

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16967

研究課題名(和文) iPS細胞を用いたクリスタリン網膜症の病態解明と薬物治療・遺伝子治療の開発

研究課題名(英文) Development of treatment for Bietti crystalline dystrophy

研究代表者

畑 匡侑 (Hata, Masayuki)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70748269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CYP4V2遺伝子変異をもつBCD患者から、疾患特異的iPS細胞を樹立し、RPE細胞へと分化させた(BCD由来iPS-RPE細胞)。BCD由来iPS-RPE細胞は、細胞内に空胞を形成し、リソソーム機能障害およびオートファジー障害を認め、細胞死が生じていることが明らかとなった。さらに、網羅的脂質解析により、細胞内に糖セラミドおよび遊離コレステロールが蓄積していることが明らかとなった。また、遊離コレステロールを減少させるシクロデキストリン誘導体や トコフェロールにより、細胞障害が改善することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現時点で治療法のないクリスタリン網膜症の病態の理解および治療法の開発に繋がる研究であり、その意義は非常に大きいと考える。本研究で有効性が明らかとなったシクロデキストリン誘導体は、同じく難病であるニーマンピック病C型の中樞神経症状に効果が期待されている化合物であり、臨床応用に向けて既に開発がすすめられている。我々は、眼疾患に対する投与方法の検討などを行い、クリスタリン網膜症に対しても臨床応用を進めていきたい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated human RPE cells from induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from BCD patients carrying a CYP4V2 mutation. We successfully established BCD patient-specific iPSC-RPE cells, an in vitro model of BCD. BCD iPSC-RPE cells showed degenerative changes of vacuolated cytoplasm. BCD iPSC-RPE cells exhibited lysosomal dysfunction and impairment of autophagy flux, followed by cell death. Lipidomic analyses revealed the glucosylceramide and free cholesterol accumulation in BCD-affected cells. We found that reducing free cholesterol by cyclodextrins or α -tocopherol in RPE cells rescued BCD phenotypes.

研究分野：難治性網膜視神経疾患の病態解明および治療法開発

キーワード：クリスタリン網膜症 網膜変性疾患 疾患特異的iPS細胞 網羅的脂質解析 遊離コレステロール シクロデキストリン誘導体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は日本における中途失明の原因として上位にあり、中でもクリスタリン網膜症は日本人に多い進行性の遺伝性網膜変性疾患である。本疾患は30歳前後に夜盲、視野障害で発症し、徐々に視野障害が進行し、視力低下を来す。原因遺伝子は、水酸化酵素チトクローム P450 ファミリーの一つである CYP4V2 であると報告された(Li A et al. Am J human Genet. 2004)。しかしながら、CYP4V2 タンパク質の機能や網脈絡膜変性に至る機序は不明であり、病態との関連、進行抑制や予防療法の解明が切望されている。臨床所見から、網膜色素上皮が病気の主座で、2次的に網膜変性が起こると想定されるが、患者から細胞採取をすることが不可能であるため、病態の解明が困難であった。

近年、iPS 細胞を網膜色素上皮細胞へ効率的に誘導することが可能となり(Osakada F et al. J Cell Sci. 2009)、患者の皮膚などから患者の遺伝子背景をもつ網膜色素上皮細胞を得ることが可能となり、遺伝子変異疾患の病態を in vitro で再現可能となった (Singh R et al. Hum Mol Genet. 2013)。

2. 研究の目的

これまでに、我々は iPS 細胞を用いて、クリスタリン網膜症患者由来の網膜色素上皮細胞を得ることで、細胞内のコレステロール蓄積が病態に關与していることを見出した。本研究では、さらに患者 iPS 由来網膜色素上皮細胞での脂質代謝、遺伝子発現、細胞形態・機能を健常人 iPS 由来網膜色素上皮細胞と比較することで、CYP4V2 変異が網膜変性を起こすメカニズムを明らかにし、治療法開発への足掛かりを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) iPS 由来網膜色素上皮細胞を用いた形態・機能解析

クリスタリン網膜症患者・健常人 iPS 由来の網膜色素上皮細胞において、敷石状形態やタイトジャンクションの形成、色素形成など、形態の評価を行う。また既に我々が確立している、網膜色素上皮細胞の貪食・代謝能の評価を行う。これを用いて、健常人 iPS 由来および患者 iPS 由来の網膜色素上皮細胞における機能面の差異につき検討する。

(2) iPS 由来網膜色素上皮細胞を用いた遺伝子発現解析

分化網膜色素上皮細胞から RNA を抽出し発現ライブラリーを作成する。次世代シーケンスを用いて、遺伝子発現を網羅的に調べ、健常人 iPS 由来の網膜色素上皮細胞と患者 iPS 由来の網膜色素上皮細胞の遺伝子発現と比較検討し、脂質代謝の相違との関連を解析する。

