

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業  
事後評価報告書



## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 無虹彩症に生じる眼異常の発症機構の解明と治療法の開発  
(英語) Elucidation of pathogenesis and development of therapeutics in aniridia  
using disease-specific iPS cells

研究開発実施期間: 令和2年8月25日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 西田幸二  
(英語) Kohji Nishida

研究開発代表者 所属機関・部署・役職  
(日本語) 国立大学法人大阪大学・医学系研究科・教授  
(英語) Osaka University Graduate School of Medicine.

## II 研究開発の概要

### 研究開発の成果およびその意義等（和文）

研究対象である無虹彩症は、我々が取り組んできた厚労科研難治性疾患政策研究事業（平成 29 年～令和元年、研究代表者：西田幸二）により、2017 年に指定難病（329）に指定された疾患である。罹患率は 10 万人に 1 人程度の常染色体優性遺伝の疾患で、表現型として、出生時に虹彩の無形成・低形成、小眼球症、黄斑低形成を認め視力は通常 0.2 程度を維持するが、生後に角膜上皮幹細胞疲弊症による角膜混濁、白内障、緑内障が徐々に進行し、20 歳以降に失明に至る。

無虹彩症の原因遺伝子は転写因子 PAX6 である。PAX6 は 1991 年に Homeobox、Pairedbox を含む遺伝子としてクローニングされたが、当初ショウジョウバエにおいて異所的に眼を発生させる機能があることより、眼のマスターキー遺伝子としても知られ、哺乳類では眼の形態形成のほか、脳、すいβ細胞などの発生に重要であることが報告されている。さらに、どのように PAX6 遺伝子の異常が無虹彩症の様々な表現型を起こすのかはいまだ不明である。

我々は無虹彩症由来疾患特異的 iPS 細胞を用いて、眼の大きさ、角膜上皮幹細胞疲弊症、白内障、緑内障、黄斑低形成の無虹彩症に伴う各種眼病態の発症機序を SEAM 法を用いて解析を実施し、PAX6 を中心とした転写因子ネットワーク不全による無虹彩症に伴う各種眼病態の発症機序の解明を試みた。治療法の開発について無虹彩症は出生直後から小眼球症や黄斑低形成の症状が認められるが、その時点では視力 0.2 程度を維持している。一方、出生後から成人に至るにつれて、角膜上皮幹細胞疲弊症、白内障、緑内障が発症・徐々に進行し、成人になってから失明に至る。したがって、小眼球症や黄斑低形成は生後の介入が困難と考えられるが、本課題から得られた成果を利用することで角膜上皮幹細胞疲弊症、白内障、緑内障については発症抑制、進行抑制する薬剤の開発につながることが期待される。

本研究開発課題によって、疾患特異的 iPS 細胞を用いた無虹彩症に伴う角膜混濁、白内障、緑内障、眼の大きさ、黄斑低形成の各研究成果について以下に示す。

- ・無虹彩症患者由来 iPS 細胞の 6 例の樹立と寄託および PAX6 遺伝子編集株の作製

6 例の臨床情報が明らかになっている無虹彩症患者より同意のうえ末梢血を採取し、iPS 化のためのプラスミドを遺伝子導入したのちにクローニングを行って無虹彩症患者由来 iPS 細胞を樹立し、未分化マーカー発現、核型解析等の品質管理が完了した（図 1）。本研究事業では、当初の予定通り、患者 6 名から合計 55 株を樹立し、核型解析等の品質管理をクリアした計 18 株の無虹彩症患者由来疾患 iPS

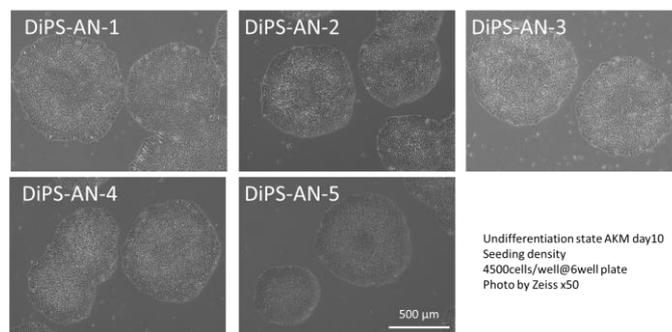


図 1. 樹立した無虹彩症患者由来 iPS 細胞の例

細胞を寄託した。201B7 株および 1383D2 株について、CRISPER/Cas9 システムによって PAX6 への変異導入により、PAX6 ヘテロノックアウト株の作製に成功した。それらの SEAM 形成は PAX6 ヘテロ KO 株では SEAM 径が小さくなり、さらに、PAX6 ノックアウト株では、ほとんど SEAM 形成が認められなかった。

