

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
総括研究報告書

患者由来iPS細胞を用いた加齢黄斑変性の病態解明・治療法の開発研究

研究代表者 辻川明孝 香川大学医学部教授

研究要旨

加齢黄斑変性（AMD）は欧米における社会的中途失明の大きな原因となっている。我が国でも以前は欧米に比して少数であったが、近年の生活環境の欧米化に伴い、失明原因の4位を占めており、なお増加中である。現在最も有効と考えられている治療法は、抗VEGF薬の硝子体内投与を中心とした薬物療法であるが、治療は生涯にわたり継続し、医療経済上の問題も無視できず、また治療効果は滲出型と呼ばれる病型に限定される。他方、我が国を代表として、網膜色素上皮細胞やその前駆細胞を移植することが治療として試みられているが、未だ十分な結果は出ておらず、更に滲出型AMDのみを対象としており、病型に依らない治療法の開発が望まれている。

これまでの疫学的研究から、早期AMDに特徴的な眼底所見であるドルーゼンという老廃物が、何らかの細胞機能低下を介してAMDの発症に関与することが分かっている。さらには、AMDモデル動物においてドルーゼンが多いこと、iPS細胞からドルーゼン様物質を産生させられること、などより、ドルーゼンがAMDの病態に関与し、創薬に際する評価系としての役割を果たせる可能性がある。平成26年度以降には、これまでサルAMDモデルに対して当科で検討を行ってきたVCP阻害剤を用いて、患者由来RPE細胞にドルーゼンを作成させてその形成能変化を見ることが、VCP阻害剤のAMD治療薬としての可能性模索、さらには早期AMDの病態解明へと繋げて行く。

研究分担者

吉村長久（京都大学大学院・教授）
平家俊男（京都大学大学院・教授）
垣塚 彰（京都大学大学院・教授）
山城健児（京都大学大学院・助教）
池田華子（京都大学大学院・助教）
後藤謙元（京都大学大学院・准教授）

A．研究目的

加齢黄斑変性（AMD）は先進国における社会的中途失明の最大の原因となっており、我が国でも近年急速に増加している疾患である。最近になって光線力学療法や硝子体注射薬といった治療方法が開発され、加療可能な疾患となってきたが、これらの治療方法の効果は視力を回復させるには十分ではない。また、この治療は生涯にわたり継続し、かつ高価な薬剤であるため、医療経済上の問題も無視できない。一方、20年以上前より欧米では、ヒト胎児由来網膜由来色素上皮細胞を始めとして細胞移植治療が行われてきたが、今後は倫理的な観点から継続不可能である。同様に、毛様体辺縁部幹細胞、虹彩色素上皮由来幹細胞などを用いた細胞移植治療も行われてきたが、いずれも評価に耐える報告はされていない。

近年、ヒトでのiPS細胞樹立が可能となり、倫理面、また細胞移植に重要な拒絶反応の問

題を乗り越えることの出来る新たな移植材料が登場した。現在我が国でも、神戸理研を中心として世界初の細胞移植治療が進行中であるが、対象疾患は滲出型のAMDのみである。実は、この滲出型AMDにおいては、抗VEGF薬の硝子体内投与が有効な治療方法として存在し、それとは反対に、欧米で多い病型である萎縮型AMDに対しては、現時点で有効な治療方法は無く、また細胞移植治療も多くは前者を対象としている。このため、AMDの病型によらない治療方法の開発が、全世界的に必要とされており、患者由来RPE細胞を取得できるiPS細胞技術は、後者の萎縮型黄斑変性、あるいは両者に共通する段階での治療研究として活用することが望ましい。

そこで我々は、早期加齢黄斑変性に着目し、その段階に特徴的なドルーゼンと呼ばれる沈着物を効果指標として、AMDの病態解明及び新規治療薬の開発を行う。上述した滲出型及び萎縮型AMDは、いずれも早期加齢黄斑変性から進展することが疫学的に知られており、ドルーゼンの形成を抑制することで、早期から後期への進展を防げる可能性がある。

