

(別紙1)

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 東 範行 (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・
診療部長・室長

(研究成果の要約) 視神経萎縮を来すレーベル先天盲障の多数例を集積し、臨床像と長期経過を解析し、遺伝子型と表現型 (眼および全身所見) の関連を検討した。収集した症例・検体を、網羅的な遺伝子解析や疾患 iPS 細胞の作成解析、疾患における固有マーカー発現の検討など基礎研究へ統合することによって、今後さらに小児の視神経・視路疾患の病態解明に寄与すると期待できる。レーベル先天盲の遺伝子解析を行い、CACNA1F 変異によって先天停止性夜盲よりも重篤な LCA の表現型を呈する症例があることを見出した。CHARGE 症候群発症に関与する新たな CHD7 イントロン変異を同定した。また、下垂体機能低下症の原因遺伝子として発見された WDR11 が、コロボーマや心奇形、発達遅滞にも関与することを見出した。さらに、新規疾患原因の可能性についてモデル動物解析を推進した。遺伝性視覚障害疾患において、遺伝子解析によって原因遺伝子を同定した。機能未知な遺伝子に関しては、ノックアウトマウスを作製し、解析した。目の疾患の新たな原因候補遺伝子として同定された機能未知遺伝子の機能解析をモデルマウスを作製することにより行った。ヒト家系における眼疾患と同様の目の表現型を認めたが、全身での病態を解明するには適さなかった。患者皮膚あるいは結膜細胞から疾患 iPS 細胞を樹立し、視神経細胞に自己分化させることによって、in vitro の疾患細胞モデルを作製することに成功した。無虹彩症疾患 iPS の疾患原因変異の修復は化学合成 gRNA、Cas9 タンパクを使用した方法を検討し、原因変異がある Pax6 のエクソン領域に新たな変異が入ったクローンが得られた。疾患 iPS 細胞の樹立を行い、Leber 視神経症の細胞モデルの有用性について検討した。細胞死をより多く認めたため、iPS 由来網膜神経節細胞における細胞死評価系を確立した。

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

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

多くの先天素因に起因する緑内障性視神経症、遺伝性網膜変性症、レーベル先天黒内障、視神経形成異常などの患児に対し、全身検索、遺伝要因の検索とともに全身麻酔下検査を実施した。従来の眼科学的検査に加えて、解像度の高い最新の光干渉断層計、広画角眼底カメラ・蛍光眼底造影、全視野網膜電図及び黄斑局所網膜電図を導入

して精密な形態・機能解析を行った。形態・機能解析の結果を導入し、全身及び遺伝要因の検討を加え、さらに0歳から年齢に応じた視覚評価法を導入して早期に保有視機能の解析を行い、早期治療やロービジョンケア、遺伝相談に応用した。症例を集積して、網羅的な遺伝子解析や疾患 iPS 細胞の作成解析、疾患における固有マーカー発現の検討など基礎研究への統合を図る。

2018年度までに当センターへ受診したレーベル先天黒内障(LCA)および類縁疾患56例を、臨床像から①LCA 典型例40例、②非典型例/早発型網膜色素変性症(RP)4例、③全身症候群に伴うLCA/RP11例に分類した。眼底・FA所見、OCT、ERG、合併症につき検討した。遺伝子解析としてLCAとRPの原因遺伝子74個を解析対象とした遺伝性網膜疾患パネルをデザインし、次世代シーケンサーにてターゲットシーケンス解析を実施し、56%に原因遺伝子

(CRB1、NMNAT1、RPGRIP1、GUCY2D、CEP290、CRX、IMPDH1、LRAT、PRPH2、RP2、RPGR)を同定した。遺伝子型と表現型の関連について検討した。6歳以下で全身麻酔下検査を実施したLCA29例では、初期像を解析し、多彩な網膜変性、視神経萎縮像を呈すること、OCTによる形態解析とERGによる機能解析に相関があること、初期にはOCTにて網膜中心窩のellipsoid zone(EZ)が保持されている例が28%、FM-ERGが微弱ながら保たれている例が24%あり、視力予後に相関すること、遺伝素因によって、初期像が異なることが明らかとなった。

LCA長期経過観察例では遅発性(6~13歳)に全身異常を呈する例があり(聴覚障害2例、てんかん2例、小脳症状2例、免疫不全1例、糖尿病1例、脳動静脈奇形1例)、臨床分類①LCA 典型例は35例、②非典型例/RPは4例となり、③全身症候群

に伴う LCA/RP が 17 例に増加した。全エクソーム解析にて遺伝性網膜疾患の原因遺伝子をスクリーニングし、Joubert 症候群、Alstrom 症候群の原因遺伝子が同定された。遺伝学的検査が全身管理に有用であることが示された。

2) 網膜疾患の遺伝子解析

ターゲットシーケンス解析で原因変異を同定出来なかったレーバー先天盲 15 家系の 10 家系について全エクソームシーケンシングを行い、既知の遺伝性網膜変性の原因遺伝子 266 個を解析対象として変異探索を実施した。内 1 家系より X 連鎖性の不全型先天停止性夜盲の原因遺伝子

CACNA1F からヘミ接合変異 [p.(R691*)] を同定した。*CACNA1F* 変異による LCA の表現型を呈する症例はこれまで 2 家系報告があり、日本人 LCA では最初の報告である。保因者にも軽度の臨床症状が見られた。長期経過にて進行する可能性を念頭に置く必要がある。

