

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592616

研究課題名(和文) 網膜色素変性症患者から樹立した iPS 細胞の遺伝子治療および病態モデルサルへの移植

研究課題名(英文) Gene correction and transplantation into pathology model marmoset of iPS cells from retinitis pigmentosa patient

研究代表者

吉田 哲 (Yoshida, Tetsu)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：00365438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性症は、網膜の桿体細胞とよばれる光受容細胞が脱落して失明にいたる疾患である。本研究では、ロドプシン遺伝子に変異をもつ網膜色素変性症患者の皮膚細胞から iPS 細胞を樹立し、桿体細胞の変性機構の解析と細胞死を抑制する薬剤のスクリーニングを行なった。患者から樹立した iPS 細胞を桿体細胞に分化誘導したところ、ロドプシン変異を持たない iPS 細胞から分化誘導した桿体細胞と比較して、細胞死の割合が亢進していた。また、ラパマイシンの添加により、ロドプシン変異をもつ桿体細胞の細胞死が抑制されたことから、ラパマイシンを本疾患の患者に投与することにより病状の進行を抑制する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Retinitis pigmentosa (RP) is a kind of neurodegenerative diseases, which causes degeneration of rod cells in retina. In this work, we analyzed the mechanisms of the rod cells death and screened reagents which inhibited the degeneration. First of all, we developed a iPS cell line from an RP patient which a rhodopsin mutation and then induced rod cell differentiation. The rod cells with a rhodopsin mutation had more apoptotic cells than the cells without rhodopsin mutations. Next, we found that a reagent called 'rapamycin' inhibited the cell death of the rod cells, indicating that prescribing rapamycin to RP patient, which were caused by rhodopsin mutations, could inhibit the progress of the conditions of the disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：網膜色素変性症 iPS細胞

### 1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症は、網膜に存在する光を受容する細胞である視細胞が変性する疾患である。変性の原因については様々な研究がなされており、視細胞や網膜色素上皮細胞で発現する遺伝子の変異による変性が報告されている。その代表的な例が、視細胞に発現するロドプシン遺伝子であるが、それによる変性原因も不明な点が多く残されている。また、根本的治療法は確立されていないため、再生医療の確立が期待されている。

iPS細胞は、皮膚細胞のような体細胞から人工的に誘導できる分化多能性を持つ細胞であるため、疾患をもつ患者から作成したiPS細胞が、疾患原因の研究や移植治療のソースへの応用に期待がかかっている。

しかし、疾患の原因が遺伝子の変異が原因であった場合、例えば網膜色素変性症の場合、iPS細胞から視細胞を分化誘導して患者の網膜に移植しても、その患者にもともとあった視細胞が変性してしまっただけの原因と同じ原因で、移植した視細胞も変性してしまうことが予想される。そのため、iPS細胞内の遺伝子変異は、遺伝子修復を行っておく必要がある。

申請者の研究グループでは、ロドプシン遺伝子に変異をもつ網膜色素変性症患者から、既にiPS細胞を樹立していた。そこで、申請者は、このロドプシン変異をヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いて修復し、以下の研究を行うことにした。

### 2. 研究の目的

(1) 181番目のアミノ酸がグルタミン酸からリジンに置換されるロドプシン遺伝子変異を持つ網膜色素変性症患者からiPS細胞を作成した。この患者の疾患の原因が、上記ロドプシンの変異であるかどうかを調べ、その変異による変性原因を解析するとともに、疾患の進行を抑制する薬剤の探索をおこなう。

