

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業 感覚器障害分野）  
分担研究報告書

変異 *EYS* を発現している変性視細胞モデルの作出に関する研究

研究分担者 世古裕子 国立障害者リハビリテーションセンター研究所  
感覚機能系障害研究部 視覚機能障害研究室長

研究要旨

本研究の目的は、網膜色素変性症(RP)患者の体細胞を視細胞に分化誘導し、変性視細胞モデルを作出し解析することである。平成 24 年度から平成 25 年度にかけて、市販のヒト皮膚線維芽細胞から直接リプログラミングによって網膜細胞へと分化誘導する実験を行った。その結果、ヒト皮膚線維芽細胞から、視細胞特異的な *EYS* 遺伝子や光トランスダクションに関わる遺伝子が発現し光応答のある視細胞様細胞に分化することがわかった。さらに、倫理審査委員会の承認を得て、平成 24 年度には正常ボランティアの、平成 25 年度には 3 名の RP 患者の皮膚採取を実施した。直接リプログラミングによって正常ボランティアと RP 患者由来皮膚線維芽細胞から視細胞に分化誘導し、発現遺伝子の解析を行った。その結果、これらの細胞においても *EYS* 遺伝子や光トランスダクションに関わる遺伝子の発現が認められた。したがって、患者由来の視細胞様細胞の発現解析による新しい遺伝子診断法の開発が出来る可能性が示唆された。

A . 研究目的

網膜色素変性症(RP)患者は、夜盲に始まり、徐々に視野狭窄、視力低下が起こる進行性の遺伝子疾患であり、現在有効な治療法はない。中途失明により就労が困難となるケースが多く、RP患者の社会生活を支援するためにも、予後の予測法や抜本的治疗法が望まれている。一方で2008年には、非定型網膜色素変性症の一つであるLeber先天性黒内障において遺伝子治療による視機能の回復が報告され、将来的にRPの治療法として遺伝子治療を含めた個別化医療が行われることが期待されている。

RPの原因となる遺伝子変異は患者毎に様々であるが、いずれの場合も最終的には視細胞の変性を引き起こす。視力を失う前に視細胞の変性を抑え、病気の進行自体を止めることが望まれている。遺伝性疾患における個別化医療では、根本的な治療を行うためにはまず原因となる遺伝子の変異が判っていることが前提条件であり、さらにその変異によって発症へと至るメカニズムが明らかになっていることが必須となる。

*EYS* 遺伝子は 2008 年に常染色体劣性 RP(arRP)の原因遺伝子として同定され、arRP の約 5 - 15% を占めることが海外で報告された。当研究所において、先行研究として日本人 RP 患者 68 名における遺伝学的解析を行い、複数の新規変異を同定した。そして、これら変異を保有する患者は arRP の約 30% を占める高い頻度であった (Iwanami et al. 10VS, 2012)。

*EYS* 遺伝子を含めて、網膜色素変性症の原因候補

遺伝子の多くは網膜に特異的に発現している。そのため、網膜に発現する遺伝子(mRNA)を解析できれば、全ゲノムを解析するよりも効率がよい。世古らは、ヒト体細胞(虹彩細胞)から直接リプログラミングによってヒト網膜細胞に分化誘導することに成功している (Seko et al., PLoS ONE, 2012)。この分化誘導の方法を応用し、患者から採取可能な皮膚や血液由来の細胞から網膜細胞へと分化誘導できれば、*EYS* 遺伝子を初めとした網膜のみに発現するRPの原因候補遺伝子のmRNAを解析することが可能となる。これまでの遺伝子解析の中心であったゲノム解析ではなく、より効率が高いと考えられているcDNAをもとにした解析が可能となる。

本研究では、患者由来の分化誘導網膜を用い、日本人の常染色体劣性網膜色素変性症(arRP)の主要原因遺伝子であることが明らかとなった *EYS* 遺伝子について、遺伝子診断法を確立し、予後予測や治療法の手がかりを得ることが最終目的である。

B . 研究方法

分担研究者らが開発したヒト虹彩細胞を視細胞に分化誘導する方法 (Seko et al., PLoS ONE, 2012) を応用し、より一般的なヒト体細胞であるヒト皮膚線維芽細胞を視細胞に分化誘導する方法を、市販されたヒト皮膚線維芽細胞を用いて検討した。

具体的には、ヒト皮膚線維芽細胞を培養後、*CRX*, *NEUROD*, *RAX*, *OTX2* 遺伝子をレトロウィルスベクタ

ーを用いて導入し、遺伝子導入した細胞（誘導視細胞様細胞）と導入していない細胞（コントロール細胞）それぞれからmRNAを抽出、RT-PCR、網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、それぞれの細胞を用いて、暗黒下にてパッチクランプを行い、光応答を調べた。

変性視細胞モデルの作製については、平成24年度には3名の正常ボランティアの皮膚採取を、平成25年度には3名のRP患者の皮膚採取を実施し、それぞれの皮膚線維芽細胞の単離・培養・凍結を行った。それぞれの細胞を培養し、上記転写因子の遺伝子を導入して分化誘導を行った後、誘導細胞からmRNAを抽出、RT-PCRを行った。なお、RP患者のゲノム解析ならびRP患者の非眼球組織から網膜細胞を分化誘導する研究計画（「患者由来分化誘導細胞を用いた網膜変性疾患の新規診断法の開発」）については、国立障害者リハビリテーションセンターヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会において審査を受け承認を得た。