これまでのドルーゼン研究では、マウスモデル(Ccr2欠損マウス)が研究され、種々の薬剤候補が検討されている。また近年サルAMDモデルが確立され、その組成がマウスに比してヒトに類似していることが分かっており、

当科ではVCP阻害剤を用いて、このAMDモデルサルのドルーゼン形成抑制・消失効果を有する可能性が分かりつつある。他方、患者由来iPS細胞を用いたドルーゼン研究という観点からは、近年ドルーゼン様物質の産生に成功したという報告があり、創薬の評価系としての役割に期待が持たれている。我々は、これら既報を発展させ、患者由来RPE細胞のドルーゼン産生能という観点から、AMDの病態解明と創薬研究を行っていく。

B．研究方法

京都大学医学部附属病院眼科を中心に、眼科臨床情報の取得できている患者・健常者を対象とする。具体的には、AMD感受性遺伝子であるARMS2およびCFH, C3, C2, CFB, ApoE遺伝子のうち、少なくとも2つ以上がリスクホモであり、かつ眼底に癒合軟性ドルーゼンを有する対象を患者群、同じく上記遺伝子の全てがノンリスクホモである眼底にドルーゼンを有さない対象を正常群とし、各々6名ずつを当科外来受診患者及び白内障手術目的での入院患者より選定。京都大学医学部医学部附属病院iPS細胞臨床開発部の指針(管理部：平家)に従い、患者への説明・同意取得を行う。

これら対象者から採取した皮膚線維芽細胞を用いたiPS細胞の作成は、京都大学iPS研究所(CiRA:Center for iPS Cell Research and Application)基盤技術研究部門の浅香研究所へ依頼し、OCT3/4, SOX2, KLF4, MYCの4因子導入によりiPS樹立を行う。

樹立後のiPS細胞は、Illumina社HumanOmni Express BeadChip Kitを用いた約80万個のSNP(Single nucleotide polymorphism)ジェノタイピングと、Illumina社HiSeq 100bpペアエンドリードを用いた高速エクソームシーケンシングを行い、上記6つの感受性遺伝子以外の遺伝子変異も可能な限り検討していく。これら遺伝学的解析は、京都大学大学院医学研究科 遺伝・ゲノム医学コース松田教授研究室に依頼する。

iPS細胞からRPE細胞への分化方法に関しては、当科池田助教を中心とした浮遊培養法(SFEB-DL法)を活用する。具体的には、5-10細胞塊を分化培地にて20日間浮遊培養、その後分化細胞塊を接着培養すると20-30日程度でRPE細胞の前駆細胞に分化し、さらに30-60日培養を持続すると敷石状で色素を持った細胞が出現する。これを顕微鏡下で採取し、更に培養を続けることで、単層シート状のRPE細胞が得られる。こうして取得したRPE細胞を用いて、分化後の長期培養状態(=加齢を模倣した状態)、遺伝子多型、細胞ストレス、などのRPE細胞機能に与える影響を、各種条件下(候補薬剤等)間での比較検討を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は京都大学医学部附属病院iPS細胞臨床開発部(管理部：平家)と協力して行っており、臨床におけるiPS細胞の活用は全て一元化して倫理委員会の承認を得ている。

皮膚検体の採取は皮膚科にて通常行われ

ているの皮膚生検と同様の方法で行われるため、採取方法は十分に安全性が確立されている。また、その採取行為を、上記iPS細胞臨床開発部に一括して依頼しており、採取に伴うリスクや、身体的・精神的不利益を最小限に抑える体制が整っている。

遺伝子解析結果の研究利用による倫理的・法的・社会的不利益に関しては、匿名化・情報管理の体制により防止する。遺伝子解析を行うことに伴う心理的不利益に対してはヒト由来試料等採取機関により相談・情報提供の機会を提供する。