3) 遺伝子解析、遺伝子改変マウスの作製と解析

CHARGE 症候群発症に関与する新たな CHD7 イントロン変異を同定した。c.7165-4A>G 変異は、スプライス異常を介して CHD7 半量不全を招くことが明らかとなった。この知見は、CHARGE 症候群患者の遺伝カウンセリングの面で重要である。また、下垂体機能低下症の原因遺伝子として発見された WDR11 が、コロボーマや心奇形にも関与することが見いだされた。これらの症状は WDR11 が存在する 10q26 欠失症候群の症状として知られている。従来 10q26 欠失症候群の症候は EMX2 と FGFR2 の欠失によるものであると推測されていたが、本研究によって WDR11 もこの症候に寄与することが見いだされた。さらに本研究では、新規疾患原因の可能性についてモデル動物解析を推進している。

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

眼先天異常で見いだされた原因遺伝子のノックアウトマウスについて、昨年度までに作製したエクソン 2 とエクソン 6 に変異を導入したマウスではヒト家系における眼疾患と同様の目の表現型を認めた。エクソン 6 のホモノックアウトマウスは生存し、より強い目の表現型を持つエクソン 2 のホモノックアウトマウスは胎生致死であり他の臓器の解析が不可能であった。機能未知遺伝子の他の臓器の表現型解析を目的としてエクソン 2、エクソン 6 の中間に当たるエクソンのノックアウトマウスの作製を目指した。エクソン 3 とエクソン 4 に gRNA を設計し、Cas9 と共に受精卵に導入することで変異マウスの作製を行った。その結果、エクソン 4 の gRNA を導入した受精卵から多数の F₀ 世代の産仔を得る事ができた。エクソン 3 の gRNA 導入は複数回の実験を行ったが産仔が得られず、胎生致死であることが考えられた。現在エクソン 4 の gRNA を導入して得られたマウスの変異を塩基レベルで確認し、目的の変異マウスアレルが確認できた。

昨年度から引き続き、無虹彩症由来 iPS 株 (AN#4) を対象として、ゲノム編集による *Pax6* 遺伝子の一塩基変異修復を検討している。まず遺伝子導入及びその後のクローニングの利点を考え、フィーダー細胞上で培養していた AN#4 株をフィーダーフリー培養に切り替えた。今年度からこれまで実施してきた Cas9_gRNA 発現ベクターを使用した方法を変更し、新たに化学合成 gRNA と Cas9 タンパク質を使用した編集法を検討した。クローン解析の結果、変異導入率は 12.5%であった。*Pax6* エクソン 10 に変異が入ったクローンは得られたが、目的の塩基の修復がなされたクローンは無かった。

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

視神経低形成を伴う無虹彩症、常優性視神経萎縮、Leber 視神経症の患者の皮膚あるいは結膜細胞から iPS 細胞を樹立した。これらはそれぞれ、*Pax6* 遺伝子、*OPA1* 遺伝子、ミトコンドリア遺伝子の変異をもっている。いずれも視神経細胞に自己分化させると、軸索の形成や機能維持に障害がみ

られ、遺伝性疾患の細胞モデルであることが証明された。これらを用いることによって、遺伝子の変異による疾患発生のメカニズムや病態の表現について、下流の遺伝子の変化を検討することで明らかにすることができる。また、神経障害については神経保護薬や神経再生薬による治療が期待されるが、その創薬研究に役立つ。

一方で、Pax6 遺伝子、OPA1 遺伝子、ミトコンドリア遺伝子は既に機能が十分に知られているので、疾患 iPS 細胞を樹立すれば直ちに分子メカニズムの研究に移れるが、機能がまったく不明な遺伝子の場合には難しい。これは疾患 iPS 細胞をそのまま研究に用いることができず、目的とする細胞に分化させて初めて研究を行えるので、その遺伝子が主に働く細胞や生体反応の位置がわからない状況であれば、疾患 iPS 細胞を作製しても分化させるべき細胞を決められず、研究の目的を定めることができないからである。したがって、機能不明な遺伝子が原因である場合は、まず遺伝子改変動物を作製して、その表現型が主にみられる細胞や生体反応を同定することが最初となる。今回、遺伝性疾患で原因不明の原因遺伝子を同定し、そのノックアウトマウスはヒト疾患の表現型ときわめて類似していた。このマウスを詳細に検討することによって、疾患の起こる細胞や生体反応を同定することが可能となった。これが明らかになった後に、患者由来の細胞から疾患 iPS 細胞を作製して *in vitro* 研究を行えば、さらに詳しい疾患の分子メカニズムが明らかになり、治療に結び付く研究へつながることが期待される。

6) 疾患 iPS 細胞を用いた疾患細胞モデルの作製と解析、神経保護薬の効果の検討

昨年度までの研究によって、我々が樹立した無虹彩症に伴う視神経低形成および Leber 視神経症の疾患 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が明らかになっていた。特に細胞死解析においては、本年度にこれを定量化すること、また本細胞死誘導系における細胞死のメカニズムを明らかにすることができた。疾患モデルにおいては、今後同様の誘導を開始し、細胞死抑制効果を示す薬剤などの検討を定量的に行なっていきたいと考えてい

る。

今後は、疾患の病態について本疾患細胞モデルを用いて、マイクロアレイ等で経時的に分子動態を解析し、疾患の進行過程を明らかにする予定である。また、これらに対して、神経保護や神経再生に有効な薬物を開発する創薬研究にも役立てることができる。ヒト網膜神経節細胞は元来、入手困難で、利点の多い *in vitro* 系で解析することは困難であったが、開発したヒト網膜神経節細胞と、*in vitro* 評価系を用いて、今後さらに視神経症の解析が進むものと期待される。

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、国立成育医療研究センター(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。