様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ５ 月 １７ 日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ０９８２６

研究課題名（和文）疾患特異的iPS細胞を用いたクリスタリン網膜症の治療薬開発

研究課題名（英文）Drug development for Bietti's crystalline dystrophy using disease-specific iPS cells

研究代表者
岩井　祥子（Iwai, Sachiko）

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：００７６８９０５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：網膜色素変性は中途失明の主な原因の一つであり、その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。本研究は、クリスタリン網膜症に対して、有効な治療薬開発を目的として行った。治療薬の候補は、疾患特異的iPS-RPEを用いたこれまでのわれわれの研究で明らかとなったが、薬剤の最適化が主な課題であった。これまでの研究で、薬剤への修飾、溶媒、添加剤、投与方法などの検討を繰り返し行い、動物を用いた点眼実験において網膜への到達量を上昇させる条件を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
眼の難病である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が、その詳細は不明であり、病態との関連や治療法の開発が切望されている。われわれはこれまでに、治療薬候補薬剤を見出し、最適化条件を検討、動態試験を実施している。本研究によりクリスタリン網膜症に対する有効な治療薬を開発できれば、本疾患の画期的な失明予防治療薬となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Retinitis pigmentosa is one of the leading causes of blindness. Among them, crystallin retinopathy is a progressive hereditary retinal degenerative disease that is common in Japanese.This research was conducted with the aim of developing effective therapeutic agents for crystalline retinopathy. Potential therapeutic agents have emerged in our previous studies using disease-specific iPS-RPE, but drug optimization has been a major challenge. In this research, we examined modifications to the drug, solvents, additives, administration methods, etc., and found the conditions that increase the amount reaching the retina in eye drop experiments using animals.

研究分野：眼科学

キーワード：クリスタリン網膜症　疾患特異的iPS-RPE　シクロデキストリン　cyp4v2

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－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、その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。網膜色素上皮細胞と視細胞の変性、萎縮網膜への微細な結晶状の沈着物を特徴とし、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（Am J human Genet, 2004）。我々は、*CYP4V2* 変異をホモにもつクリスタリン網膜症患者から induced pluripotent stem (iPS)細胞を樹立し、分化させた網膜色素上皮細胞（iPS-RPE）を用いて研究を行ってきた。その結果、患者由来 iPS-RPE において、空胞形成をはじめとする細胞変性・細胞死、オートファジー・リソソーム機能障害が認められ、in vitro において病態を再現することが明らかになった。LC-MS/MS を用いた脂質網羅的解析から、患者由来 iPS-RPE では、細胞内に遊離コレステロールが蓄積していた。さらに、細胞内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の一部が、患者由来 iPS-RPE の細胞形態・機能異常、細胞死を抑制することを明らかにした。

２．研究の目的

本研究では、我々が明らかにしたクリスタリン網膜症の病態を踏まえ、患者由来 iPS-RPE を用いて細胞機能障害の抑制および細胞内遊離コレステロール減少作用のある薬剤の最適化を行い、クリスタリン網膜症に対する治療薬開発を進めることを目的とした。

３．研究の方法

３－１）シクロデキストリン誘導体の網膜内濃度測定
クリスタリン網膜症患者由来 iPS-RPE 細胞で細胞変性抑制効果のあるシクロデキストリン Hydroxyproryl-beta-Cyclodextrin（HPBCD）、Hydroxyproryl-gamma-Cyclodextrin（HPGCD）に関して、750mM、500mM の溶解液を作成した。BN ラット各 2 匹に朝・昼・夕・翌朝・翌昼の 5 回、一回 5 μL 点眼、最終点眼 30 分後に過剰麻酔下で眼球を摘出した。摘出眼球は生理食塩水で十分に洗浄後、凍結し保存した。凍結眼球を、半割し、神経網膜および、網膜色素上皮・脈絡膜・強膜に分離した。エッペンチューブに入れ、凍結した。ビーズビーターにより凍結状態で破砕し、組織 10 mg あたり 100 μL の純水を加え、homogenate を作成した。内標準物質を加え、アセトニトリルで抽出、上清を乾燥後、炭化アンモニウムで溶解した。LC-MS/MS を用い、標準物質の検量線から各シクロデキストリン濃度を算出した。