C．研究結果

癒合ドルーゼン患者及び正常人からのiPS細胞樹立に関して：ARMS2及びCFH, C3, C2, CFB, ApoE遺伝子のうち、少なくとも2つ以上がリスクホモである癒合軟性ドルーゼンを有する患者を当科外来受診患者より6名、同じく上記遺伝子のすべてがノンリスクホモである眼底正常人6名を当科外来受診患者及び白内障手術目的での入院患者より選定した(辻川、山城、吉村)。京都大学医学部附属病院iPS細胞臨床開発部の協力(平家)により、患者への説明・同意取得を実施、後日文書にて患者4名、正常眼2名の同意を取得した。これら対象者に対し、iPS細胞臨床開発部の担当医師により皮膚組織採取、その後京都大学iPS研究所(CiRA: Center for iPS Cell Research and Application)基盤技術研究部門の浅香研究所へ依頼し、OCT3/4, SOX2, KLF4, MYCの4因子導入によりiPS細胞樹立開始、現在までに1名分のiPS細胞8ラインの譲渡を受けている。また、iPSからRPEへの分化後のRPE細胞機能評価の予備実験として、市販されているヒトRPE細胞(ARPE19)の蛍光ビーズを用いた貪食能実験や、これを小胞体ストレス惹起物質であるツニカマイシン添加、及びツニカマイシン添加+VCP阻害剤添加による貪食能変化について検討を行っている。iPSからRPEへの分化の予備実験としては、眼科所見の無いヒトiPS細胞を用いて、眼科池田を中心として開発した分化方法により、当実験室でもRPEへの効率的な分化に成功している(池田、山城、後藤、垣塚)。

D．考察

ドルーゼンの主な構成物質は脂質・補体であり、これは当科にてドルーゼンの有無を表現型として網羅的感受性遺伝子探索を行った結果、ApoE, LIPCなどの脂質感受性遺伝子や、CFH, C2, C3などの補体関連遺伝子が有力候補として上がってきたことと一致する。我々は、ドルーゼンの産生とAMDの発症が異なる段階であり、別個の要因に規定されているという可能性を考えている。今後、疾患由来iPS細胞からRPE細胞への分化に成功できれば、ドルーゼンの病態研究を通して、AMDの病態解明と創薬に繋がることが考えられる。

