

京都大学	博士（医学）	氏 名	大塚 悠生
論文題目	Phototoxicity avoidance is a potential therapeutic approach for retinal dystrophy caused by EYS dysfunction（光障害を避けることは EYS 機能障害による網膜変性の潜在的治療法である）		
（論文内容の要旨）			
遺伝性網膜ジストロフィー(Inherited retinal dystrophies (IRD))は遺伝子変異が原因で進行性に視細胞死が生じることにより、夜盲や視野狭窄、視力障害を起こす疾患群である。IRD は網膜色素変性に代表され、先進国において重度視機能障害や失明の主要な原因であり、本邦においても成人失明原因の第二位である。IRD の原因遺伝子はこれまで 280 以上の報告があるが、<i>Eyes shut homolog (EYS)</i> 遺伝子は本邦を含む多くの国で最多を占めている。<i>EYS</i> 遺伝子は 2008 年に網膜色素変性の原因遺伝子として初めて同定されたが、15 年以上経過した今でもなおその生理的機能や変異による病態は明らかになっていない。その主たる原因の一つとして、<i>EYS</i> はマウス、ラット等の哺乳類において欠損しており、哺乳類モデルが存在しない点が挙げられる。こうした背景から本研究では、<i>EYS</i> 関連網膜ジストロフィー患者から iPS 細胞を作製することで、その病態を明らかにすることを目的とした。 健常者と患者由来の iPS 細胞から網膜オルガノイドを作製した。両者のオルガノイドとも分化状態に明らかな差は認めず、180 日目までに微細構造物である内節、結合線毛、外節を持つ視細胞が形成された。健常、疾患オルガノイドの <i>EYS</i> 発現量に差は認めなかったが、<i>EYS</i> の細胞内局在は異なっていた。すなわち、健常視細胞では <i>EYS</i> は結合線毛や外節領域に優位に局在していたのに対し、疾患視細胞ではこれら領域の局在量が低下していた。<i>EYS</i> が結合線毛に優位に局在していた点から、<i>EYS</i> は特定タンパクの内節から外節への輸送に関与していると考えられた。そこで <i>EYS</i> と共通の哺乳類種で欠損を認める G-protein-coupled receptor kinase (GRK7)という分子に注目し評価を行った。免疫沈降により <i>EYS</i> と GRK7 は complex 形成することが示唆され、疾患オルガノイドにおいて GRK7 は外節への輸送量が低下していることを見出した。 GRK は視細胞外節において活性化オプシンを不活化し光反応を遮断する働きがあるため、GRK7 の外節への局在低下は過剰な光応答と、それによる光傷害を引き起こす可能性があると考えられた。網膜オルガノイドに光刺激を行った後に、光情報伝達カスケードを担う cyclic GMP の細胞内濃度を測定すると、健常と比べ疾患オルガノイドで有意に低下しており、過剰な光応答が生じていることが示唆された。また、光刺激時間を延長すると、疾患オルガノイドでは活性酸素(reactive oxygen species (ROS))が産生され、視細胞死が誘導されることがわかった。これらの GRK7 の局在異常や光暴露後の視細胞死は <i>ey</i>s ノックアウトゼブラフィッシュでも同様に確認された。さらに、視細胞死と関係する光の波長域を特定するために、より限局した波長光源(青、緑、赤色光)をオルガノイドに照射して細胞死を評価すると、同一照度下では青色光が最も光誘導性の視細胞死を引き起こしやすいということが分かった。 本研究では患者由来の網膜オルガノイドを用いることより、光刺激による細胞死が <i>EYS</i> 関連網膜ジストロフィーの病態に重要な役割を果たしていることが明らかになった。特定の波長光への暴露を遮断することが、患者治療の選択肢の一つになることが示唆された。			

（論文審査の結果の要旨） 遺伝性網膜ジストロフィー(Inherited retinal dystrophies (IRD))は進行性に視細胞死を生じる疾患群である。<i>Eyes shut homolog (EYS)</i> 遺伝子は IRD の原因遺伝子として高い割合を占めているが、哺乳類モデルが存在しないことによりその生理的機能や変異による病態は明らかとなっていなかった。 そこで、<i>EYS</i> 関連網膜ジストロフィー患者から作製した iPS 細胞を用いてその病態を明らかにすることを目的とし、本研究を実施した。 本研究では、健常者と患者由来の iPS 細胞から網膜オルガノイドを作製することで <i>EYS</i> の細胞内局在が異なっていることを見出した。また <i>EYS</i> と共通の哺乳類種で欠損を認める G-protein-coupled receptor kinase (GRK7)は complex 形成し、疾患オルガノイドにおいて GRK7 の外節への輸送が障害されていた。疾患オルガノイドでは、GRK 輸送障害に関連すると思われる、過剰な光応答と光刺激による視細胞死を生じ、これらの現象は <i>ey</i>s ノックアウトゼブラフィッシュでも確認された。 以上の研究は <i>EYS</i> 遺伝子関連網膜ジストロフィーの病態解明に貢献し、今後の同疾患の治療開発に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、令和6年5月10日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			