

早期加齢黄斑変性(ドルーゼン)の遺伝的・環境的リスクファクターの研究

研究分担者 吉村長久 京都大学大学院医学研究科教授

研究要旨

加齢黄斑症、特に後期加齢黄斑症は先進諸国での失明原因の上位を占める重要な疾患のひとつである(わが国における失明原因の第3位：平成18年度厚生労働省網膜脈絡膜委縮症調査研究班報告に基づく)。わが国においてもその有病率は増加しており、より深い病態把握と病因解明が望まれている。

これまでの研究により、後期加齢黄斑症はその発病に環境因子と遺伝因子が関係する多因子疾患であることがわかっており、環境因子として喫煙や食事内容などが、遺伝因子としてCFH遺伝子多型やARMS2遺伝子多型などがリスクファクターとして報告されている。一方で、早期加齢黄斑症のリスクファクターに関する研究は少ないため、後期加齢黄斑症へ移行する前段階における病態は未だ不明な点が多く、疾病の予防を困難にさせている。

我々は、日本人における早期・後期加齢黄斑症の病態理解と病因解明を目指し、ながはま0次予防コホート事業における健康診断(以下0次健診)を通じて、早期加齢黄斑症(ドルーゼン)に関する遺伝的・環境的リスクファクターを検討し、治療の難しい後期加齢黄斑症に移行する前段階での予防法を考察する。

A．研究目的

加齢黄斑症は、その病期により早期加齢黄斑症と後期加齢黄斑症に分けられ、視力障害を引き起こす後期加齢黄斑症の前駆段階として早期加齢黄斑症(ドルーゼン)が発症することが知られている。これまでに後期加齢黄斑症のリスクファクターとして様々な因子(喫煙、年齢、遺伝因子など)が報告されているが、早期加齢黄斑症に関する報告は少なく、前駆段階における加齢黄斑症の予防および病態は不明な点が多い。そのため、前駆段階から治療の必要な後期加齢黄斑症への進行を防ぐことができず、結果的に医療費の増大を招いている。今回、我々は多数の日本人を対象として早期加齢黄斑症(ドルーゼン)のリスクファクターについて多数の因子を検討したので報告する。

B．研究方法

対象症例として、2008年から2010年の間にながはま0次予防コホート事業に参加した50歳以上の一般健常日本人6,118人のうち、AREDSスケールに基づいて両眼眼底写真を判定された971人のドルーゼン症例と3,209人の正常例を用いた。それぞれの症例につき、身体測定を含めた全身因子、各種血液・生化学検査、尿検査、免疫検査、内分泌・アレルギー検査を含めた合計60項目の因子について検査を行い、結果を取得

した。また、遺伝因子については抽出したDNAを用いて後期加齢黄斑症のリスクファクターとして既に報告があるARMS2遺伝子多型(A69S)およびCFH遺伝子多型(Y402HおよびI62V)の遺伝子型を決定した。さらに、環境因子として喫煙歴およびブリンクマン係数をアンケートにより取得し用いた。これら全ての項目(計65項目)に対して、まず症例対照間の単純比較によりスクリーニングを行った。その後、スクリーニングにて相関を示した項目を選定、独立変数間の相関の高い項目を除外し、最終的にステップワイズ変数減少法を用いてロジスティック回帰分析を行い、それぞれの因子の発症寄与度を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究計画は、京都大学医の倫理委員会、長浜市審査会とも承認を得ている。遺伝子解析結果自体による倫理的・法的・社会的不利益は匿名化・情報管理の体制により防止する。

C．研究結果

検討を行った65項目の中で、ドルーゼン発症に強い関与を示したのは、血清カルシウム(オッズ比0.932, $P = 1.05 \times 10^{-3}$)、ARMS2 A69S(rs10490924)遺伝子多型(オッズ比1.046, $P < 0.001$)、*Chlamydia pneumoniae* IgG(オッズ比1.020, $P =$

0.0440)、年齢(オッズ比1.013, $P < 0.001$)であった。特に、低カルシウム血症がドルーゼン群の7.2%に認められ、正常群の5.5%と比較して有意に高率であった($P = 0.0490$)。また、*Chlamydia pneumoniae*感染はドルーゼン群では56.4%に認められ、正常群の51.7%と比較して有意に高率であった。

