

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20295

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来網膜色素上皮細胞を用いた創薬研究

研究課題名(英文) Drug development using human induced pluripotent stem cell derived retinal pigment epithelium

研究代表者

鎌尾 浩行 (Kamao, Hiroyuki)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：30388946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から作製した網膜色素上皮細胞(RPE)を用いて、過去に臨床でRPEへの毒性が指摘されている組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)の毒性試験と薬効試験を行った。コントロールとしてRPE株化細胞と胎児RPEを用いた。各RPEを様々なtPA濃度で培養し、細胞毒性・形態・成長因子分泌・RPE特有遺伝子発現について評価した。iPS-RPEと胎児RPEは同様の毒性評価・形態変化を認めたが、RPE株化細胞は異なる変化を示した。一方、RPE機能である成長因子分泌と遺伝子発現に関しては変化はなかった。iPS-RPEは胎児RPEと同様の薬剤抵抗性を示したため、創薬研究の有用なツールの可能性がある。

研究成果の概要(英文)：pharmacological effect and toxicity tests of tissue plasminogen activator (tPA) were evaluated using human induced pluripotent stem cell derived retinal pigment epithelium (hiPSC-RPE). RPE cell line and human fetal RPE were used as control. All RPE cultured with assorted tPA concentration were evaluated by cytotoxicity, morphological change, growth factor secretion, and RPE specific gene expression. HiPS-RPE and fetal RPE showed similar cytotoxicity and morphological changes, however the RPE cell line showed different changes. In growth factor secretion and RPE specific gene expression, All RPE were equivalent. HiPS-RPE showed drug resistance similar to fetal RPE, therefore it is possible that hiPS-RPE is a useful tool for drug development.

研究分野：眼科

キーワード：網膜色素上皮細胞 ヒトiPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

眼球は外界からの光情報を受けとり脳へ伝える感覚器官であり、この光情報を受けとる組織が眼球の最内層に位置する網膜である。網膜は視細胞などの神経細胞と RPE で構成される。主な機能として視細胞などの神経細胞は光情報を電気信号に変換し脳に伝える視覚の中樞を担っており、一方の RPE は神経細胞への栄養因子の供給や老廃物の処理などの機能維持を担っている。このため、いずれが障害されても最終的に神経細胞が機能不全となり視力が障害される。

“網膜下血腫”は加齢黄斑変性などが原因となり、網膜下(視細胞と RPE の間)に血腫が形成される状態で、血腫の神経毒性物質(フィブリン、鉄、ヘモジデリン)や栄養供給障害により、自然経過の視力予後は非常に悪いことが知られている<sup>1)</sup>。このため 1980 年代後半から外科的な血腫除去が試みられるようになった。しかし、凝血塊の除去の際に大きな切開創が必要となり、この強い手術侵襲が原因で視力予後が悪く、最終的に治療の有効性がないと結論づけられた<sup>2)</sup>。そのため凝血塊を薬剤で溶解することにより、小さな切開創から血腫を吸引除去する tPA (組織プラスミノゲン活性化因子)を併用した外科的な血腫除去が 1990 年代から行われるようになり<sup>3)</sup>。現在もこの治療方法を基にした手術方法が行われている。しかし、これまでに臨床で行われた治療の中で、tPA の濃度が 50 µg/ml 以上で投与された症例において、薬剤毒性による RPE の障害と思われる所見(滲出性網膜剥離)がいくつか報告されている<sup>4)</sup>。この tPA の安全性に関する研究は、*in vitro* においてはウシの神経細胞を用いた電気生理的評価の報告があり<sup>5)</sup>、また *in vivo* においてはウサギの網膜下に tPA を投与し、投与後の網膜を組織学的・電気生理学的に評価する報告がある<sup>6)</sup>。しかし、これまでの報告は神経細胞に対する薬剤の安全性試験が中心で、臨床像で障害が示唆されている RPE に対する薬剤の効果や毒性に関する研究はない。

一方で我々は、すでに再生医療への臨床応用が行われたヒト iPS 細胞から RPE への分化誘導に成功しており、また作製したヒト iPS 細胞由来 RPE が生体内の RPE と同様の性質を有していることも確認している<sup>7)</sup>。そこで培養中のヒト iPS 細胞由来 RPE に tPA を添加することで、生体内の RPE に対する tPA の薬剤効果や毒性を評価できるのではないかと研究の着想に至った。これまでにヒト iPS 細胞由来 RPE を用いた薬剤安全性試験の報告はなく、この研究が完成すれば眼科領域では初めてのヒト iPS 細胞を用いた創薬研究の報告となる。

