

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10903

研究課題名(和文) 疾患iPS研究に基づく網膜色素変性症に対する新規神経保護治療薬の開発に向けた研究

研究課題名(英文) Development of a neuroprotective therapy for retinitis pigmentosa based on the iPS research

研究代表者

小澤 洋子(Ozawa, Yoko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・専任講師

研究者番号：90265885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らはこれまでに、遺伝子変異により発症する網膜色素変性症の患者体細胞由来の人工多能性細胞(induced-pluripotent stem cell; iPS細胞)を用いて網膜細胞を誘導・培養し、神経保護治療薬の開発に向けた病態メカニズムの解析(疾患iPS研究)を行い報告した。本研究では、疾患iPS研究の培養において有効性があった薬剤を、網膜色素変性症モデルマウス(ロドプシンP23Hノックインマウス)に投与して、生体内で網膜神経細胞の保護(細胞死抑制)効果を解析した。

研究成果の概要(英文)：We have previously developed induced-pluripotent stem cell (iPSC) lines from somatic cells of a patient with retinitis pigmentosa, which is a hereditary disease caused by gene mutation. The iPSC cells were differentiated into retinal cells to reveal the mechanism of the disease in vitro, and the study proposed candidate therapeutic drugs for neuroprotection. In the current study, we treated the mouse model of retinitis pigmentosa (P23H rhodopsin knock-in mice) with one of the candidate drugs to analyze the protective effects in vivo.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜 神経保護 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

京都大学の山中らが、体細胞から人工多能性幹細胞(induced-pluripotent stem cell; iPS 細胞)を作成する方法を発表した(Takahashi, Yamanaka Cell 2006)ことにより、遺伝子異常を持つ変性疾患の研究には、新しい可能性が生まれた。これまでヒトサンプルを採取しにくい神経系等の臓器・組織の研究には限界があったが、患者細胞由来の iPS 細胞から各臓器・組織の細胞を誘導することで、疾患の原因となる遺伝子異常を維持したヒト細胞を用いた病態研究(疾患 iPS 研究)が可能となったのである。

研究代表者らは、現時点では治療法の無い網膜色素変性症患者由来の iPS 細胞を樹立して、これを遺伝子異常を保持した網膜視細胞に分化誘導し、コントロール iPS 細胞から誘導した網膜視細胞と比較することで、本疾患の病態を解析する「疾患 iPS 研究」を行い、報告した(Yoshida, Ozawa, Okano et al. Mol. Brain 2014)。さらに、この患者 iPS 細胞から誘導して培養した網膜視細胞の死を抑制するための介入薬剤の提案にも成功し、併せて報告した。なお、疾患 iPS 研究は、国内外で行われ、各臓器の病態研究に用いられている(Chung, Science 2013, Jin et al. Plos One 2011)。

この網膜色素変性症に対し研究代表者らは、上述の疾患 iPS 研究を行うにあたり、網膜色素変性症の中でも多数を占めるロドプシン遺伝子異常の患者 iPS 細胞を用いて研究した。そして、その病態メカニズムには異常ロドプシンタンパクによる小胞体ストレスの亢進とそれによるアポトーシスの促進であることを解明した。すなわち、遺伝子異常により蓄積した異常タンパクが細胞内微小環境の異常を引き起こし異常なストレス応答を生じていたのである。

そして、この患者 iPS 細胞から誘導した網膜視細胞に薬剤を添加したところ、現在抗がん剤として用いられているラパマイシンは iPS 細胞由来の培養網膜視細胞の生存を促進することを見出した。ラパマイシンは眼科分野においては、炎症性疾患に対する局所投与剤も開発され、治験中である。

また、AMP-activated protein kinase (AMPK)活性化剤も生存を促進した。その研究の中で現時点では薬剤ではないが、実験試薬である 5-amino-1-β-D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide (AICAR)を AMPK 活性化剤として用いたが、AMPK 活性化作用には、抗糖尿病薬として知られるメトフォルミンもあることから、将来の臨床応用につながる可能性の大きい標的をスクリーニングしたことになった。ただし、疾患 iPS 研究は、あくまでも細胞レベルの研究である。

薬剤スクリーニングには優れているものの、臨床応用に向けた研究の次の段階としてはモデル動物への投与研究が欠かせない。そこで今回、研究代表者らは、ロドプシン遺伝子異常を持つ網膜色素変性症モデルマウスにラパマイシンを投与して、網膜視細胞死を抑制することが可能かを解析することとした。そして、その際の、効果の分子メカニズムを *in vivo* でより詳細に解析することとした。実際の神経保護治療のためには、薬剤は長期間投与されることとなり、そのメカニズムに関する情報は、継続投与の妥当性と安全性を検討する上で必須である。