また、市販ヒト網膜mRNAから我々の独自技術であるベクターキャッピング法(Kato et al., DNA Res., 2005)を用いて完全長 cDNAライブラリーを作製した。

### C . 研究結果

市販のヒト皮膚線維芽細胞を用いて、直接リプログラミングによって網膜細胞へ分化誘導した結果、視細胞特異的な光トランスダクション関連遺伝子の発現誘導がみられ（図1）、作製された誘導視細胞様細胞において、光応答（過分極反応）がみられた（図2）[1]。



図1 網羅的遺伝子発現解析の結果 CRX, NEUROD, RAX, OTX2 遺伝子を導入し、作製した誘導網膜視細胞様細胞において発現誘導された遺伝子を GO 解析した。

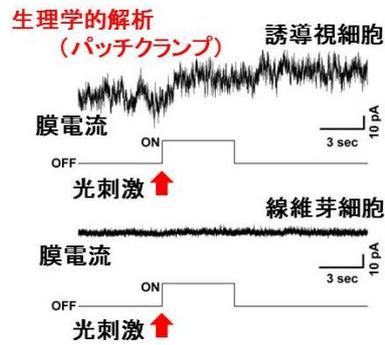


図2 パッチクランプによる光応答 CRX, NEUROD, RAX, OTX2 遺伝子を市販されているヒト皮膚線維芽細胞に導入し作製した誘導網膜視細胞様細胞において、暗黒化でパッチクランプを行った。光刺激による外向き電流（過分極）が観察された。

正常ボランティア由来の皮膚線維芽細胞を分化誘導した結果、上記同様、視細胞特異的な遺伝子の発現増加が見られ、4 因子の導入によって、安定的に EYS 遺伝子の発現誘導がみられた（図3）。

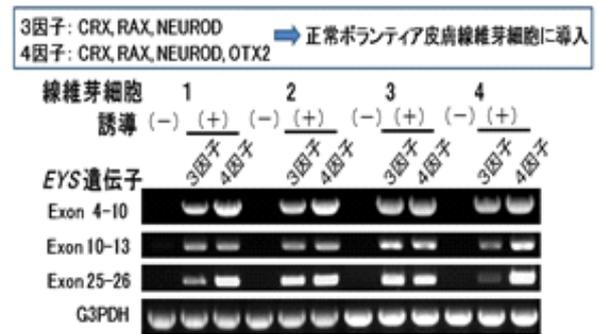


図3 正常ボランティアの皮膚線維芽細胞由来網膜視細胞様細胞における EYS 遺伝子の発現 3名のボランティアから採取した4種類の線維芽細胞の結果。線維芽細胞1は、ボランティア1の肘から採取。線維芽細胞2は、ボランティア1の頭部から採取。線維芽細胞3&4は、ボランティア2&3の肘から採取。4因子の導入によって、安定的に EYS 遺伝子の発現誘導がみられた。

arRP患者由来の皮膚線維芽細胞を分化誘導した結果、上記同様、視細胞特異的な遺伝子である EYS 遺伝子の発現増加が見られた。

arRP 患者由来の皮膚線維芽細胞から誘導された視細胞様細胞に発現された EYS 遺伝子 (cDNA) の解析の結果、ゲノム解析で得られた短縮型変異 (EYS-JM1) と一致した変異が見られた。その他

の変異については現在解析中である。

市販ヒト網膜mRNAからベクターキャッピング法を用いて完全長 cDNAライブラリーを作製できた。96クローンの5'端塩基配列を解析した結果、完全長含有率は67%であった。

#### D．考察

一般的なヒト体細胞であるヒト皮膚線維芽細胞に複数の転写因子遺伝子を導入すると視細胞特異的な*EYS*遺伝子の発現が早期に誘導されること、ゲノムに見られる短縮型変異が誘導視細胞におけるcDNAにも同様に見られることは、我々が初めて見つけた新知見であり、低コストの迅速診断法の開発に貢献できる可能性がある。今後は、cDNAの解析に加えて蛋白質レベルでの解析まで進める予定である。

#### E．結論

変性視細胞解析が、網膜色素変性症の迅速診断法の開発、病態の解明に有用であることが示唆された。

#### G．研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Seko Y, Azuma N, Ishii T, Komuta Y, Miyamoto K, Miyagawa Y, Kaneda M, Umezawa A. Derivation of human differential photoreceptor cells from adult human dermal fibroblasts by defined combinations of *CRX*, *RAX*, *OTX2* and *NEUROD*. *Genes Cells*. 19(3), 2014, p.198-208.

##### 2. 学会発表

- 1) 世古裕子、ヒト体細胞から網膜視細胞へのダイレクト・リプログラミングによる最終分化. 第6回網膜・リサーチ・ミーティング(RRM). JPタワーホール&カンファランス,東京, 2013-11-30.

#### H．知的財産権の出願・登録状況

( 予定を含む。 )

なし。