３－２）網膜色素上皮細胞での受容体の発現確認
網膜色素上皮細胞に葉酸受容体の発現があるかを確認するため、網膜色素上皮細胞種である ARPE-19 細胞並びに iPS-RPE 細胞からタンパク質を抽出した。抗葉酸受容体抗体を用い、ウェスタンブロットにて葉酸受容体の発現の有無を検討した。

３－３）シクロデキストリンの修飾
シクロデキストリンの細胞内への取り込みを促進させるため、シクロデキストリンへの修飾を試みた。シクロデキストリンに葉酸やラクトース修飾を行った。修飾シクロデキストリンに関して、３－１）同様、ラットに点眼を行い、網膜内濃度を測定した。

３－４）*in vitro* 病態モデルにおける修飾シクロデキストリンの薬効確認
クリスタリン網膜症患者由来 iPS-RPE 細胞を維持培養した。培地に修飾デキストリンをそれぞれ 0.0625、0.125、0.25、0.5、1 mmol/L の濃度で添加し、細胞変性の割合を写真から評価した。また、リソトラッカーを用い、fluorescence-activated cell sorting（FACS）解析により、リソソーム機能を評価した。

３－５）シクロデキストリン製剤検討、投与法検討
シクロデキストリンの溶媒を、水、phosphate-buffered saline（PBS）とし、添加剤を加え、３－１の方法にて点眼実験を行い、網膜内濃度を検討した。

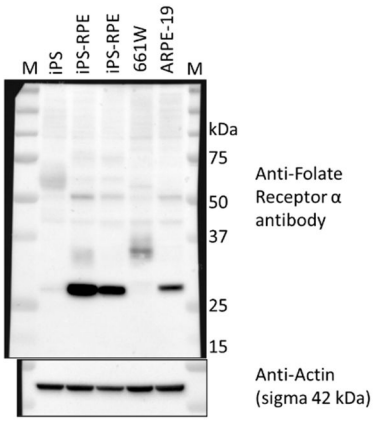
４．研究成果

４－１）シクロデキストリン網膜内濃度

750 mM HPBCD、500 mM HPGCD をラットに一日 3 回点眼し、5 回目点眼の 30 分後に摘出した網膜内の濃度測定を行った。網膜内濃度は、およそ 5 pmol/mg tissue であった。また、網膜色素上皮・脈絡膜・強膜内濃度は、およそ 120、70 pmol/mg tissue であった。培養細胞での薬効濃度が数百 n mol であるため、薬効濃度には 1－2 桁濃度が足りない可能性が示唆された。

４－２）網膜色素上皮細胞での受容体の発現確認

ARPE-19、iPS-RPE では、葉酸受容体が強発現していた。一方、未分化 iPS 細胞や、視細胞種の 661W 細胞では、葉酸受容体の発現がほぼ見られなかった。（図）したがって、網膜色素上皮細胞内に薬剤を取り込ませる目的で、薬剤に葉酸修飾を行うことは有効である可能性が示唆された。



４－３）シクロデキストリンの修飾

葉酸（FA）付加したシクロデキストリンとして、FA-HPBCD、FA-MBCD（methyl-beta-cyclodextrin）を用いて、ラットへの点眼実験を行った。葉酸付加にて、水への溶解度が低下したため、FA-HPBCD およびそのコントロールとしての HPBCD は 125 mM で、FA-MBCD およびそのコントロールとしての MBCD は 50 mM でそれぞれ点眼実験を行った。FA-HPBCD に関して、葉酸が付加する位置や数が様々であることから、検出されるイオンは非常に複雑でそれぞれのイオン強度が低いため、有効な定量が困難であった。一方、FA-MBCD は、網膜内から検出可能で、MBCD 投与の網膜より、数倍程度高濃度で検出されたが、点眼可能な濃度が低かったために、いずれにしても薬効濃度には届かない結果となった。また、beta-cyclodextrin に複数個の葉酸を付加した修飾デキストリン、及び、乳酸修飾したシクロデキストリンを用い、同様に検討を行ったが、いずれも、網膜内濃度を著明に上昇できるものは無かった。