2. 研究の目的

網膜色素変性症は、遺伝子異常を原因とし、徐々に進行する疾患で、失明原因の第3位を占める。早期に診断が付いても進行を抑制する安定した治療法はない。異常遺伝子が明らかになっても、細胞死のメカニズムが不明であるものが多いためである。研究代表者らは既に、異常遺伝子を持つ患者体細胞由来の人

工多能性細胞(induced-pluripotent stem cell; iPS 細胞)を用いて網膜細胞を誘導・培養し、神経保護治療法薬剤の開発に向けた病態メカニズムの解析(疾患 iPS 研究) を行い報告した。

そこで本研究では、疾患 iPS 研究の培養において有効性があつた薬剤を、網膜色素変性症モデルマウスに投与して、生体内で網膜神経細胞の保護(細胞死抑制) 効果が得られるかを解析することを目的とした。

3. 研究の方法

網膜色素変性症モデルマウス(ロドプシン P23H ノックインマウス)を用いて、研究代表者らがヒト疾患 iPS 研究(培養)で提案した候補治療薬剤(ラパマイシン)の網膜視細胞に対する保護効果(視細胞死抑制効果)を生体内で解析するとともに、その分子メカニズムを生体網膜内でさらに解析した。そのため以下の研究を行った。

(1) 網膜色素変性症モデルマウス(ロドプシン P23H ノックインマウス)における網膜変性の進行を解析した。

ロドプシン P23H ノックインマウスとは、ロドプシタンパクの N-末端から 23 番目のプロリンがヒスチジンに置き換わつた遺伝子改変マウスである。本モデルマウスを Palczewski 教授の研究室(米国 Case Western Reserve University)から供与され、ヒトが 2 本のアレルのうち片方の変異で網膜色素変性を発症する(常染色体優性遺伝を呈する)ことから、ヘテロノックインマウスを生後経時的に解析した。変性については、TUNEL アッセイにより細胞死を、ヘマトキシリンエオジン染色により層構造の菲薄化変化を解析した。

(2) ヘテロ P23H ノックインマウスにラパマイシンを投与して、変性の進行抑制について電気生理学的手法である網膜電図により解析した。

(1)で解析した変性開始の時期を参考に、生後 3 週からラパマイシンの連日腹腔内投与を行った。その際の視機能変化を、網膜電図の経時的測定により解析した。この方法は動物を生かしたままで行えるため、同じ動物で経時的に解析した。また、ラパマイシンは代謝に関連する薬剤でもあるため、全身状態(体重や血糖など)の測定も同時に行った。

(3) ヘテロ P23H ノックインマウスにラパマイシンを投与して、組織学的に解析した。ラパマイシン投与あり、なしの条件下で、主に生後 10 週齢について網膜の組織学的解析をヘマトキシリンエオジン染色等により行った。

(4) ヘテロ P23H ノックインマウスにラパマイシンを投与して、経時的に網膜内の小胞体ストレスマーカーを解析した。ラパマイシン投与あり、なしの条件下で、経時的に網膜サンプルを採取して、CHOP, Bip 等の小胞体ストレスマーカーをリアルタイム PCR 等により解析した。

4. 研究成果

ロドプシン P23H ヘテロノックインマウスにおいては生後 3 週ごろから TUNEL アッセイにより示されるアポトーシスによる細胞死が増え始め、6 週では既にヘマトキシリンエオジン染色で明らかな視細胞層の菲薄化がみられた。そこで生後 3 週からラパマイシンを投与した。網膜電図による視機能変化については、動物によっては機能低下抑制がみられたが、個体差が大きく、統計学的な有意差は認められなかった。組織学的解析においても同様の結果であった。その一因として、ラパマイシンを若年より投与したことによる体重増加の抑制があり、発達抑制につながつたことがあると考察された。網膜内小胞体ストレスについては、一部のマーカーは変化がみられたが、変性が進むとむしろ視細胞が失われてマーカーのレベルは低下するという

結果であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 19 件)

