

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15633

研究課題名(和文)新規神経保護剤の開発

研究課題名(英文)Development of neuroprotective drugs

研究代表者

池田 華子 (Ikeda, Hanako)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20372162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、VCP蛋白のATPase阻害活性を持つ物質に神経保護効果があることを見出してきた。本研究では、細胞保護効果のある新たな化合物を探索し、数化合物に、今までの化合物と同等の細胞保護活性があることが明らかになった。一方、薬剤の薬効を評価するにあたって、試験管内で病気の状態を再現できれば、非常に有用である。眼疾患患者さんからiPS細胞を樹立、網膜細胞に分化させ、薬効スクリーニング系を樹立する礎を築いた。

研究成果の概要(英文)：We have shown that compounds which have inhibiting activity of VCP ATPase have neuroprotective effects. In this study, we explored new chemicals and found that several chemicals possessed cell protective effect. Moreover, we have developed screening systemes to test effectiveness of drugs in vitro. Using iPS cells from patients with ocular diseases, retinal cells with dysfunction similar to diseases could be prepared. These cells might be used for drug screening.

研究分野：眼科学

キーワード：神経保護 眼疾患 創薬 スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障は、網膜神経節細胞が変性脱落することにより視野欠損をきたす疾患で、現在日本において中途失明の一番の原因である。現状では眼圧降下のみが有効な治療とされているが、十分に眼圧を下げてもおお視野障害が進行する例が少なくない。一方、網膜色素変性は、視細胞が変性脱落することにより、夜盲、視野狭窄、視力低下をきたす疾患で、近年、国内・海外にて、神経栄養因子などによる治療、遺伝子治療や再生医療の試みが始まりつつあるが、有効な予防・治療法は確立されていない。高齢化に伴い増加中の加齢黄斑変性では、新生血管に対する治療は発達してきたが、新生血管予防や前駆期であるドルーゼンに対する治療は存在しない。現状では治療法が未確立なこれら眼難治疾患に対し、革新的な予防治療法の開発が切望されている。

VCP (valosin-containing protein, Koike M, Kakizuka A, et al. J Biol Chem 2010.) は、細胞が異常蛋白質の蓄積や酸化ストレス遭遇時に重要な働きをする蛋白質である。我々が合成した VCP の ATPase に対する調節剤 (モジュレータ)、KUS121 (Kyoto University Substance) には組織を超えて細胞死を防御する作用 (特許 5822840)、緑内障や網膜色素変性モデルマウスにおいて、変性抑制効果のみならず網膜電図での機能保持が認められること (特許 5822840, Ikeda H et al, Sci Rep 4, 5970, 2014)、黄斑変性モデルマウスにおいて、ドルーゼン消失・形成抑制効果を持つこと (特願 2013-031190) が明らかになりつつある。したがって、緑内障や網膜色素変性、加齢黄斑変性に対して、神経保護・ドルーゼン治療という新たな治療法の開発に現実性が生じて来た。KUS121 に関しては、急性眼疾患に対してその神経保護効果を検討すべく、医師主導治験の準備を進めている。しかし幅広い眼難治疾患への臨床応用を考えた場合、最適化が是非とも必要である。

一方、iPS 細胞は、成人皮膚細胞に若返り遺伝子を導入し、多分化能を獲得させたものである。京大病院に iPS 細胞外来が設置され、眼難治疾患患者からの iPS 細胞樹立が可能であり、また、ヒト iPS 細胞から各網膜細胞への分化誘導に成功している (Ikeda H ら. Nat Biotechnol 2008;26:215)。

## 2. 研究の目的

本研究では、シュミレーションにより、より低濃度で薬効が見込める化合物の検討を行い、その結果に基づき新規化合物を合成、in vitro での VCP ATPase 阻害活性・細胞保護活性を検討し、現有の KUS 化合物より強力な神経保護作用を持つものがあれば、Ames 試験ならびに小核試験を行い、その安全性を確認する。また、効率よく vivo での薬効薬理実験を行うため、in vitro でのスクリーニング系確立を行う。具体的には、各眼疾患患者から iPS 細胞を樹立し、各網膜細胞に分化誘導し、生存

