダウンした細胞群では JC-1 assay で高膜電位のミトコンドリアが有意に減少していた。

(5) 神経突起の免疫染色及び神経突起内のミトコンドリア

接着培養したそれぞれの立体網膜を固定し、神経突起マーカーである抗 SMI 抗体及びミトコンドリアを標識する Mitotracker で共染色した。



ADOA-iPS 群では control 群及び ADOA-KI-iPS 群と比較して有意に神経突起内のミトコンドリア密度が減少していた(図 5)。

(図 5)
神経突起と神経突起内のミトコンドリアの染色

以上の研究成果から OPA1 遺伝子は神経突起の密度、もしくはある特定の網膜神経節細胞の神経突起伸長に関与している可能性があり、ミトコンドリア密度の減少が影響している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林 航
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来3次元立体網膜組織への静水圧負荷におけるmTOR経路の関与
3. 学会等名 第33回日本緑内障学会
4. 発表年 2022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
---------	---------