- ・組織の大きさと PAX6 遺伝子量の時間空間的発現パターンの解析

ゲノム編集によって作製した PAX6 ヘテロノックアウト株の SEAM 分化誘導に関して、経時的とともに徐々に PAX6 の発現が低下することを確認した (図 2)。分化誘導 4 週目において SEAM 径および眼表面外胚葉マーカー、神経網膜原基マーカーの発現細胞について検討すると野生型株と比較して顕著に減少することがわかった。無虹彩症由来 SEAM も同様に眼表面外胚葉マーカーおよび神経網膜マーカー発現の減少が確認され、PAX6 遺伝子の変異箇所を健常者型に修復した iPS 細胞ではその表現型が回復した。これらのことから、無虹彩症における小眼球症の表現型を再現できうことが示唆された。

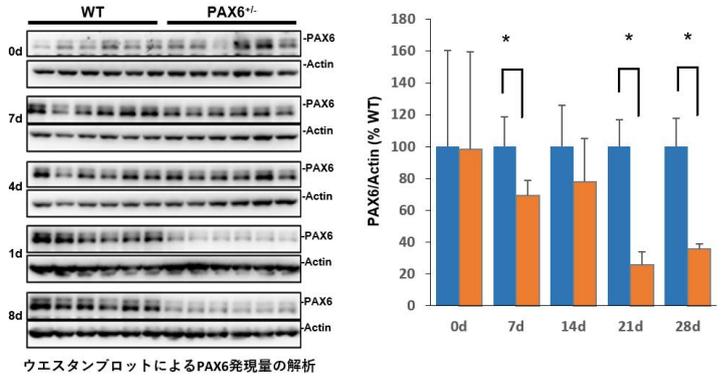


図 2. PAX6 の経時的な発現解析

#### ・無虹彩症に伴う角膜混濁の病態解明

SEAM 法を用いた角膜上皮前駆細胞の誘導効率は、健常者と比較して顕著に低下することが明らかになった (図 3)。さらに健常者由来および無虹彩症モデル由来角膜上皮前駆細胞の scRNA-seq 解析結果を比較すると、無虹彩症モデルにおいて一部のクラスターで角膜上皮マーカーの減少が認められた。さらにこれらの scRNA-seq を用いた角膜上皮の PAX6 を含む転写因子ネットワークに関連する遺伝子発現について検討するとその一部の転写因子やそれに関連する遺伝子遺伝子ネットワークを形成することが明らかになった。さらに薬剤スクリーニング系の確立に向けた準備として、野生型および PAX6 +/- -EGFP/p63-tdTomato-EGFP ダブルノックイン iPS 細胞を作製した。さらに、スクリーニングに用いる細胞培養系の検討を開始した。

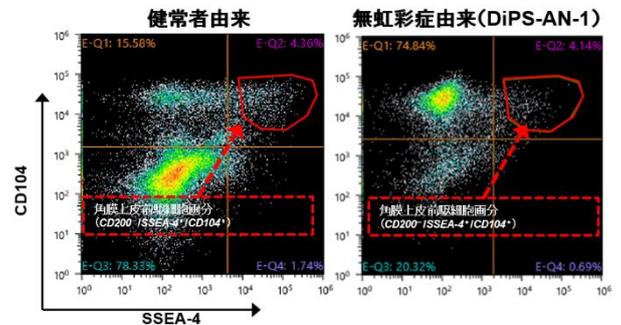


図 3. 角膜上皮前駆細胞の誘導効率

#### ・無虹彩症に伴う白内障の病態解明

本研究開発課題によって確立した新規水晶体分化誘導法 (特許出願準備中) により、無虹彩症患者由来 SEAM 内の水晶体数は健常者由来 SEAM と比較して数少なく、大きさも小さい傾向があり、無虹彩症に類似の表現型を示した。さらに、網羅的遺伝子発現解析の結果、無虹彩症由来 SEAM では水晶体発生および白内障と関連がある転写因子群の発現の低下が認められ、PAX6 発現低下に伴う水晶体関連転写因子の遺伝子発現量変化によって水晶体の大きさ、数を決定しうることが示唆された。