率や機能解析を行えるようにする。

## 3. 研究の方法

### (1) VCP ATPase モジュレータの新規探索

VCP 蛋白の ATPase 活性を阻害する新規化合物 KUS121 は、網膜細胞保護活性があり、Ames 試験も陰性であり、現在臨床治験に向けて安全性試験中である。しかし、IC50 が 330 nM であり、また溶解度がそれほど高くないため、より低濃度で薬効があり、かつ安全性の高い薬剤、つまり薬剤の最適化が必要不可欠である。

#### ① バーチャルスクリーニング

今までの知見により、化合物の構造上細胞保護活性に大事な部分はほぼ明らかことから、バーチャルスクリーニングを実施し、既存化合物から、VCP ATPase 阻害活性を持つ可能性のある化合物を選定した。

#### ② 培養細胞保護活性検討

①で選定された上位 57 化合物を購入し、培養細胞での保護活性を検討した。具体的には、HeLa 細胞を低グルコース下 (0.20 g/L) で培養し、新規化合物を 25, 50, 100  $\mu$ M で加え、3 日後に WST 試薬を用いて OD450 nm の吸光度を測定し、生存細胞数を比較した。同様に HeLa 細胞にツニカマイシン (TM, 0.2  $\mu$ g/mL) を加えて小胞体ストレスを惹起し、新規化合物を 25, 50, 100  $\mu$ M で加え、2 日後に WST 試薬を用いて OD450 nm の吸光度を測定し、生存細胞数を比較した。対照として KUS121 50  $\mu$ M 及び KUS187 25  $\mu$ M を使用した。また、化合物は、滅菌のために、培地に加えたのちに、フィルター滅菌をしたもの、およびフィルター滅菌をしないものを、各々評価した。保護効果の見られたものに関して、低グルコースでの細胞保護効果を再検討した。

#### ③ ATPase 阻害活性検討

②にて細胞保護活性の強い化合物に関して、各々 30  $\mu$ M の濃度で in vitro での VCP 蛋白の ATPase 阻害活性を測定した。具体的には、Sf9 細胞にて合成した VCP と化合物および [ $\gamma$ -32P]ATP を in vitro で反応させ、遊離  $\gamma$ -32P を測定することで、ATPase 活性を比較した。

### (2) 患者由来 iPS 細胞を用いた薬剤効果スクリーニング系確立

#### ① 眼疾患患者からの iPS 細胞樹立

網膜色素変性・加齢黄斑変性患者および健康コントロールから、文書にて同意を得たのち、患者皮膚組織を採取、初期化遺伝子 OCT3/4, SOX2, KLF4, MYC の導入により、iPS 細胞株を樹立した。

#### ② iPS 細胞から視細胞、神経節細胞、網膜色素上皮への分化誘導

各樹立 iPS 細胞を、すでに我々が確立した浮遊培養法 (SFEB-DL 法: Ikeda H ら. Nat Biotechnol 2008;26:215) で分化誘導し、網膜細胞を作成した。具体的には、5-10 細胞塊を分化培地にて 20 日間浮遊培養、分化細胞塊を接着培養すると 20-30 日ほどで網膜細胞の前駆細胞に分化する。さらに 30-60 日培養を

続けると敷石状で色素を持った網膜色素上皮や視細胞、神経節細胞が得られる。

### ③分化網膜細胞における形態・機能検討

分化誘導した患者由来の網膜細胞に対し、その生存率や、代謝状況、形態に関して、患者及び正常人由来細胞で差があるか検討した。

## 4. 研究成果

### (1) VCP ATPase モジュレータの新規探索

バーチャルスクリーニングにより VCP ATPase 活性を持つ可能性が高い化合物をスコアリングし、そのうち、入手可能な 33 化合物を購入した。

化合物の溶解性は、まちまちで、50  $\mu\text{M}$  となるように培地に加え、顕微鏡で観察をしたところ、析出が見られるものが半数程度存在した。

低グルコースによる細胞保護活性を検討し、50  $\mu\text{M}$  KUS121 に比較して 30%以上の細胞保護率であった化合物を 16 化合物に絞り、ツニカマイシン負荷による細胞に対する保護効果を検討した。その結果、IS24 および IS25 では、50  $\mu\text{M}$  KUS121 より生細胞数が多い結果となった。

