

総括研究報告書

課題番号：28-2

課題名：遺伝解析とヒト iPS 細胞由来視神経細胞を用いた
小児の視神経障害の病態と治療の研究

主任研究者名（所属施設） 国立成育医療研究センター

（所属・職名）眼科/視覚科学研究室・医長/室長 東 範行

（研究成果の要約）全国ネットワークを通じて集まった小児の失明に関わる種々の希少な難治性遺伝性眼疾患・眼先天異常に対し、臨床データの集積を行った。臨床データとゲノム DNA を集積し、先天眼形成異常の原因遺伝子解明、Leber 先天盲の遺伝子解析を行った。併せて、ノックアウトマウスを作製した。ヒトおよびマウスの iPS 細胞、ES 細胞から視神経細胞を作製し、薬物候補の化合物の効果を判定する方法を確立した。遺伝性視神経疾患で無虹彩に伴う視神経低形成、Leber 視神経症、優性視神経萎縮の患者由来ヒト疾患 iPS 細胞を作製し、前 2 者を解析してヒト疾患に類似する変化を確認し、病態解明や創薬の研究に有用であることを明らかにした。

1. 研究目的

小児の失明原因では、遺伝病・先天異常が 50%、未熟児網膜症が 30% を占める。なかでも、視神経は網膜から視覚情報を脳に伝達する神経細胞で構成されており、これが障害する疾患は、遺伝性視神経症、先天異常など遺伝的素因を持つものが大部分で、いずれも重篤な視覚障害を起こす。原因遺伝子や病態が明らかでないものも多い。疾患の初期兆候をとらえ、早期に発見・診断することは、治療不能のものであればリハビリ等による早期の社会参画を促すことができる。しかし、弱視に対して治療や訓練を行えば視力が向上することをみれば、発達途上にある小児の神経は再生や可塑性の能力に富んでおり、遺伝性変性や先天異常であっても治療できる可能性がある。

本研究では、まず小児に重篤な視覚障害を起こす原因不明の遺伝性視神経疾患に対して、遺伝解析、遺伝子改変マウスの解析によって原因遺伝子を明らかにする。疾患の発生や病態の分子生物学的メカニズムの研究に関しては、従来の動物モデルや動物細胞を用いる実験では限界

があった。しかし我々はヒト iPS 細胞から視神経細胞を作製することに世界で初めて成功し、ヒト細胞を用いた *in vitro* 実験が可能となった。この培養システムを用いて、発症機転・病態が明らかでない遺伝性視神経疾患や先天異常に関しては、疾患の病因と発症メカニズム、進行機転などの病態を分子細胞学的に解明する。これによって、早期診断のための検査法を新規に開発する可能が開ける。さらに神経障害に対する神経保護、神経の再生可塑性を促す神経再生について、主に薬物療法について新規に開発することを目指す。

2. 研究組織

研究者	所属施設
東 範行	国立成育医療研究センター
仁科幸子	国立成育医療研究センター
深見真紀	国立成育医療研究センター
堀田喜裕	浜松医科大学
高田修治	国立成育医療研究センター
横井 匡	国立成育医療研究センター

3. 研究成果

本年度の研究は、詳細な臨床検査によ

って稀少な遺伝性疾患の臨床データとゲノムDNAを集積し、さまざまな疾患で新規の遺伝子変異を同定し、ノックアウトマウスを作製した。ヒトおよびマウスのiPS細胞、ES細胞から視神経細胞を作製し、視神経疾患のin vitroでの研究法を確立した。さらに遺伝性視神経疾患のヒト疾患iPS細胞を作製し、病態解明や創薬の研究を行った。

1) 臨床データの集積・解析、疾患における固有マーカー発現の検討

小児期に重篤な視覚障害をきたす種々の後眼部・視神経・視路疾患について、最新機器を用いて網羅的に検査するシステムを構築して詳細な形態・機能解析を行い、全身及び遺伝要因の検討を加え、臨床データベースの構築を進めた。

また乳幼児視覚評価法を導入して保有視機能の解析を行い早期治療やロービジョンケアに応用した。

様々な疾患のうち、特に視神経低形成とレーベル先天黒内障に関し、新たな病態解析が進み、成果を情報発信した。

2) 遺伝子解析、遺伝子改変マウスの作製と解析

先天性眼球形成異常症患者の網羅的遺伝子解析により、既知遺伝子変異の新たな臨床スペクトラムを解明した。また、新規疾患原因遺伝子候補を同定した。今後、研究を推進し、新規疾患成立機序の解明を目指す。

3) 遺伝子解析

既知のLeber先天盲の原因遺伝子のスクリーニングを行う事で50%以上の日本人LCAの原因変異を同定する事が可能であった。日本人LCAの遺伝子診断に遺伝性網膜疾患パネルを使用したターゲットシーケンス解析は有効である。

4) 遺伝子改変マウスの作製と解析、ゲノム編集による疾患iPS細胞の治療

ノックアウトマウスの系統の樹立に成功した。その結果、すでに表現型解析が実施されており、来年度の解析に使うための十分な数の変異マウスの準備ができた。

ヒト疾患iPS細胞の目的の変異修復については、これまで実施してきたCRISPR/Cas9システムの改良、疾患iPS培養のフィーダーフリー化を進め、無虹彩症iPSの変異修復を目指す。

無虹彩症iPSの転写産物の解析を進め

ており、変異修復された疾患iPSの取得後、比較解析を行う予定である。

5) iPS細胞・ES細胞からの視神経細胞の作製とin vitro研究法の確立

ヒト皮膚iPS細胞、ES細胞、マウスiPS細胞、ES細胞から自己分化誘導した視神経細胞を用いて、薬物等の化合物の分化や軸索伸長に与える効果の評価法を確立した。

6) 疾患iPS細胞を用いた疾患細胞モデルの作製と解析、神経保護薬の効果に関する研究

疾患iPS細胞として樹立した無虹彩症に伴う視神経低形成およびLeber視神経症の患者由来iPS細胞が網膜神経節細胞の研究において有用であることを明らかにした。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究に関して、の臨床データの収集・解析および施設間の情報交換の遂行にあたっては、患者家族へプライバシーの保護、解析・情報提供の任意性、データ情報の取り扱いと得られる研究成果の医学的貢献度等について充分説明し、書面にて検査結果の二次利用について同意を得た。また個人情報外部への持ち出し禁止、データの匿名化など個人情報の保護に努め、個人情報管理とその漏洩防止に厳重な注意を払った。先天奇形症候群における遺伝的要因の探索(受付番号518、平成23年12月8日承認)と、ヒト疾患iPS細胞の作成と解析(受付番号686、平成24年7月12日承認)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。疾患iPS細胞作製のための遺伝子及び末梢血の収集にあたり、国立成育研究医療センター(受付番号686、平成24年7月12日承認)と浜松医科大学(受付番号23-54平成23年9月承認)の倫理委員会の承認を得た。ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針に従い、最新の社会的影響を十分に考慮する。