D. 考察

日本人の早期加齢黄斑症発症に血清カルシウム、*ARMS2* A69S 遺伝子多型、*Chlamydia pneumoniae*感染、年齢が強く関与することがわかった。この中で、*ARMS2* 遺伝子多型、*Chlamydia pneumoniae*感染、年齢は後期加齢黄斑症のリスクファクターとして既に報告があるが、これまでにカルシウム摂取・代謝異常をリスクファクターとして挙げた報告はない。カルシウムはドルーゼンを構成する物質として多く含まれることが知られており、今後カルシウムと加齢黄斑変性症発症との関連を詳細に検討する必要がある。

E. 結論

日本人の大規模コホートを用いて早期加齢黄斑症のリスクファクターを網羅的に検討することができた。今後、追跡調査を組み合わせることにより、日本人における加齢黄斑症発症のメカニズム及び危険因子を解明することが期待される。

F. 健康危険情報

健康危険なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakata I, Yamashiro K, Kawaguchi T, et al. Calcium, *ARMS2* Genotype, and *Chlamydia Pneumoniae* Infection in Early Age-Related Macular Degeneration: a Multivariate Analysis from the Nagahama Study. *Sci Rep.* in press.
2. Kumagai K, Tabara Y, Yamashiro K, Miyake M, Akagi-Kurashige Y, Oishi M, Yoshikawa M, Kimura Y, Tsujikawa A, Takahashi Y, Setoh K, Kawaguchi T, Terao C, Yamada R, Kosugi S, Sekine A, Nakayama T, Matsuda F, Yoshimura N. Central blood pressure relates more strongly to retinal arteriolar narrowing than brachial blood pressure: the Nagahama Study. *J Hypertens* 2015;33:323-329.
3. 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.

2. 学会発表 なし

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 なし

ドルーゼンを持つ患者および正常人からのiPS細胞作成およびRPEへの分化誘導

研究分担者 平家俊男 京都大学大学院医学研究科教授
池田華子 京都大学大学院医学研究科准教授

研究要旨

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遺伝子のリスクホモである癒合軟性ドルーゼンを有する患者を眼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名を眼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。これらの対象者に対し、皮膚組織採取し、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3名分のiPS細胞8ラインの樹立に成功している。樹立したiPS細胞から遊培養法(SFEB-DL法)によりRPE細胞への分化を行った。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細胞が得られた。

A. 研究目的

癒合ドルーゼン患者及び正常人からのiPS細胞を樹立し、浮遊培養法を用いて、iPS細胞からRPE細胞への分化誘導を行う。

B. 研究方法

癒合ドルーゼン患者及び正常人のうち、同意を得られた6名に対して皮膚組織を採取し、iPS細胞樹立OCT3/4, SOX2, KLF4, MYCの4因子導入によりiPS細胞樹立を行う。樹立されたiPS細胞を用いて、浮遊培養法による、RPE細胞への分化誘導を行い、シート状のRPE細胞を作成する。

（倫理面への配慮）

本研究計画は、京都大学医の倫理委員会、長浜市審査会とも承認を得ている。遺伝子解析結果自体による倫理的・法的・社会的不利益は匿名化・情報管理の体制により防止する。

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。京都大学医学部附属病院iPS細胞臨床開発部により、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。これらの対象者に対し、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3名分のiPS細胞8ラインの樹立に成功した。

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細胞が得られた。

D. 考察

癒合ドルーゼン患者及び正常人6名に対して皮膚組織を採取し、OCT3/4, SOX2, KLF4, MYCの4因子導入によりiPS細胞の樹立が可能であった。iPS細胞樹立に際しては、当初、平成25年度に疾患iPS細胞株、健全iPS細胞株各々6株ずつの樹立予定であったが、疾患株樹立が難航している。皮膚採取を行った患者が高齢であったことが原因と考えられる。樹立及び分化がしばしば困難である状況を鑑み、遺伝解析の対象サンプルを変更する予定である