(2) ロドプシン遺伝子変異を修復したiPS細胞から分化誘導した視細胞をソースとする、移植治療法を確立する。

(3) 目の構造は、マウスとヒトで大きく異なる。そこで、目の構造がヒトに近いサル(コモンマモセット)を、眼疾患モデルにする系を確立する。

### 3. 研究の方法

(1) 網膜色素変性症患者から作成したiPS細胞と、そのiPS細胞のロドプシン遺伝子変異を修復したiPS細胞を、ワシントン大学のReh博士が報告した方法(Lamba *et al.*, 2010)で視細胞に分化誘導を行う。さらに、視細胞特異的に発現するNr1遺伝子のプロモーター調節下で緑色蛍光タンパク質GFPを発現するコンストラクトを作成し、アデノウイルスベクターで発現させることにより、視細胞を可視化する。これら2種類の視細胞の分化誘導

効率を比較することにより、ロドプシン変異が細胞死の原因になっているかを調べる。さらに、GFPを発現する視細胞をフローサイトメーターをもちいて回収し、遺伝子発現を解析することにより細胞死の原因を調べる。また、GFP陽性細胞の割合をフローサイトメーターで調べることにより視細胞の細胞死を抑制する薬剤を探索する。

(2) 網膜色素変性症患者から作成したiPS細胞と、そのiPS細胞のロドプシン遺伝子変異を修復したiPS細胞を視細胞に分化誘導し、網膜色素変性症モデルマウスの網膜下に移植する。遺伝子修復を行った方が、より機能的な回復がえられたことを確認するために、網膜電位図をもちいて移植後の視細胞の機能を調べる。

(3) 視細胞で特異的に発現するNr1遺伝子のプロモーター調節下で、視細胞の変性の原因となることが報告されている変異ロドプシンを発現するコンストラクトを作成し、アデノウイルスにのせたものをマウス網膜下に注入し、視細胞に発現させる。この系で、生体の視細胞に細胞死を誘導できることが証明されたら、マモセットでも同様のことを行うことにより、網膜変性モデルサルを作成する。さらに、このモデルサルにヒトiPS細胞から分化誘導した視細胞を移植し、網膜電位図を用いて視細胞の機能が回復したかどうかを調べる。

### 4. 研究成果

(1) 網膜色素変性症患者から作成したiPS細胞と、そのiPS細胞のロドプシン遺伝子変異を修復したiPS細胞を視細胞に分化誘導し、視細胞を可視化して全体の細胞中の割合を調べたところ、ロドプシン遺伝子に変異がある方はない方よりも有意に低かった。さらに、視細胞を回収して細胞死をおこしている細胞の割合をしらべたところ、ロドプシン遺伝子に変異を持つ視細胞の方が高かった。よって、このロドプシンの変異が、疾患の原因になっていることが示唆された。

次に、視細胞を回収して遺伝子発現解析を行ったところ、ロドプシン遺伝子に変異がある方の細胞で、小胞体ストレスとオートファジーとよばれる現象が亢進していることがわかった。

そこで、小胞体ストレスとオートファジーを調節する数種類の薬剤を、細胞の培養液に添加したところ、視細胞の細胞死を抑制するもの薬剤を数種類みいだした。

この研究結果は、Molecular brain誌に掲載されることが決定している。

(2) ロドプシン変異を修復したiPS細胞から分化誘導した視細胞を、視細胞変性モデルマウスの網膜下に移植した。移植細胞にルシフェラーゼを発現させ、IVISとよばれる体の

外からルシフェラーゼを発現する細胞の位置を調べることができる装置をもちいて、移植細胞が網膜下に留まっているかどうかを調べたところ、免疫抑制剤を投与することにより、移植後2ヶ月でも移植細胞は網膜下に存在することがわかった。しかしながら、網膜電位図による視細胞の機能アッセイで改善が認められなかった。他グループからも、視細胞移植による視力の改善は網膜電位図で確認することができないとの報告があり、本研究は中止することとなった。

(3) 視細胞で特異的に発現する *Nrl* 遺伝子のプロモーター調節下で、視細胞の変性の原因となることが報告されている変異ロドプシンおよび緑色蛍光タンパク質 GFP を発現するコンストラクトを、アデノ随伴ウイルスにのせたものを作成した。現在、マウス網膜下への注入実験を準備中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

