

氏名 神崎 勇希
授与した学位 博士
専攻分野の名称 医学
学位授与番号 博 甲第 6240 号
学位授与の日付 2020年9月25日
学位授与の要件 医歯薬学総合研究科 機能再生・再建科学専攻
(学位規則第4条第1項該当)

学位論文題目 *KCNJ13* Gene Deletion Impairs Cell Alignment and Phagocytosis in Retinal Pigment Epithelium Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells
(ヒト人工多能性幹細胞由来網膜色素上皮において *KCNJ13* 遺伝子の欠損は細胞配列と貪食能を障害する)

論文審査委員 教授 大橋俊孝 教授 平沢 晃 准教授 寶田剛志

学位論文内容の要旨

Leber 先天黒内障 16 型(LCA16)は、網膜変性稀少疾患の一つで、内向き整流カリウムイオンチャンネル Kir7.1 をコードする *KCNJ13* 遺伝子の変異が原因である。しかし、なぜ Kir7.1 の機能不全により視細胞変性が生じるか、その病態は未解明である。そこで本研究では、LCA16 の病態解明を目的とし、ゲノム編集法を用いてヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) において *KCNJ13* 遺伝子を欠失させ、LCA16 モデル細胞を樹立した。

KCNJ13 遺伝子の標的部位に 2 つのガイド RNA を設計し、CRISPR/Cas9 システムにより hiPSC の *KCNJ13* 遺伝子(約 4.3kb)を欠失させた。その後、この *KCNJ13*-KO hiPSC を網膜色素上皮細胞(hiPSC-RPE)に分化させた。まず、*KCNJ13*-KO hiPSC-RPE には、BEST1 や CRALBP など RPE 分化マーカーは発現しているが、Kir7.1 タンパク質が発現していないことを確認した。次に、豚眼より視細胞外節(POS)を単離精製、蛍光色素標識した FITC-POS を用いて、hiPSC-RPE の貪食活性を評価した。さらに、hiPSC-RPE における貪食関連遺伝子の発現を定量ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)により評価した。その結果、*KCNJ13*-KO hiPSC-RPE の貪食活性と貪食関連遺伝子の発現は、野生型と比較して有意に低下していた。

本研究において LCA16 の hiPSC-RPE モデルを作製した。本研究結果から、Kir7.1 は RPE による視細胞外節の貪食に必要で、Kir7.1 が存在しないと視細胞外節の貪食障害が生じて視細胞変性を起こすことが示唆された。

論文審査結果の要旨

Leber 先天黒内障 16(LCA16)は、網膜変性稀少疾患の一つで、内向き整流カリウムチャンネル Kir7.1 をコードする *KCNJ13* 遺伝子の変異が原因である。しかし、本邦では患者がほとんどいない稀少疾患であり、なぜ Kir7.1 の機能不全により視細胞変性が生じるか、その病態は未解明である。

本研究では、ゲノム編集法を用いてヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)において *KCNJ13* 遺伝子を欠失させた *KCNJ13*-KO hiPSC を網膜色素上皮細胞(hiPSC-RPE)に分化させ LCA16 モデル細胞を樹立した。その結果、*KCNJ13*-KO hiPSC-RPE の貪食活性と貪食関連遺伝子の発現が野生型細胞と比較して優位に低下していた。

委員から、Kir7.1 の関与する貪食能メカニズムについて質問があり、視細胞外節の接着・取り込み・消化の 3 ステップいずれにも関与する可能性があるかと回答した。

本研究は、Kir7.1 は RPE による視細胞外節の貪食に必要で、Kir7.1 の機能不全では視細胞外節の貪食障害が生じて視細胞変性を起こすことを示唆し、稀少疾患である LCA16 の治療法の端緒となる価値のある業績と認める。

よって、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。