E．結論

AMD患者由来のiPS細胞を用いて、体外で患

者由来RPE細胞を取得し、ドルーゼン形成能を通してAMDの病態解明・創薬が可能となると考えられる。

F . 健康危険情報
健康危険なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Ueda-Arakawa N, Ooto S, Ellabban AA, Takahashi A, Oishi A, Tamura H, Yamashiro K, Tsujikawa A, Yoshimura N. Macular Choroidal Thickness and Volume of Eyes with Reticular Pseudodrusen Using Swept-Source Optical Coherence Tomography. *Am J Ophthalmol*, in press.
2. Miyake M, Yamashiro K, Akagi-Kurashige Y, Kumagai K, Nakata I, Nakanishi H, Oishi A, Tsujikawa A, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N. Vascular endothelial growth factor gene and the response to anti-vascular endothelial growth factor treatment for choroidal neovascularization in high myopia. *Ophthalmology* 2014;121:225-233.
3. Ueda-Arakawa N, Ooto S, Tsujikawa A, Yamashiro K, Oishi A, Yoshimura N. Sensitivity and specificity of detecting reticular pseudodrusen in multimodal imaging in Japanese patients. *Retina* 2013;33:490-497.
4. Ueda-Arakawa N, Ooto S, Nakata I, Yamashiro K, Tsujikawa A, Oishi A, Yoshimura N. Prevalence and genomic association of reticular pseudodrusen in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2013;155:260-269 e262.
5. Ooto S, Ellabban AA, Ueda-Arakawa N, Oishi A, Tamura H, Yamashiro K, Tsujikawa A, Yoshimura N. Reduction of retinal sensitivity in eyes with reticular pseudodrusen. *Am J Ophthalmol* 2013;156:1184-1191 e1182.
6. Ogino K, Tsujikawa A, Yamashiro K, Ooto S, Oishi A, Nakata I, Miyake M, Yoshimura N. Intravitreal injection of ranibizumab for recovery of macular function in eyes with subfoveal polypoidal choroidal vasculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:3771-3779.
7. Ogino K, Tsujikawa A, Yamashiro K, Ooto S, Oishi A, Nakata I, Miyake M, Takahashi A, Ellabban AA, Yoshimura N. Multimodal evaluation of macular function in age-related macular degeneration. *Jpn J Ophthalmol* 2014;58:155-165.
8. Nakata I, Yamashiro K, Nakanishi H, Akagi-Kurashige Y, Miyake M, Tsujikawa A, Matsuda F, Yoshimura N. Prevalence and characteristics of age-related macular degeneration in the Japanese population: the Nagahama study. *Am J Ophthalmol* 2013;156:1002-1009 e1002.
9. Nakata I, Yamashiro K, Kawaguchi T, Gotoh N, Nakanishi H, Akagi-Kurashige Y, Miyake M, Tsujikawa A, Oishi A, Saito M, Iida T, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N. Association between the cholesteryl ester transfer protein gene and polypoidal choroidal vasculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:6068-6073.
10. Nakata I, Tsujikawa A, Yamashiro K, Otani A, Ooto S, Akagi-Kurashige Y, Ueda-Arakawa N, Iwama D, Yoshimura N. Two-year outcome of photodynamic therapy combined with intravitreal injection of bevacizumab and triamcinolone acetonide for polypoidal choroidal vasculopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2013;251:1073-1080.
11. Miyake M, Yamashiro K, Nakanishi H, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Kumagai K, Oishi M, Tsujikawa A, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Yoshimura N. Evaluation of pigment epithelium-derived factor and complement factor I polymorphisms as a cause of choroidal neovascularization in highly myopic eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:4208-4212.
12. Nakagawa S, Yamashiro K, Tsujikawa A, Otani A, Tamura H, Ooto S, Yoshimura N. The Time Course Changes of Choroidal Neovascularization in Angioid Streaks. *Retina*. 2013;33:825-833.
13. Miyake M, Yamashiro K, Nakanishi H, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Tsujikawa A, Motiyama M, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N. Insulin-like Growth Factor 1 Is Not Associated with High Myopia in a Large Japanese Cohort. *Mol Vis*. 2013;19:1074-1081.