構造相関を検討するために、細胞保護活性の強かった化合物の周辺化合物をさらに、24 化合物購入し、同様に、低グルコースによる細胞保護活性を検討した。その結果、24 化合物の中から 9 化合物に絞り込み、ツニカマイシン負荷による細胞保護効果を検討、各々、細胞保護効果があることを確認した。図 1 に低グルコースでの細胞保護効果に関して、KUS121 の保護効果を 1 とした時の各化合物の保護活性を示す。

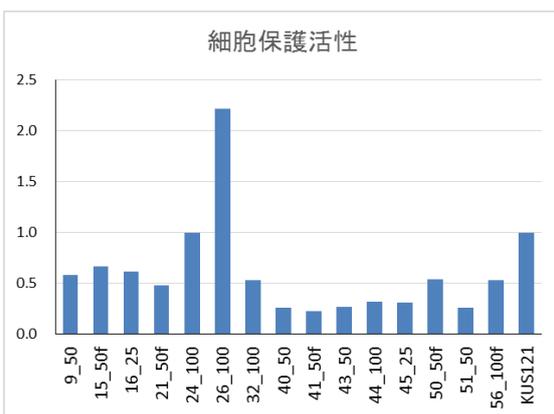


図 1 各化合物の細胞保護効果

最初の数字は化合物番号を、\_の後の 100, 50, 25 は終濃度 ( $\mu\text{M}$ ) を、f は培地の無菌化フィルター操作を示す。

次に、上記 15 化合物に関して、各々 30  $\mu\text{M}$  での *in vitro* での VCP 蛋白の ATPase の阻害活性に関して検討した。検討は、連携研究者の垣塚らと行った。その結果、30  $\mu\text{M}$  では、いずれも、KUS121 と同等な ATPase 阻害活性が認められなかった (図 2)。

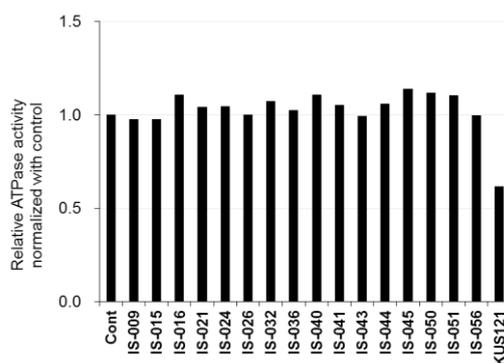


図 2 VCP ATPase 阻害活性

いずれの化合物も 30  $\mu\text{M}$  で検討した。

以上のように、バーチャルスクリーニングによって、細胞保護効果のある化合物は複数見つかったが、いずれも、KUS121 と同等な VCP ATPase 阻害活性は認めなかった。今後、細胞保護活性の強い、IS-24, IS-26 を中心に、その保護メカニズムの解明、および、安全性試験を行い、新たな細胞保護薬の候補となりうるか検討していく。

### (2) 患者由来 iPS 細胞を用いた薬剤効果スクリーニング系確立

網膜色素変性患者 3 名、加齢黄斑変性患者 3 名、および健常コントロール 3 名から、同意を得たのち、皮膚切除、iPS 細胞樹立を目指した。iPS 細胞の樹立は、連携研究者の平家らの協力のもと CiRA にて行った。

加齢黄斑変性患者並びに、眼底の健常コントロールは、高齢のため、iPS の樹立が非常に困難であり、時間もかかったが、現在までに、樹立を終えた。

樹立ができた順番に、分化誘導を行い、網膜色素上皮へ分化させた。確認のできたすべてのラインで、網膜色素上皮への分化効率に差異はなかった。

次いで、網膜色素上皮細胞の増殖率を調べた。その結果、一部のラインで、網膜色素上皮細胞の増殖が低下していることが示唆された。次に、網膜色素上皮の大事な機能である、食食能を検討した。その結果、一部のラインでは、食食能が低下し、また、一部のラインでは逆に食食能が亢進していることが示唆された。視細胞外節の食食・代謝にも、ライン間で差異があることが示唆された。