細胞株により、分化期間が異なるものの、正常および疾患iPS細胞株から純度の高いRPE細胞シートを作成することが可能であった。

E . 結論

癒合ドレーゼン患者及び正常人6名に対して皮膚組織から、iPS細胞を作製し、RPE細胞への分化に成功した。今後、疾患由来RPE細胞を用いることで、遺伝要因がRPE細胞機能に与える影響を評価することが可能となる。

F . 健康危険情報

健康危険なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Muraoka Y, Ikeda HO*, Nakano N, Hangai M, Toda Y, Okamoto-Furuta K, Kohda H, Kondo M, Terasaki H, Kakizuka A, Yoshimura N. Real-time imaging of rabbit retina with retinal degeneration by using spectral-domain optical coherence tomography. *PLoS One* 7, e36135, 2012.

2. 学会発表

なし

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

なし

サルでのVCP阻害剤のドルーゼンに対する効果の検討

研究分担者 垣塚彰 京都大学大学院生命科学研究科教授

研究要旨

眼底にドルーゼンを認めるカニクイザル5匹に対し、KUS化合物を経口投与することで、ドルーゼンの抑制効果の有無、およびKUS化合物内服による全身状態への影響を評価した。ドルーゼンの抑制効果は明らかなものは無かったものの、わずかに減少と判定されるものがあった。投薬期間中の全身、眼の副作用は認められず、眼・主要臓器の組織像にも投薬による影響は認められなかった。

A．研究目的

加齢黄斑変性は滲出型には抗VEGF薬などによる治療が可能であるが、治療後、元の視機能への回復はほぼ不可能である。また、萎縮型には有効な治療法が一切存在しない。よって、加齢黄斑変性の前駆病態であるドルーゼン期に、ドルーゼンの消失、増加の抑制などの介入が出来れば非常に意義深い。我々は、眼底にドルーゼン様沈着物を認めるCcr2欠損マウスに対してVCP阻害剤であるKUS化合物を投与することによって、このドルーゼン様沈着物の抑制効果を明らかにしつつある。このKUS化合物を、ヒトに近い、眼底にドルーゼンを持つサルへ投与することにより、ドルーゼンが抑制されるか検討することと、KUS化合物内服による全身状態への影響を評価することを目的とした。

B．研究方法

眼底にドルーゼンを認めるカニクイザル5匹に対し、KUS化合物を10mg/kg/dayから経口投与した。うち1匹は、5カ月目に投薬を中断、残りの4匹は、5カ月目～9ヶ月目まで投薬した。9ヶ月目まで投薬した4匹のうち2匹は、5ヶ月目から20mg/kg/dayに投薬量を増加した。0,3,6,9カ月目に眼底写真を撮影、血液検査、尿検査を施行した。評価終了時点で安楽死させ、眼球その他主要臓器の組織像を評価した。

（倫理面への配慮）

本研究計画は、京都大学医の倫理委員会、長浜市審査会とも承認を得ている。遺伝子解析結果自体による倫理的・法的・社会的不利益は匿名化・情報管理の体制により防止する。

C．研究結果

経過観察期間中、ドルーゼンの増加は認めなかった。また、ドルーゼンの抑制効果は明らかなものは無かったものの、わずかに減少と判定されるものがあった。投薬期

間中の全身、眼の副作用は認められず、眼・主要臓器の組織像にも投薬による影響は認められなかった。

D．考察

ヒトに近いサルへのKUS化合物の全身投与にて、明らかな副作用は認めず、KUS化合物の一定の安全性が示唆された。

E．結論

KUS化合物のサルドルーゼンに対する薬効は限られた観察期間のため、判定が困難である。安全性については一定のものが示唆され、ヒトへの応用が期待できる。

F．健康危険情報

健康危険なし

G．研究発表

1. 論文発表

1. Ikeda HO, Sasaoka N, Koike M, Nakano N, Muraoka Y, Toda Y, Fuchigami T, Shudo T, Iwata A, Hori S, Yoshimura N, Kakizuka A. Novel vcp modulators mitigate major pathologies of rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa. *Sci Rep* 4, 5970, 2014.