1. Minami S, Nagai N, Suzuki M, Kurihara T, Sonobe H, Kamoshita M, Uchida A, Shinoda H, Takagi H, Sonoda S, Sakamoto T, Tsubota K, Ozawa Y. Benefits of aflibercept treatment for age-related macular degeneration patients with good best-corrected visual acuity at baseline. *Scientific Reports*. 2018 Jan 8; 8(1):58. 査読有 10.1038/s41598-017-18255-4.
2. Ban N, Ozawa Y, Osada H, Jonathan B. Lin, Toda E, Watanabe M, Yuki K, Kubota S, Rajendra S. Apte, Tsubota K. Neuroprotective role of retinal SIRT3 against acute photo-stress. *npj Aging and Mechanisms of Disease*. 2017 Dec 4; 3:19. 査読有 10.1038/s41514-017-0017-8.
3. Osada H, Okamoto T, Kawashima H, Toda E, Miyake S, Nagai N, Kobayashi S, Tsubota K, Ozawa Y. Neuroprotective effect of bilberry extract in a murine model of photo-stressed retina. *PLoS ONE*. 2017 Jun 1;12(6):e0178627. 査読有 10.1371/journal.pone.0178627.
4. Fujinami K, Kameya S, Ozawa Y, Tsunoda K.(23 人中 16 番目) Novel RP1L1 Variants and Genotype-Photoreceptor Microstructural Phenotype Associations in Cohort of Japanese Patients with Occult Macular Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Sep; 57 (11):4837-46. 査読有 doi: 10.1167/iovs.16-19670.
5. Kamoshita M, Toda E, Kobayashi S, Tsubota K, Osada H, Ozawa Y. Lutein acts via multiple antioxidant pathways in the photo-stressed retina. *Sci Rep*. 2016 Jul; 22; 6:30226. 査読有 doi: 10.1038/srep30226.
6. Nagai N, Ohta Y, Izumi-Nagai K, Shinoda H, Tsubota K, Ozawa Y. Sneddon's syndrome with optic disc macroaneurysm and macular edema successfully treated with subtenon steroid injection. *Acta Ophthalmol*. 2016 Sep; 94(6):e517-9 査読有 doi: 10.1111/aos.12909.
7. Nagai N, Suzuki M, Uchida A, Kurihara T, Kamoshita M, Minami S, Shinoda H, Tsubota K, Ozawa Y. Non-responsiveness to intravitreal aflibercept treatment in neovascular age-related macular degeneration: implications of serous pigment epithelial detachment. *Sci Rep*. 2016 Jul; 11; 6: 29619. 査読有 doi: 10.1038/srep29619.
8. Kamoshita M, Fujinami K, Toda E, Tsubota K, Ozawa Y. Neuroprotective effect of activated 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase on cone system function during retinal inflammation. *BMC Neurosci*. 2016 Jun; 17:32. 査読有 doi: 10.1186/s12868-016-0268-5.
9. Suzuki M, Nagai N, Shinoda H, Uchida A, Kurihara T, Tomita Y, Kamoshita M, Iyama C, Tsubota K, Ozawa Y. Distinct responsiveness to intravitreal ranibizumab therapy in polypoidal choroidal vasculopathy with single or multiple polyps. *Am J Ophthalmol*. 2016 Jun; (166)52-9. 査読有 doi: 10.1016/j.ajo.2016.03.024.
10. Hirasawa M, Takubo K, Osada H, Miyake S, Toda E, Endo M, Umezawa K, Tsubota K, Oike Y, Ozawa Y. Angiotensin-like protein 2 is a multistep regulator of inflammatory neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. *J Biol Chem*. 2016 Apr; 291(14)7373-85. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M115.710186.
11. Tomita Y, Nagai Y, Suzuki M, Shinoda H, Uchida A, Mochimaru H, Izumi-Nagai K, Sasaki M, Tsubota K, Ozawa Y. Functional Visual Acuity in Age-Related Macular Degeneration. *Optom Vis Sci*. 2016 Jan; 93(1):70-6. 査読有 doi: 10.1097/OPX.0000000000000755.
12. Okamoto T, Ozawa Y, Kamoshita M, Osada H, Toda E, Kurihara T, Nagai N, Umezawa K, Tsubota K. The Neuroprotective