1) Avery RL, et al. *Retina* 1996;16:183-189

2) Bressler NM, et al. *Ophthalmol.* 2004;111:1993-2006

3) Peyman GA, et al. *Ophthalmic Surg.* 1991;22:575-582

4) Hesse L, et al. *Grafe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1999;237:273-277

5) Luke M, et al. *Br. J. Ophthalmol.* 2007;91:1077-1082

6) Johnndon MW, et al. *Arch. Ophthalmol.* 1990;108:259-263

7) Kamao H, et al. *Stem Cell Reports* 2014;2:205-218

## 2. 研究の目的

眼球に対する tPA の効果や毒性に関する研究は様々な角度から行われており、臨床においては網膜下血腫の治療に必ず用いる薬剤となっている。しかし臨床で障害が示唆されている、RPE に対する tPA の毒性に関する研究はこれまで行われていない。そこで生体の RPE と同様の性質を持つヒト iPS 細胞由来 RPE を作製し、tPA 含有の培地で培養した後細胞の状態(生細胞と死細胞)を評価することで、RPE に対する tPA の薬剤安全性を評価する。また細胞死が出ない濃度において、tPA 含有の培地で培養した後に細胞の増殖能・形態・機能を評価することで、臨床で認められた副作用による症状(滲出性網膜剥離)の病態解明を行うとともに、明らかになっていない RPE への薬剤の効果についても検討する。

これらにより生体の RPE と同様の性質を持つヒト iPS 細胞由来 RPE を用いて、tPA 含有培地で培養することで薬剤安全性を評価し、臨床で障害が報告された濃度との間に、どの程度一致性や相関性があるかを明らかにすることが目的である。この結果により、今後の iPS 細胞の創薬研究全体における安全性試験の結果解釈の一つの基準となる可能性がある。

## 3. 研究の方法

### 1. ヒト iPS 細胞の維持培養

細胞: ヒト iPS 細胞は RIKEN BioResource Center が提供している健康者由来ヒト iPS 細胞(253G1、454E2)の 2 系統を使用する。

方法: ヒト iPS 細胞の維持培養は、Nakagawa らによって報告されている、*Nat. Biotechnol.* 26:101-106 (2008)に準じて行う。

評価: ヒト iPS 細胞の維持培養の評価は、分化誘導前に未分化性と多能性の確認で行う。

・未分化性は、免疫細胞染色による未分化マーカー(OCT3/4、Nanog、SSEA-4、TRA-1-60)の発現を確認する。

・多能性は、免疫不全マウス(SCID mouse)の精巣にヒト iPS 細胞を移植し、2 か月後に精巣を組織学的に評価し奇形腫形成(3 胚葉系の細胞)を確認する。

### 2. ヒト iPS 細胞由来 RPE への分化誘導

細胞: 未分化性と多能性を確認したヒト iPS 細胞(253G1、454E2)を使用する。

方法: ヒト iPS 細胞由来 RPE への分化誘導は、Osakada らによって報告されている、*Nat. Biotechnol.* 26: 215-224 (2008)に準じて行う。

評価: ヒト iPS 細胞由来 RPE への分化誘導の評価は、RPE 特有遺伝子の確認で行う。

・RT-PCRによるRPE特有遺伝子(BEST1、RPE65、MERTK、CRALBP)の発現を確認する。  
・免疫細胞染色によるRPE特有遺伝子(PAX6、MiTF、BEST1、RPE65)の発現を確認する。  
3.ヒトiPS細胞由来RPEの機能評価 in vitro  
細胞：RPE特有遺伝子の発現を確認したヒトiPS細胞由来RPE(253G1、454E2)を使用する。  
評価：ヒトiPS細胞由来RPEの機能評価は、サイトカイン分泌、バリア機能を評価する。  
・サイトカイン分泌は、ELISA法を用いて血管内皮増殖因子(VEGF)と色素上皮由来因子(PEDF)の分泌量を評価する。  
・バリア機能は、免疫細胞染色による密着結合蛋白(ZO-1、Occludin、Claudin)の発現とTranswellITM上に培養し経上皮電気抵抗(TER)により評価する。  
4.ヒトiPS細胞由来RPEの機能評価 in vivo  
細胞：RPE特有遺伝子の発現を確認したヒトiPS細胞由来RPE(253G1、454E2)を使用する。  
評価：ヒトiPS細胞由来RPEの機能評価は、網膜変性モデル動物(RCS rat)に対して、ヒトiPS細胞由来RPEを網膜下移植し、免疫組織染色と電気生理学的に移植効果を評価する。  
・移植後、経時的に網膜電図の最大振幅を測定し非移植眼(反対眼)と比較する。  
・移植9週後に、視細胞層の厚さを組織学的に測定し非移植眼(反対眼)と比較する。  
5.ヒトiPS細胞由来RPEに対するtPAの毒性評価  
細胞：RPE特有遺伝子の発現を確認したヒトiPS細胞由来RPE(253G1、454E2)を使用する。  
評価：ヒトiPS細胞由来RPEをtPA含有の培地にて24時間培養後、経時的に細胞の状態(生細胞と死細胞)・形態・増殖能・機能を評価する。  
・生細胞の評価は、生細胞の酵素活性を吸光度(Cell Counting Kit-8)にて測定する。  
・死細胞の評価は、死細胞から遊離するLDH(乳酸脱水素酵素)を吸光度にて測定する。  
・細胞死(アポトーシス、ネクローシス)の経時的变化(添加後3、6、12、24時間)をフローサイトメトリー(Annexin V-FITC/7AAD)にて評価する。  
・細胞形態の評価は、細胞死となる濃度、ならない濃度における経時的变化を(添加後1日、7日、28日後)免疫細胞染色(ZO-1、ファロイジン)と電子顕微鏡にて評価する。  
・細胞増殖能の評価は、Culture-Insertに培養し、コンフルエント後に細胞死とならない濃度において培養後、insertを外し間隙が細胞で埋まるまでの時間を評価する。  
・細胞機能の評価は、細胞死とならない濃度における、サイトカイン分泌、バリア機能の経時的变化を(添加後1日、7日、28日後)評価する。