#### ・無虹彩症に伴う緑内障の病態解明

緑内障合併無虹彩症患者の線維柱帯サンプルを線維柱帯切除術施行時に回収し、広域電子顕微鏡による観察を行った。シュレム管は通常よりも断面積が小さいものの残存していたがシュレム管内皮細胞には変性がみられ、管壁の一部では細胞質の離断消失を認めた。また線維柱帯組織において基底膜様物質あるいは細胞外マトリックスの蓄積を認め、流出路抵抗の上昇に関係している可能性が示唆された。さらに無虹彩患者 SEAM 由来 conditioned medium は、野生型由来よりも顕著に増殖を増加させた。また、創薬探索の予備データから、無虹彩症患者 SEAM 由来の conditioned medium によって線維柱帯細胞の異

常増殖を抑制する効果がある化合物の候補（化合物 X）を見出すことに成功した。

・無虹彩症に伴う黄斑低形成の病態解明

PAX6+/- iPS（分化誘導開始後 12 週目）において、黄斑マーカー（CYP26A1）の発現が低下した。さらに CYP26A1C については PAX6 との共発現を確認し、黄斑マーカー候補とした。これだけでは不十分と考えられるため新たな候補検討を行った結果、複数の黄斑マーカー候補を選別し、SEAM 上での転写レベルでの時間的変化を明らかにしている。複数の黄斑マーカーについて、網膜に相当する SEAM 上での免疫組織化学的探索を実施した。

以上より、無虹彩症患者由来疾患特異的 iPS と我々の基盤技術である SEAM 法により、角膜混濁、白内障、緑内障、眼の大きさ、黄斑低形成の病態メカニズムの一端を解明できたと考えられる。これらのうち角膜混濁および緑内障では、創薬利用に向けた研究を開始した。本事業によって、無虹彩症患者から樹立した 6 ドナー 18 株を理研バイオリソースセンターに寄託した。本研究課題で樹立した疾患特異的 iPS 細胞株を利用することによって、今後さらに無虹彩症の研究が加速されることが期待される。

(英文)

Aniridia are rare genetic disorders characterized by the absence or underdevelopment of the iris, small eyes, foveal hypoplasia, and reduced visual acuity. It affects approximately one in 100,000 individuals and leads to progressive eye pathologies such as corneal opacity, cataracts, and glaucoma, eventually resulting in blindness after the age of 20 years.

Aniridia are caused by PAX6, which plays a crucial role in eye development. Our research aimed to understand how abnormalities in the PAX6 gene lead to the diverse phenotypes observed in aniridia. We used disease-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from patients with aniridia to investigate the mechanisms underlying various eye pathologies associated with this disorder.

Using a method called SEAM, we analyzed disease phenotypes such as corneal opacity, cataracts, glaucoma, eye size, and foveal hypoplasia. We focused on unraveling the dysfunction in the transcription factor network centered on PAX6, which contributes to the development of these eye conditions. Our ultimate goal was to develop therapeutic strategies that could suppress the onset and progression of aniridia-associated complications.

The research findings thus far include the following.

1. Establishment and characterization of aniridia patient-derived iPSCs: We collected peripheral blood samples from six patients with aniridia and successfully generated iPSCs from these samples. iPSCs were subjected to quality control assessments and deposited as disease-specific iPSCs derived from patients with aniridia.
2. Analysis of tissue size and PAX6 gene expression: During the differentiation of PAX6 heterozygous knockout cell lines, we observed a gradual decrease in PAX6 expression over time. This reduction in PAX6 expression correlates with abnormalities in tissue size and differentiation potential during eye development.
3. Corneal opacity: Using Aniridia patient-derived iPSCs, we generated corneal epithelial cells and found that they exhibited reduced transparency and abnormal morphology compared to control cells. Further analysis revealed disrupted corneal differentiation, as indicated by the changes in marker expression.
4. Cataract: Differentiated lens epithelial cells derived from aniridia patient-derived iPSCs show abnormal morphology, reduced transparency, and altered expression of lens-specific markers, indicating impaired lens development.
5. Glaucoma: Aniridia patient-derived iPSCs differentiated into trabecular meshwork cells and displayed altered cellular morphology and impaired functional properties compared with control cells. This suggests a potential mechanism for glaucoma development in aniridia.
6. Foveal hypoplasia: Aniridia patient-derived iPSCs were used to generate retinal organoids, revealing a significantly reduced foveal pit size and disrupted lamination compared to control organoids. Aberrant expression patterns of foveal-specific markers further indicate impaired foveal development.

We believe that disease-specific iPSCs derived from patients with aniridia and our basic

technology, the SEAM method, have revealed some of the pathological mechanisms of corneal opacity, cataracts, glaucoma, eye size, and macular hypoplasia. By understanding the role of PAX6 and its downstream pathways in eye development, we identified potential targets for therapeutic intervention to prevent or treat aniridia-associated complications.