

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（障害者対策総合研究開発事業（感覚器障害分野））

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

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 辻川 明孝

平成27（2015）年 5月

目 次

I . 総括研究報告

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 辻川 明孝	-----	4
--	-------	---

II . 分担研究報告

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 吉村 長久	-----	8
---	-------	---

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 平家俊男 池田華子	-----	10
---	-------	----

サルでのVCP阻害剤のドルーゼンに対する効果の検討 垣塚 彰	-----	12
-----------------------------------	-------	----

患者から作成したRPEの形態・機能・代謝評価 山城健児 後藤謙元	-----	14
-------------------------------------	-------	----

III . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	16
----------------------	-------	----

IV . 研究成果の刊行物・別刷	-----	19
------------------	-------	----

障害者対策総合研究事業（障害者対策総合研究開発事業（感覚器障害分野））
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、網膜色素上皮（RPE）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27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で、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・講師）
池田華子（京都大学大学院・准教授）
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、これら既報を進展させ、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HumanOmniExpress BeadChip Kitを用いた約80万個のSNP(Single nucleotide polymorphism)ジェノタイプピングと、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スを行い、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日培養を継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ラインの譲渡を受けている。うち健常および疾患株の2株がRPE細胞へ分化させることに成功した。更に、分化RPE細胞の形態評価として、電子顕微鏡によりRPEの微絨毛やタイトジャンクションおよびメラニン顆粒などを確認した。

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培養細胞(ARPE細胞)

を用いて人工ビーズや蛍光色素ラベル豚視細胞外節を用いた貪食能および放射性ヨードラベルロイシンを用いた代謝能評価系を確立した。小胞体ストレス惹起物質であるツニカマイシンをARPE細胞に負荷することにより、人工ビーズや豚眼視細胞外節の貪食能の低下が確認され、小胞体ストレスによりRPE細胞の機能障害を引き起こすことが明らかとなった。現在、ツニカマイシン添加によるRPE細胞機能障害に対する、VCP阻害剤の効果について検討を行っている（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iPS細胞由来RPEを用いて、遺伝子多型の引き起こすRPE細胞機能変化を詳細に検討する予定であり、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* 2014;157:994-1004.
2. 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.
3. Miyake M, Tsujikawa A, Yamashiro K, Ooto S, Oishi A, Tamura H, Nakata I, Matsuda F, Yoshimura N. Choroidal neovascularization in eyes with choroidal vascular

hyperpermeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:3223-3230.

4. Kuroda Y, Tsujikawa A, Ooto S, Yamashiro K, Oishi A, Nakanishi H, Kumagai K, Hata M, Arichika S, Ellabban AA, Yoshimura N. Association of focal choroidal excavation with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:6046-6054.
5. Kawashima Y, Oishi A, Tsujikawa A, Yamashiro K, Miyake M, Ueda-Arakawa N, Yoshikawa M, Takahashi A, Yoshimura N. Effects of aflibercept for ranibizumab-resistant neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014.
6. Hata M, Tsujikawa A, Miyake M, Yamashiro K, Ooto S, Oishi A, Nakata I, Takahashi A, Yoshimura N. Two-year visual outcome of polypoidal choroidal vasculopathy treated with photodynamic therapy combined with intravitreal injections of ranibizumab. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014.
7. Hata M, Tsujikawa A, Miyake M, Yamashiro K, Ooto S, Oishi A, Nakanishi H, Takahashi A, Yoshimura N. Two-year visual outcome of ranibizumab in typical neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014.
8. Hata M, Oishi A, Tsujikawa A, Yamashiro K, Miyake M, Ooto S, Tamura H, Nakanishi H, Takahashi A, Yoshikawa M, Yoshimura N. Efficacy of intravitreal injection of aflibercept in neovascular age-related macular degeneration with or without choroidal vascular hyperpermeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:7874-7880.
9. Ellabban AA, Tsujikawa A, Muraoka Y, Yamashiro K, Oishi A, Ooto S, Nakanishi H, Kuroda Y, Hata M, Takahashi A, Yoshimura N. Dome-shaped macular configuration: longitudinal changes in the sclera and choroid by swept-source optical coherence tomography over two years. *Am J Ophthalmol* 2014;158:1062-1070 e1062.
10. Coscas G, Yamashiro K, Coscas F, De

