

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：2020B - 5

課題名：ヒト疾患 iPS 細胞由来の網膜神経節細胞を用いたミトコンドリア病の病態解明と治療に関する研究

主任研究者 (所属施設) 国立成育医療研究センター  
(所属・職名 氏名) 感覚器・形態外科部眼科医師 横井 匡

(研究成果の要約) 眼科領域におけるミトコンドリア病として、レーベル遺伝性視神経症、常染色体優性視神経萎縮がある。当研究室ではヒト iPS/ES 細胞から網膜神経節細胞を誘導できる系があり、これを用いれば、両視神経症の病態の本態である網膜神経節細胞の細胞死について *in vitro* で研究できる。本研究においては、最終的にこれら疾患患者由来 iPS 細胞から誘導した網膜神経節細胞の細胞死のメカニズムと、また細胞死の抑制法の開発を目指している。

当該年度における目標は、正常ヒト iPS 細胞から誘導された網膜神経節細胞の細胞死を誘導する系を確立することにあつた。これまでのところ、*in vitro* において、生体における虚血再灌流のシステムを模倣し網膜神経節細胞の細胞死、特にアポトーシスを誘導することに成功している。現在論文準備中であり、本年度(研究2年目)の受理を予定する。

### 1. 研究目的

MELAS、MERRF に代表されるミトコンドリア病は、中枢疾患をはじめとして、心臓や筋などに進行性に重篤な障害をきたすが、いずれも確立した治療法のない難病であり、治療の確立が急務である。我々は、ミトコンドリア病である、レーベル遺伝性視神経症 (Leber hereditary optic neuropathy: LHON)、常染色体優性視神経萎縮 (Dominant optic atrophy: DOA) 患者由来 iPS 細胞から、当研究室で開発した網膜神経節細胞(RGC)分化誘導法を用いて網膜神経節細胞を誘導し、これら疾患の細胞死メカニズム解明、また細胞死抑制を *in vitro* で実現することを研究全体の目的としている。

### 2. 研究組織

研究者	所属施設
横井 匡	成育医療研究センター

### 3. 研究成果

本年度の研究は、ミトコンドリア病由来疾患 iPS 細胞の細胞死を評価するための前段階として、通常 iPS 細胞由来網膜神経節細胞の細胞死系の確立を目標とした。

ミトコンドリア病である LHON, DOA はいずれもミトコンドリアの機能障害に伴う、細胞のアポトーシスが発症に関与するとされている。特に、LHON では喫煙などの酸化ストレスが青年期での急性発症の誘因になっているという報告がある。我々は、酸化ストレスによる網膜神経節細胞のアポトーシスを誘導するため、虚血再灌流モデルを用いた。この方法は、培養液中のグルコースを除去した飢餓培地を用いて、密閉された容器の中に培養皿をいれ、酸素を吸収するアネロパックを用いて、酸素濃度 0.01% 以下の低酸素培養を行った後、数時間の通常大気に培養皿を戻すことで、虚血再灌流を *in vitro* で再現する方法である。既に正常 iPS 細胞を用いて、虚血再灌流実験を行ったところ多くの細胞において細胞死を誘導できることを確認している。また、試験

的ではあるが、LHON 患者由来網膜神経節細胞においても、正常 iPS 細胞由来網膜神経節細胞に比し、さらに多くの細胞死が認められている。細胞死の評価には、TUNNEL アッセイやウェスタンブロッティングを用いる。ウェスタンブロッティングでは、アポトーシスの評価としてアポトーシス経路の最終的な実行因子である caspase3、外因性のアポトーシス誘導マーカーである caspase8、内因性のアポトーシス誘導マーカーである caspase9 を用い、アポトーシスとネクローシスの双方を評価する目的で核内ポリメラーゼである PARP を用いる。細胞死の定量評価には、FACS を用いる。アポトーシスのマーカーとして cleaved caspase3 を、ネクローシス様細胞死の評価として 7AAD を用いて、本虚血再灌流系における細胞死が、アポトーシス、もしくはネクローシスであることを定量的に評価する。これらの評価系において、虚血再灌流条件における、iPS 細胞由来網膜神経節細胞の細胞死がいかにかを特定し、さらに、カスパーゼ阻害薬や IM54, Necrox5 といったネクローシス阻害薬を用いて、細胞死経路を確定させる。

現在、上記虚血再灌流モデルにおいて、ヒト網膜神経節細胞死モデルを確立した後、これを LHON や DOA などのミトコンドリア病患者由来網膜神経節細胞に応用している段階である。プレリミナリーなデータであるが、LHON 患者 iPS 細胞から分化させた網膜神経節細胞に同様の虚血再灌流付加を行うと、より高度なアポトーシスが起こる事が観察された。また、ミトコンドリア病に有効であるとされるサイクロスポリンや idebenone のような Co enzymeQ10 誘導体を

添加することで、本細胞死が抑制される傾向にあることがわかってきている。今後、特に、既に認可されており、他の疾患で薬効が確認されている薬剤を優先的にスクリーニングすることで、より短期間のうちに、患者の治療に繋げることができる可能性がある。In vitro では、通常 in vivo では簡単には計画できない、投与感覚や濃度、また薬剤の組み合わせを変化させることなどが非常に容易であり、in vitro のヒト細胞系を用いる事の利点は非常に大きいと考えられる。ミトコンドリア機能障害における効果の分子メカニズム、薬物動態を検討するとともに、投与時期、至適濃度、複数薬剤の組み合わせについても検討する。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

倫理面では、遺伝子解析について、既に倫理委員会の審査を受け承認された（受付番号 518, 平成 24 年 5 月 31 日承認）。ヒト疾患 iPS 細胞の作成と解析に関しては、国立成育研究医療センターにおいて既に倫理審査を受け、承認を受けている（受付番号 686, 平成 24 年 7 月 12 日承認）。遺伝性疾患と眼先天異常の遺伝子解析に基づく疾患 iPS 細胞に樹立と疾患機序の解明は、浜松医科大学と国立成育医療研究センターで既に各施設の倫理審査を受け、承認を受けている（受付番号 792, 平成 26 年 7 月 12 日承認）。動物実験に関しては、実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に従い、動物愛護に注意を払って、最小限の範囲で研究を行う。