iPS 樹立に時間がかかったために、分化網膜細胞における各疾患での表現型の確定は、今後の課題である。機能亢進・低下がみられるもの、増殖率が違うものが存在することから、この中から、もっともスクリーニングとして適した再現性・易検出性・良好な再現性のものを見出すことで、非常に有用なスクリーニング系が樹立できると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Hasegawa T, Ikeda HO\*, Nakano N, Muraoka Y, Tsuruyama T, Okamoto-Furuta K, Kohda H, Yoshimura N. Changes in morphology and visual function over time in mouse models of retinal degeneration: an SD-OCT, histology, and electroretinography study. *Jpn J Ophthalmol* 60, 111-25, 2016. DOI: 10.1007/s10384-015-0422-0.
- ② Nakano N#, Ikeda HO\*#, Hasegawa T, Muraoka Y, Iwai S, Tsuruyama T, Nakano M, Fuchigami T, Shudo T, Kakizuka A, Yoshimura N. Neuroprotective effects of VCP modulators in mouse models of glaucoma. *Heliyon* 2, e00096, 2016. # equal contribution. DOI: 10.1016/j.heliyon.2016.e00096
- ③ Yamada H, Akagi T, Nakanishi H, Ikeda HO, Kimura Y, Suda K, Hasegawa T, Yoshikawa M, Iida Y, Yoshimura N. Microstructure of peripapillary atrophy and subsequent visual field progression in treated primary open-angle glaucoma. *Ophthalmology* DOI:2016, 123(3):542-551. 10.1016/j.ophtha.2015.10.061.
- ④ Nakanishi H, Akagi T, Hangai M, Kimura Y, Suda K, Hasegawa T, Yamada H, Yoshikawa M, Morooka S, Ikeda HO, Yoshimura N. Effect of axial length on macular ganglion cell complex thickness and on early glaucoma diagnosis by spectral-domain optical coherence tomography. *J Glaucoma* 2016, 25(5):e481-490. DOI: 10.1097/IJG.0000000000000330.
- ⑤ Kimura Y, Akagi T, Miyake M, Yamashiro K, Yoshikawa M, Yamada H, Hasegawa T, Suda K, Nakanishi H, Ohashi-Ikeda H, Gotoh N, Hangai M, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Yoshimura N. Association between the CDKN2B-AS1 gene and primary open angle glaucoma with high myopia in Japanese patients. *Ophthalmic Genet* 2016, 37(2):242-244. DOI: 10.3109/13816810.2015.1020559.
- ⑥ Hasegawa T, Akagi T, Hangai M, Yamada H, Suda K, Kimura Y, Nakanishi H, Ikeda HO, Yoshimura N. Structural dissociation of optic disc margin components with optic disc tilting: a spectral domain optical coherence tomography study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2016, 254(2):343-349. DOI: 10.1007/s00417-015-3210-0.
- ⑦ Suda K, Hangai M, Akagi T, Noma H, Kimura Y, Hasegawa T, Yamada H, Yoshikawa M, Nakanishi H, Ikeda HO, Yoshimura N. Comparison of longitudinal changes in functional and structural measures for evaluating progression of glaucomatous optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015, 56(9):5477-5484. DOI: 10.1167/iovs.15-16704.
- ⑧ Nakanishi H, Akagi T, Hangai M, Kimura Y, Suda K, Kumagai KK, Morooka S, Ikeda HO, Yoshimura N. Sensitivity and specificity for detecting early glaucoma in eyes with high myopia from normative database of macular ganglion cell complex thickness obtained from normal non-myopic or highly myopic Asian eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015, 253(7):1143-1152. DOI: 10.1007/s00417-015-3026-y.
- ⑨ Kimura Y, Akagi T, Miyake M, Yamashiro K, Yoshikawa M, Yamada H, Hasegawa T, Suda K, Nakanishi H, Ohashi-Ikeda H, Gotoh N, Hangai M, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Yoshimura N. Association between the CDKN2B-AS1 gene and primary open angle glaucoma with high myopia in Japanese patients. *Ophthalmic Genet* 2015:1-3. DOI: 10.3109/13816810.2015.1020559.
- ⑩ Hasegawa T, Akagi T, Yoshikawa M, Suda K, Yamada H, Kimura Y, Nakanishi H, Miyake M, Unoki N, Ikeda HO, Yoshimura N. Microcystic inner nuclear layer changes and retinal nerve fiber layer defects in eyes with glaucoma. *PLoS One* 2015, 10(6):e0130175. DOI: 10.1371/journal.pone.0130175. eCollection 2015. D