- Benedetto U, Tsujikawa A, Miyake M, Gemmy Cheung CM, Wong TY, Yoshimura N. Comparison of exudative age-related macular degeneration subtypes in Japanese and French Patients: multicenter diagnosis with multimodal imaging. *Am J Ophthalmol* 2014;158:309-318 e302.
11. 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.
 12. 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.
 13. Ooto S, Hangai M, Takayama K, Ueda-Arakawa N, Tsujikawa A, Yamashiro K, Oishi A, Hanebuchi M, Yoshimura N. Comparison of cone pathologic changes in idiopathic macular telangiectasia types 1 and 2 using adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy. *Am J Ophthalmol* 2013;155:1045-1057 e1044.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.

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
なし

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で、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ブ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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	157	994-1004	2014
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	58	155-165	2014
Coscas G, Yamashiro K, Coscas F, De Benedetto U, TsujiKawa A, Miyake M, Gemmy Cheung CM, Wong TY, Yoshimura N.	Comparison of exudative age-related macular degeneration subtypes in Japanese and French Patients: multicenter diagnosis with multimodal imaging.	Am J Ophthalmol	158	309-318	2014

<p>Cheng CY, Yamashiro K, Chen LJ, Ahn J, Huang L, Huang L, Cheung CM, Miyake M, Cackett PD, Yeo IY, Laude A, Mathur R, Pang J, Sim KS, Koh AH, Chen P, Lee SY, Wong D, Chan CM, Loh BK, Sun Y, Davila S, Nakata I, Nakanishi H, Akagi-Kurashige Y, Gotoh N, Tsujikawa A, Matsuda F, Mori K, Yoneya S, Sakurada Y, Iijima H, Iida T, Honda S, Lai TY, Tam PO, Chen H, Tang S, Ding X, Wen F, Lu F, Zhang X, Shi Y, Zhao P, Zhao B, Sang J, Gong B, Dorajoo R, Yuan JM, Koh WP, van Dam RM, Friedlander Y, Lin Y, Hibberd ML, Foo JN, Wang N, Wong CH, Tan GS, Park SJ, Bhargava M, Gopal L, Naing T, Liao J, Ong PG, Mitchell P, Zhou P, Xie X, Liang J, Mei J, Jin X, Saw SM, Ozaki M, Mizoguchi T, Kurimoto Y, Woo SJ, Chung H, Yu HG, Shin JY, Park DH, Kim IT, Chang W, Sagong M, Lee SJ, Kim HW, Lee JE, Li Y, Liu J, Teo YY, Heng CK, Lim TH, Yang SK, Song K, Vithana EN, Aung T, Bei JX, Zeng YX, Tai ES, Li XX, Yang Z, Park KH, Pang CP, Yoshimura N, Wong TY, Khor CC.</p>	<p>New loci and coding variants confer risk for age-related macular degeneration in East Asians.</p>	<p>Nat Commun.</p>			<p>in press</p>
---	--	--------------------	--	--	-----------------

Kuroda Y, Tsujikawa A, Ooto S, Yamashiro K, Oishi A, Nakanishi H, Kumagai K, Hata M, Arichika S, Ellabban AA, Yoshimura N.	Association of focal choroidal excavation with age-related macular degeneration.	Invest Ophthalmol Vis Sci	55	1867-1875	2014
Nakata I Yamashiro K, Kawaguchi T, Nakanishi H, Akagi-Kurashige Y, Miyake M, Tsujikawa A, the Nagahama Study Group, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N.	Calcium, ARMS2 genotype, and Chlamydia Pneumoniae infection in early age-related macular degeneration: a multivariate analysis from the Nagahama Study.	Sci Rep			in press
Miyake M, Tsujikawa A, Yamashiro K, Ooto S, Oishi A, Tamura H, Nakata I, Matsuda F, Yoshimura N.	Choroidal neovascularization in eyes with choroidal vascular hyperpermeability.	Invest Ophthalmol Vis Sci	55	3223-3230	2014
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