- Effect of Rapamycin as a Modulator of the mTOR-NF- κ B Axis during Retinal Inflammation. *PLoS ONE*. 2016 Jan; 11(1):e0146517. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0146517.
13. Ono T, Yuki K, Awano-Tanabe S, Fukagawa K, Shimoyama M, Ozawa Y, Ozeki N, Shiba D, Tsubota K. Driving self-restriction and motor vehicle collision occurrence in glaucoma. *Optom Vis Sci*. 2015 Mar; 92(3):357-64. 査読有 doi: 10.1097/OPX.0000000000000493.
 14. Nagai N, Izumi-Nagai K, Suzuki M, Shinoda H, Koto T, Uchida A, Mochimaru H, Tomita Y, Miyake S, Kobayashi S, Sasaki M, Tsubota K, Ozawa Y. Association of Macular Pigment Optical Density (MPOD) with serum concentration of oxidized low-density lipoprotein (oxidized LDL) in Healthy Adults. *Retina* 2015 Apr; 35(4):820-6. 査読有 doi: 10.1097/IAE.0000000000000382.
 15. Ozawa Y, Kawashima M, Inoue S, Inagaki E, Suzuki A, Ooe E, Kobayashi S, Tsubota K. Bilberry extract supplementation for preventing eye fatigue in video display terminal workers. *J Nutr health Aging*. 2015 May; 19(5):548-54. 査読有 doi: 10.1007/s12603-014-0573-6.
 16. Narimatsu T, Negishi K, Miyake S, Hirasawa M, Kurihara T, Tsubota K, Ozawa Y. Blue light-induced inflammatory marker expression in the retinal pigment epithelium-choroid of mice and the protective effect of a yellow intraocular lens material in vivo. *Exp Eye Res*. 2015 Jan 7; 132:48-51. 査読有 doi: 10.1016/j.exer.2015.01.003.
 17. Yotsukura-Tsutsui E, Koto T, Tsubota K, Ozawa Y. Predisposing factors for IOL dislocation treated by pars plana vitrectomy; Involvement of atopic dermatitis. *J Cataract Refract Surg*. 2015 Apr; 41(4):892-4. 査読有 doi: 10.1016/j.jcrs.2014.12.047.
 18. Tomita Y, Kurihara T, Uchida A, Nagai N, Shinoda H, Tsubota K, Ozawa Y. Wide-Angle Viewing System versus Conventional Indirect Ophthalmoscopy for Scleral Buckling. *Sci Rep*. 2015 Sep; 2; 5:13256. 査読有 doi: 10.1038/srep13256.
 19. Ozawa Y, Koto T, Shinoda H, Tsubota K. Vision loss by central retinal vein occlusion after Kaatsu training: a case report. *Medicine (Baltimore)* 2015 Sep; 94(36):e1515. 査読有 doi: 10.1097/MD.0000000000001515.
- 〔学会発表〕(計 15 件)
1. Ozawa Y. Neuro-inflammation in Metabolic Syndrome. 14th International Ocular Inflammation Society Meeting in conjunction with SOIE. 4th Assembly. 2017
 2. Ozawa Y. Molecular Mechanisms of Lutein's Effect in Preventing AMD. Global Ocular Inflammation Workshops. 2017
 3. Ozawa Y. Macular Pigment Optical Density. APSEG Symposium II Biological Markers for Eye Diseases. 2016
 4. Ozawa Y. Lutein/Zeaxanthin as a preventive approach for age-related macular degeneration. The 3rd International Conference on Pharma and Food. 2016
 5. Nagai N, Suzuki M, Uchida A, Kurihara T, Kamoshita M, Minami S, Shinoda H, Tsubota K, Ozawa Y. Predictive factors for non-response to intravitreal aflibercept treatment in neovascular age-related macular degeneration. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2016
 6. Minami S, Nagai N, Suzuki M, Kurihara T, Shinoda H, Tsubota K, Ozawa Y. Treatment Responses to the Intravitreal Aflibercept in Polypoidal Choroidal Vasculopathy at year 1. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2016
 7. Kamoshita M, Osada H, Toda E, Sano K, Kawashima M, Nagai N, Shinoda H, Tsubota K, Ozawa Y. Aerobic exercise protects retinal function in type 2 diabetic mice.

The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2016

Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2015

8. Okamoto T, Kamoshita M, Osada H, Toda E, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y. The neuroprotective effect of rapamycin as a modulator of the mTOR-NF- B axis during retinal inflammation. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2016
9. Kawashima H, Osada H, Toda E, Okamoto T, Kamoshita M, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y. AMPK activation protects photoreceptors from light-induced degeneration. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2016
10. Ozawa Y. Retinal photo-damage and the underlying mechanisms. The 2nd International Symposium of Blue Light Society. 2015
11. Ozawa Y. The use of induced pluripotent stem cells (iPSCs) to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa. The 9th Asia Pacific Vitreo-retina Socioity. 2015
12. Ozawa Y. Neurodegeneration in the diabetic retina. The 2015 IOIS Congress. 2015
13. Ozawa Y. Light-induced inflammation in the underlying mechanism of AMD. The 2015 IOIS Congress. 2015
14. Kawashima H, Osada H, Okamoto T, Ban N, Kamoshita M, Kurihara T, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y. Light-induced retinal degeneration and AMPK. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2015
15. Okamoto T, Kamoshita M, Osada H, Toda E, Kurihara T, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y. Neuroprotective effect of rapamycin in the retina. The

〔図書〕(計 0件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

該当なし

○取得状況(計 0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

慶應義塾大学医学部眼科学教室の研究グループ(網膜生物学研究室)紹介にこれまでの研修成果を発表した。

<http://ophthal.med.keio.ac.jp/research/rcb.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小澤 洋子(OZAWA, Yoko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・専任講師

研究者番号: 90265885

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

川島 弘彦(KAWASHIMA, Hirohiko)

長田 秀斗(OSADA, Hideto)