14. Khor CC, Miyake M, Chen LJ, Shi Y, Barathi VA, Qiao F, Nakata I, Yamashiro K, Zhou X, Tam PO, Cheng CY, Tai ES, Vithana EN, Aung T, Teo YY, Wong TY, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Matsuda F; Nagahama Study Group, Yong RY, Yap EP, Yang Z, Pang CP, Saw SM, Yoshimura N. Genome-wide association study identifies ZFH1B as a susceptibility locus for severe myopia. *Hum Mol Genet.* 2013;22:5288-5294.
 15. Kimura Y, Hangai M, Matsumoto A, Akagi T, Ikeda HO, Ohkubo S, Sugiyama K, Iwase A, Araie M, Yoshimura N. Macular Structure Parameters as an Automated Indicator of Paracentral Scotoma in Early Glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 2013;156:907-917
 16. Takayama K, Hangai M, Kimura Y, Morooka S, Nukada M, Akagi T, Ikeda HO, Matsumoto A, Yoshimura N. Three-dimensional imaging of lamina cribrosa defects in glaucoma using swept-source optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;18;54:4798-807.
 17. Nakano N, Hangai M, Noma H, Nukada M, Mori S, Morooka S, Takayama K, Kimura Y, Ikeda HO, Akagi T, Yoshimura N. Macular imaging in highly myopic eyes with and without glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 2013;156:511-523.
 18. Akagi T, Hangai M, Kimura Y, Ikeda HO, Nonaka A, Matsumoto A, Akiba M, Yoshimura N. Peripapillary scleral deformation and retinal nerve fiber damage in high myopia assessed with swept-source optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol.* 2013;155:927-936.
 19. Takayama K, Ooto S, Hangai M, Ueda-Arakawa N, Yoshida S, Akagi T, Ikeda HO, Nonaka A, Hanebuchi M, Inoue T, Yoshimura N. High-resolution imaging of retinal nerve fiber bundles in glaucoma using adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy. *Am J Ophthalmol.* 2013 May;155:870-881.
 20. Sasaoka N, Sakamoto M, Kanemori S, Kan M, Tsukano C, Takemoto Y, Kakizuka A. Long-term oral administration of hop flower extracts mitigates Alzheimer phenotypes in mice. *PLoS One.* 9:e87185, 2014.
 21. Tanaka T, Nagashima K, Inagaki N, Kioka H, Takashima S, Fukuoka H, Noji H, Kakizuka A, Imamura H. Glucose-stimulated Single Pancreatic Islets Sustain Increased Cytosolic ATP Levels during Initial Ca²⁺ Influx and Subsequent Ca²⁺ Oscillations. *J Biol Chem.* 289:2205-2216, 2014.
 22. Yasuda K, Ohyama K, Onga K, Kakizuka A, Mori N. Mdm20 Stimulates PolyQ Aggregation via Inhibiting Autophagy Through Akt-Ser473 Phosphorylation. *PLoS One.* 8:e82523, 2013.
 23. Kimura Y, Fukushi J, Hori S, Matsuda N, Okatsu K, Kakiyama Y, Kawawaki J, Kakizuka A, Tanaka K. Different dynamic movements of wild-type and pathogenic VCPs and their cofactors to damaged mitochondria in a Parkin-mediated mitochondrial quality control system. *Genes Cells.* 18:1131-1143, 2013.
 24. Tsuyama T, Kishikawa J, Han YW, Harada Y, Tsubouchi A, Noji H, Kakizuka A, Yokoyama K, Uemura T, Imamura H. In Vivo Fluorescent Adenosine 5'-Triphosphate (ATP) Imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* by Using a Genetically Encoded Fluorescent ATP Biosensor Optimized for Low Temperatures. *Anal Chem.* 85:7889-7896, 2013.
 25. Ehrlich AT, Furuyashiki T, Kitaoka S, Kakizuka A, Narumiya S. Prostaglandin E Receptor EP1 Forms a Complex with Dopamine D1 Receptor and Directs D1-Induced cAMP Production to Adenylyl Cyclase 7 through Mobilizing G Subunits in Human Embryonic Kidney 293T Cells. *Mol Pharmacol.* 84:476-486, 2013.
2. 学会発表
Kyoko Kumagai, Kenji Yamashiro, Masahiro Miyake, Munenitsu Yoshikawa, Isao Nakata, Yumiko Akagi-Kurashige, Akitaka Tsujikawa, Ching Yu Cheng, Chiea-Chuen Khor, Nagahisa Yoshimura. Genome wide analysis for loci associated with the bilaterality of

age-related macular degeneration. ARVO
annual meeting. 2013.5.5-9. Seattle,
USA

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

1: 発明名称：眼疾患処置薬

PCT出願番号：PCT / JP2014 / 053898

PCT出願日：2014年（平成26年）2月19日

垣塚彰、堀清次、池田華子、吉村長久、
村岡勇貴、他 2 名

2: 発明名称：虚血性眼疾患処置薬

出願日：2014年（平成26年）2月28日

垣塚彰、池田華子、吉村長久、畑匡侑