2. 学会発表

なし

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

患者から作成したRPEの機能・代謝評価

研究分担者 山城健児 京都大学大学院医学研究科講師
研究分担者 後藤謙元 京都大学大学院医学研究科准教授

研究要旨

患者から作成したRPE機能評価・代謝評価のための実験系を確立するため、ヒト網膜色素上皮細胞由来の培養細胞であるARPE19細胞を用いて形態評価・機能評価・代謝評価を行った。蛍光ラテックスビーズを用いた貪食能評価、フルオレセイン標識した豚視細胞外節を用いた貪食能評価、トリチウム標識ロイシンを用いたタンパク質代謝能評価を行った。電子顕微鏡により分化RPE細胞のapical側に微絨毛が存在し、タイトジャンクションおよび細胞質には豊富なメラニン顆粒を含んでおり、成熟した分化RPE細胞であることを確認した。

A．研究目的

加齢黄斑変性(AMD)の病態の一つとして、網膜色素上皮細胞(RPE)の機能低下が考えられている。また、加齢黄斑変性症の発症には、環境要因とともに遺伝的要因も大きく関わっていることが明らかとなってきた。ARMS2/HTRA1遺伝子やCFH遺伝子の一塩基多型(SNP)がAMDと特に強い相関を持つことが報告されており、これらのSNPを有するAMD患者由来のiPS細胞からRPEを作成し、RPEの機能・代謝を評価し、正常対照と比較することにより、AMDリスク遺伝子変異のRPE機能に及ぼす影響を評価し、AMDの病態の解明につなげることを目的とする。

B．研究方法

RPE機能評価・代謝評価の実験系確立のため、まずはヒトRPE由来培養細胞であるARPE19を用いて実験を行った。

ARPE19細胞の培地中に蛍光ラテックスビーズを投与し、3時間後、8時間後に培地を交換し、細胞中に取り込まれた蛍光ビーズを蛍光顕微鏡により観察、その後フローサイトメトリーを用いて貪食量、貪食細胞率を定量評価した。

より生理的な貪食能評価のため、豚網膜から単離した視細胞外節にフルオレセイン標識を行い、同様に貪食能を定性的、定量的に評価した。

タンパク質代謝能評価のため、培地中にトリチウム標識したロイシンを加え、72時間経過後にトリチウムフリーの培地に替え、その後24時間、48時間、72時間後の培地をサンプルとして、液体シンチグラフィで定量し、タンパク質代謝の状態を評価した。

また、分化RPE細胞を2か月間培養し、電子顕微鏡で細胞の形態評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究計画は、京都大学医の倫理委員会、長浜市審査会とも承認を得ている。遺伝子解析結果自体による倫理的・法的・社会的不利益は匿名化・情報管理の体制により防止する。

C．研究結果

ARPE19細胞において蛍光ビーズの細胞内への取込みを確認した。小胞体ストレス誘導薬であるタプシガルジンやツニカマイシンを投与した群では、有意にビーズ取込みの低下を認めた。フルオレセイン標識豚視細胞外節を用いた貪食評価においても同様の結果であった。トリチウムラベルロイシンを用いたたんぱく代謝評価では、経時的なタンパク質代謝産物の排出を定量評価することが可能であった。小胞体ストレス誘導薬の投与による有意な代謝量の変化は認めなかった。

電子顕微鏡により分化RPE細胞のapical側に微絨毛が存在し、タイトジャンクションおよび細胞質には豊富なメラニン顆粒を含んでおり、成熟した分化RPE細胞であることを確認した。

D．考察

AMDの病態の一つとしてRPEへの小胞体ストレスの関与が考えられている。本研究において小胞体ストレスによりRPEの貪食能の低下を引き起こすことが明らかとなった。

E．結論

RPEの形態評価・機能評価、代謝評価のための実験系を確立した。

今後、視細胞外節の代謝評価系の確立、

疾患由来RPEを用いた機能評価を行い、AMDの遺伝的要因がRPE機能・代謝に及ぼす影響を明らかにしていきたい。

F．健康危険情報
健康危険なし

G．研究発表
1. 論文発表
なし

2. 学会発表

なし

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
なし