サイトカイン分泌：ELISA法を用いてVEGFとPEDFの分泌量を評価する。  
バリア機能は：TranswellITM上に培養しTERにより評価する。  
4.研究成果  
1.ヒトiPS細胞の維持培養  
・未分化性を免疫細胞染色による未分化マーカー(OCT3/4、Nanog、SSEA-4、TRA-1-60)の発現で確認した。  
・多能性を免疫不全マウス(SCID mouse)の精巣にヒトiPS細胞を移植し、2か月後に精巣を組織学的に評価し奇形腫形成(3胚葉系の細胞)を確認した。  
2.ヒトiPS細胞由来RPEへの分化誘導  
・RT-PCRによるRPE特有遺伝子(BEST1、RPE65、MERTK、CRALBP)の発現を確認した。  
・免疫細胞染色によるRPE特有遺伝子(PAX6、MiTF、BEST1、RPE65)の発現を確認した。  
3.ヒトiPS細胞由来RPEの機能評価 in vitro  
・サイトカイン分泌は、ELISA法を用いてVEGFとPEDFの分泌を確認した。  
・バリア機能は、免疫細胞染色にて密着結合蛋白(ZO-1、Occludin、Claudin)の発現を確認した。  
4.ヒトiPS細胞由来RPEの機能評価 in vivo  
iPS細胞由来RPEを網膜下移植し、免疫組織染色にて移植部位に一致する視細胞保護を確認した。また、移植眼と非移植眼の間に網膜電図の最大振幅の差を認めた。  
5.ヒトiPS細胞由来RPEに対するtPAの毒性評価  
1時間添加では、ヒトiPS-RPEと胎児RPEは2000ug/ml以上で明らかな形態異常を認め、200ug/ml以下では細胞障害を認めなかった。一方、RPE細胞株(ARPE19)は全ての濃度において細胞障害を認めた。24時間添加では、全ての濃度でiPS-RPEと胎児RPEに細胞障害を認め、また添加7日後でも遷延する細胞障害を認めた。一方、RPEの機能はいずれの濃度においても明らかな異常を認めなかった。以上より、24時間添加により臨床で用いられている濃度においても遷延する細胞障害を認めため、tPAが長時間残存する方法は避けるべきである。またiPS-RPEは胎児RPEと同様の薬剤抵抗性を示したため、創薬研究の有用なツールの可能性がある。  
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 0件)  
〔学会発表〕(計 3件)  
鎌尾浩行 ヒトiPS細胞由来網膜色素上皮細胞を用いたドラッグスクリーニング. 第7回川崎医科大学学術集会・一般演題 川崎医科大学 岡山 2016/08/06  
鎌尾浩行, 桐生純一 ヒトiPS細胞由来網膜色素上皮細胞を用いたtPA網膜下投与の安

全性試験 第 64 回川崎医科大学眼科学術  
会・一般演題 ホテルグランヴィア岡山 岡  
山 2016/12/11

鎌尾浩行, 桐生純一 ヒト iPS 細胞由来網  
膜色素上皮細胞を用いた tPA 網膜下投与の安  
全性試験 第 120 回日本眼科学会・一般演題  
東京国際フォーラム 東京 2017/4/6  
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
川崎医科大学・医学部・講師・鎌尾浩行( Kamao  
Hiroyuki )

研究者番号：30388946

(2) 研究分担者 なし  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 なし  
( )