1. Yoshida T, Ozawa Y, Suzuki K, Yuki K, Ohyama M, Akamatsu W, Matsuzaki Y, Shimmura S, Mitani K, Tsubota K, Okano H. (2014) The use of induced pluripotent stem cells to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa. *Mol. Brain. in press*. 査読あり
2. Yuki K, Yoshida T, Miyake S, Tsubota K, Ozawa Y. (2013) Neuroprotective Role of Superoxide Dismutase 1 in Retinal Ganglion Cells and Inner Nuclear layer Cells against N-methyl-D-aspartate -induced cytotoxicity. *Exp. Eye Res.* 115:230-238. 査読あり doi: 10.1016/j.exer.2013.07.002.
3. Kataoka M, Kawamuro Y, Shiraki N, Miki R, Sakano D, Yoshida T, Yasukawa T, Kume K, Kume S. (2013) Recovery from diabetes in neonatal mice after a low-dose streptozotocin treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430(3):1103-1108. 査読あり doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.030.
4. Miki R, Yoshida T, Murata K, Oki S, Kume K, Kume S. (2012) Fate maps of ventral and dorsal pancreatic progenitor cells in early somite stage mouse embryos. *Mech. Dev.* 128:597-609. 査読あり doi: 10.1016/j.mod.2011.12.004.
5. Yoshida S, Yasuda M, Miyashita H, Ogawa Y, Yoshida T, Matsuzaki Y,

Tsubota K, Okano H, Shimmura S. (2011) Generation of stratified squamous epithelial progenitor cells from mouse induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE.* 6(12):e28856. 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0028856.

6. Yuki K, Ozawa Y, Yoshida T, Kurihara T, Hirasawa M, Ozeki N, Shiba D, Noda K, Ishida S, Tsubota K. (2011) Retinal ganglion cell loss in superoxide dismutase 1-deficiency. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52(7):4143-4150. 査読あり doi: 10.1167/iovs.10-6294.
7. Matsuo A, Yoshida T, Yasukawa T, Miki R, Ishikawa K, Fujiwara S, Kume K, Kume S. (2011) Epiplakin1 marks the cholangiocyte lineage in normal liver and adult progenitors in injured liver. *Gene Expr. Patterns.* 11(3-4):255-262. 査読あり doi: 10.1016/j.gep.2011.01.001.

[学会発表](計 3件)

1. 吉田哲、小沢洋子、鈴木啓一郎、平林由香、鈴木禎史、小泉春菜、結城賢弥、小林哲郎、大山学、天谷雅行、岡田洋平、赤松和土、松崎有未、三谷幸之介、榛村重人、坪田一男、岡野栄之 iPS 細胞を用いた網膜色素変性症における視細胞の変性機構の解析 第12回日本再生医療学会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2013年3月21~23日
2. Tetsu Yoshida, Yoko Ozawa, Yuka Hirabayashi, Keiichiro Suzuki, Kohnosuke Mitani, Tetsuro Kobayashi, Manabu Ohyama, Masayuki Amagai, Yohei Okada, Wado Akamatsu, Kazuo Tsubota, Shigeto Shimmura, Hideyuki Okano. An analysis of the mechanisms of degradation of photoreceptor cells in a retinitis pigmentosa patient using iPS cells. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10<sup>th</sup> annual meeting. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan. June 13-16, 2012.
3. T. Yoshida, H. Koizumi, K. Yuki, Y. Hirabayashi, K. Suzuki, K. Mitani, K. Tsubota, S. Shimmura, Y. Ozawa, H. Okano. A gene therapy for a gene mutation in human iPS cell using helper-dependent adenoviral vector. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2011, The Future of Eye and Vision Research. Fort Lauderdale, Florida, USA. May 1-5, 2011.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 哲 (YOSHIDA, Tetsu)  
埼玉医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00365438

### (2) 研究分担者

小沢 洋子 (OZAWA, Yoko)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：90265885

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：