(3) 患者 iPS 由来網膜色素上皮細胞を用いたステロール代謝解析

一部の CYP はコレステロール代謝に関わるが、CYP4V2 のステロール代謝における酵素活性は知られていない。今までに、クリスタリン網膜症患者 iPS 由来の網膜色素上皮細胞では遊離コレステロール蓄積が生じていることが分かってきており、本研究では、CYP4V2 変異がステロール代謝に与える影響

を調べる。具体的には、GC-MS を用いて、ステロール代謝物のターゲット解析を行う。さらに、分化後間もない若い網膜色素上皮細胞および長期培養後の網膜色素上皮細胞、加齢を模倣するため、過酸化水素水などで酸化ストレスを与えた網膜色素上皮細胞の細胞内における脂質代謝状況の変化も比較検討する。

(4)患者 iPS 由来網膜色素上皮細胞に対するコレステロール蓄積阻害剤の効果の検討

クリスタリン網膜症患者 iPS 由来の網膜色素上皮細胞を用いて、細胞内に蓄積した遊離コレステロールを排泄する作用のあるデキストリン誘導体 HPBCD の有効性を評価する。また、遺伝子発現解析およびステロール代謝解析の結果により、患者 iPS 由来-網膜色素上皮細胞で不足する代謝物の補充、または過不足が明らかになった代謝物に関する代謝酵素や合成酵素に関する促進剤や阻害剤を利用することによる、新しい治療法の開発を目指す。

4. 研究成果

本研究は、iPS 細胞を用いたクリスタリン網膜症の病態解明と薬物治療・遺伝子治療の開発を目的としており、以下の点を明らかにした。

iPS 由来網膜色素上皮細胞を用いた形態・機能解析

京都大学iPS 細胞研究所の協力のもと、4 人のクリスタリン網膜症患者および4 人の正常対象者から皮膚採取を行いiPS 細胞を樹立し、確立されたプロトコルを用いて、網膜色素上皮細胞への分化を行った。患者iPS 由来網膜色素上皮細胞では健常人由来の細胞に比べ、細胞が大型化しており、細胞内に空胞形成を伴っていた。更に、細胞内にメラニン顆粒の蓄積を認めた。また、患者iPS 由来網膜色素上皮細胞では、リソソーム機能障害とそれに伴うオートファジーの流れの障害を認めた。更には、患者iPS 由来網膜色素上皮細胞において、健常人由来の細胞に比べ、有意に細胞死が多いことが明らかとなった。

患者iPS 由来網膜色素上皮細胞を用いたステロール代謝解析

GC-MS を用いて、患者由来および正常者由来の網膜色素上皮細胞間でのステロール代謝物を検討したが、両者で明らかな差を認めなかった。また、ステロール代謝に関わる酵素遺伝子の発現には、差を認めなかった。

患者iPS 由来網膜色素上皮細胞に対するコレステロール蓄積阻害剤の効果の検討

患者iPS由来の網膜色素上皮細胞を用いて、デキストリン誘導体HPBCDの有効性を評価したところ、HPBCDには細胞の空胞形成が改善した。更に、HPBCD投与により、細胞内の糖セラミドや遊離コレステロール蓄積が改善していた。また、HPBCD投与はリソソーム機能障害を改善させる効果をもとめることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Reduction of lipid accumulation rescues Bietti's crystalline dystrophy phenotypes.

Hata M, Ikeda HO, Iwai S, Iida Y, Gotoh N, Asaka I, Ikeda K, Isobe Y, Hori A, Nakagawa S, Yamato S, Arita M, Yoshimura N, Tsujikawa A.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Apr 10;115(15):3936-3941.

doi: 10.1073/pnas.1717338115. Epub 2018 Mar 26.

[学会発表] (計 1 件)

発表者名: Hata M

Pathologic clarification and novel therapies development of Bietti crystalline dystrophy.

EURETINA (招待講演) (国際学会)

ウィーン、2018 年

[図書] (計 1 件)

畑 匡侑、池田 華子

羊土社、実験医学増刊: 脂質クオリティ、2018

池田 華子、畑 匡侑

医歯薬出版、医学のあゆみ、2019

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 1 件)

名称: クリスタリン網膜症の処置および/または予防方法

発明者: 畑匡侑・池田華子

権利者: 畑匡侑・池田華子

種類: 特許

番号: 2017-090296

取得年: 2018 年

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

池田華子

IKEDA, Hanako

京都大学医学部附属病院

臨床研究総合センター 准教授

有田誠

ARITA, Makoto

理化学研究所

統合生命医科学研究センター

チームリーダー

岩井祥子

IWAI, Sachiko

京都大学眼科

特定研究員

川口恵理

KAWAGUCHI, Eri

京都大学眼科

実験補佐員

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。