[学会発表] (計 7 件)

- ① CYP4V2 遺伝子ノックアウト培養細胞の表現型解析。畑匡侑、池田華子、後藤謙元、飯田悠人、吉川宗光、長谷川智子、村岡勇貴、吉村長久。日本眼科学会総会。平成 27 年 4 月 16-19、札幌。
- ② VCP modulator の CCR2 欠損マウスにおけるドルーゼン抑制の機序。飯田悠人、池田華子、吉川宗光、畑匡侑、長谷川智子、村岡勇貴、垣塚彰、吉村長久。日本眼科学会総会。平成 27 年 4 月 16-19、札幌。
- ③ Suppression of Drusen-like Deposits by a Novel VCP modulator in CCR2 Deficient mice. Yuki Muraoka, Hanako O Ikeda, Yuto Iida, Masayuki Hata, Tomoko Hasegawa, Munemitsu Yoshikawa, Akira Kakizuka, Nagahisa Yoshimura. ARVO
- ④ 正常眼圧緑内障モデルマウスにおける分岐鎖アミノ酸の神経節細胞保護効果の検討。長谷川智子、池田華子、村岡勇貴、垣

塚彰、吉村長久。第26回日本緑内障学会、平成27年9月11日、愛知。

- ⑤ レーザー高眼圧サルモデルにおける光干渉断層計を用いた長期経過観察。池田華子、浅井勇樹、森 哲、板谷正紀、庄司隆範、吉村長久。第26回日本緑内障学会、平成27年9月11日、愛知。
- ⑥ 網膜色素変性に対する新規神経保護治療。池田華子。平成27年5月30日、和歌山。
- ⑦ 網膜色素変性に対する新しい神経保護の開発。池田華子。第19回J R P S研究助成授与式、平成27年9月26日、群馬。

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

①名称：虚血性眼疾患の処置および/または予防用の医薬組成物

発明者：垣塚 彰、池田華子、吉村長久、畑匡侑。

権利者：国立大学法人京都大学

種類：用途特許

番号：PCT/JP2015/055619

出願年月日：2015年（平成27年）2月26日

国内外の別：国外

○取得状況（計3件）

①名称：眼疾患処置薬

発明者：垣塚 彰、堀 清次、池田華子、吉村長久、中野紀子、首藤敏之、瀧上智弘。

権利者：国立大学法人京都大学、他一社。

種類：用途特許

番号：特許5822840

取得年月日：平成27年10月16日

国内外の別：国内

②名称：眼疾患処置薬

発明者：垣塚 彰、堀 清次、池田華子、吉村長久、中野紀子、首藤敏之、瀧上智弘。

権利者：国立大学法人京都大学、他一社。

種類：用途特許

番号：米国 9206129

取得年月日：2015年（平成27年）12月8日

国内外の別：海外

③名称：眼疾患処置薬

発明者：垣塚 彰、堀 清次、池田華子、吉村長久、中野紀子、首藤敏之、瀧上智弘。

権利者：国立大学法人京都大学、他一社。

種類：用途特許

番号：イギリス・フランス 登録番号：2623494

取得年月日：2015年（平成27年）9月2日

国内外の別：海外

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.facebook.com/pages/京都大学網膜神経保護治療プロジェクト/312249548958205>

[http://www.kuhp.kyoto-](http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ganka/index.html)

[u.ac.jp/~ganka/index.html](http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ganka/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 華子 (IKEDA, Hanako)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20372162

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

畑 匡侑 (HATA, Masayuki)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70748269

垣塚 彰 (KAKIZUKA, Akira)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：80204329

平家 俊男 (HEIKE, Toshio)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90190173