４－４）in vitro 病態モデルにおける修飾シクロデキストリンの薬効確認

葉酸付加したシクロデキストリンとして、FA-HPBCD、FA-MBCD を用いた。HPBCD、MBCD ともに、0.25 mmol/L から細胞変性抑制作用を認めた。FA-HPBCD、FA-MBCD でも同様に 0.25 mmol/L から細胞変性抑制作用を認め、それより薄い 0.125 や 0.0625 mmol/L では細胞変性抑制作用を認めなかった。また、リソトラッカーを用いた FACS 解析によるリソソーム機能評価においても、FA-HPBCD、FA-MBCD と HPBCD、MBCD 間にリソソーム機能改善効果、およびその薬効濃度に差異はなかった。以上より、葉酸付加により、in vitro における薬効は保たれるものの、薬効が得られる濃度の低下作用は認められないことが明らかになった。

４－５）シクロデキストリン製剤検討、投与法検討

HPBCD を用い、水、PBS 等の溶媒、及びいくつかの添加剤を加え、点眼実験を行った。溶媒 A では、点眼投与語 30 分での網膜内シクロデキストリン濃度が 100 pmol/mg tissue をこえ、点眼後 8 時間まで比較的高い濃度で維持された。溶媒 B では、他の溶媒と比べて 2 時間以降 8 時間まで、網膜内シクロデキストリン濃度が高く維持された。また、眼局所投与法を検討し、網膜内濃度が 500 pmol/mg tissue に達するものがある可能性が示唆された。今後、引き続きよりよい条件を検討していく予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計6件（うち査読付論文　4件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 Tagawa Miho、Ikeda Hanako Ohashi、Hata Masayuki、Inoue Yumi、Iwai Sachiko、Tsujikawa Akitaka	４．巻 -
２．論文標題 A Protocol for Stepwise Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells into Retinal Pigment Epithelium	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Methods in Molecular Biology	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/7651_2021_418	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Tagawa Miho、Ikeda Hanako Ohashi、Inoue Yumi、Iwai Sachiko、Iida Yuto、Hata Masayuki、Asaka Isao、Tsujikawa Akitaka	４．巻 205
２．論文標題 Deterioration of phagocytosis in induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells established from patients with retinitis pigmentosa carrying Mer tyrosine kinase mutations	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Experimental Eye Research	６．最初と最後の頁 108503～108503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2021.108503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Iwai Sachiko、Ikeda Hanako O.、Mera Hisashi、Nishitani Kohei、Saito Motoo、Tsujikawa Akitaka、Kakizuka Akira	４．巻 11
２．論文標題 KUS121 attenuates the progression of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Scientific Reports	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-95173-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Saito Motoo、Nishitani Kohei、Ikeda Hanako O.、Yoshida Shigeo、Iwai Sachiko、Ji Xiang、Nakahata Akihiro、Ito Akira、Nakamura Shinichiro、Kuriyama Shinichi、Yoshitomi Hiroyuki、Murata Koichi、Aoyama Tomoki、Ito Hiromu、Kuroki Hiroshi、Kakizuka Akira、Matsuda Shuichi	４．巻 11
２．論文標題 Author Correction: A VCP modulator, KUS121, as a promising therapeutic agent for post-traumatic osteoarthritis	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Scientific Reports	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86883-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Kusaka Mami、Hasegawa Tomoko、Ikeda Hanako Ohashi、Inoue Yumi、Iwai Sachiko、Iida Kei、Tsujikawa Akitaka	4．巻 12
2．論文標題 Involvement of endothelins in neuroprotection of valosin-containing protein modulators against retinal ganglion cell damage	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Scientific Reports	6．最初と最後の頁 16156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-20497-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Iwai Sachiko、Hasegawa Tomoko、Ikeda Hanako Ohashi、Tsujikawa Akitaka	4．巻 63
2．論文標題 Branched Chain Amino Acids Promote ATP Production Via Translocation of Glucose Transporters	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Investigative Opthalmology & Visual Science	6．最初と最後の頁 7～7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.63.9.7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	池田　華子 (Ikeda Hanako) (20372162)	京都大学・医学研究科・特定准教授 (14301)	

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関