

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09978

研究課題名(和文) ドラッグ・リポジショニングによるフックス角膜変性症治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a novel drug to treat corneal dystrophy by drug repositioning

研究代表者

榛村 重人 (SHIMMURA, Shigeto)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：00235780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：フックス角膜内皮変性症(FCD: Fuchs corneal dystrophy)は加齢とともに進行性に内皮細胞数の減少をきたし、水疱性角膜症をきたす疾患であるがその病態は不明な点が多い。本研究の目的はFCD患者由来iPS細胞から誘導した角膜内皮細胞を用いFCDの*in vitro*疾患モデルを確立し、病態解明や創薬開発を行うことである。申請者は慶應義塾大学倫理委員会の承認のもとFCD患者4名(3名日本人、1名オランダ人)の末梢血単球からiPS細胞を樹立し、既報を改変した方法により一か月の培養期間を経て角膜内皮細胞を誘導した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

得られたFCD患者由来角膜内皮細胞に対しqRT-PCRによる分化・小胞体ストレス・老化・代謝関連分子の解析を行った。また細胞死の指標となるCleaved caspase3, DNA損傷の指標となるH2AXのfociについても免疫染色しin cell analyzerを用いて解析を行った。さらにFlux Analyzerを用いてミトコンドリアストレステストを行った。結果、FCD疾患由来角膜内皮細胞では酸化ストレス・小胞体ストレス・DNA damage response が障害されていることが明らかになった。またこれらをrescueする薬剤として新規候補薬を発見した。

研究成果の概要(英文)：Fuchs corneal dystrophy (FCD) is a progressive disease of the corneal endothelium of unknown etiology. This investigation sought to derive induced pluripotent stem cells (iPS) from patients with Fuchs dystrophy, and to use these cells to investigate pathophysiology of the disease, as well as to develop new drugs for therapy. Following approval by the institutional review board, iPS cells were derived from the peripheral blood of 4 FCD patients (3 Japanese, 1 Dutch), and were differentiated into corneal endothelial cells. qRT-PCR was performed for markers of differentiation, ER stress, aging and cell metabolism. Immunocytochemistry was performed for cleaved caspase 3, gamma H2AX as markers of DNA damage, and data was imaged by in cell analyzer. Flux analyzer was used to measure mitochondrial stress. We found that FCD-derived endothelial cells were prone to oxidative stress, ER stress as well as DNA damage.

研究分野：眼科学

キーワード：疾患iPS細胞 ドラッグ・リポジショニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フックス角膜内皮変性症(FECD)とは角膜内皮細胞の早老症とも言われる疾患で、進行により角膜移植術を必要とする主要な原疾患での一つある。FECD は常染色体優性遺伝形式をもち、先進国においては失明につながる角膜疾患の上位を占める。滴状角膜 (guttata cornea) という特徴的所見を伴い、加齢とともに進行性に内皮細胞数の減少をきたし、不可逆的な角膜混濁 (水疱性角膜症) をきたす疾患である。多くの FECD 患者は成人後 (多くは 50 代 ~ 70 代) で発症する late-onset FECD であり、高齢化社会における有病者は増える一方である。実際、FECD による角膜移植例は増加傾向にあり、欧米では全症例のうちの 18 ~ 43% を占め、角膜移植適応疾患における第 1 位となった。発症前であっても滴状角膜の診断は容易であり、早期発見が可能でありながら、予防法がない点で多くの患者を不安にさせている。すなわち、発症前診断が容易にできるため、いずれ視力が低下し、角膜移植が必要になることを念頭に置きながら生活することが強いられている。本疾患の病因としては酸化ストレスや ER ストレスなどに対する過剰応答に伴う細胞変性、細胞死が知られているが、既存の研究は不死化した細胞を用いており細胞死のアッセイが困難であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、当研究室で樹立したフックス角膜内皮変性症(FECD)の患者に由来する疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いて角膜内皮細胞保護作用のある新規因子・薬剤の検索を行うことである。すでに疾患 iPS 細胞から角膜内皮細胞への分化誘導は成功しており、FECD の病態に小胞体ストレスと内皮間葉系移行(EMT)が関与していることを報告した。本申請では、誘導した角膜内皮細胞を用いて小胞体ストレスを中心とした疾患進行のメカニズムをさらに解析し、病態が異なる本邦型 FECD と欧米型 FECD の違いを検証する。最終的には、低分子化合物ライブラリのアッセイ系を用いて、ドラグリポジショニングによる FECD 新規予防薬、治療薬を開発する。

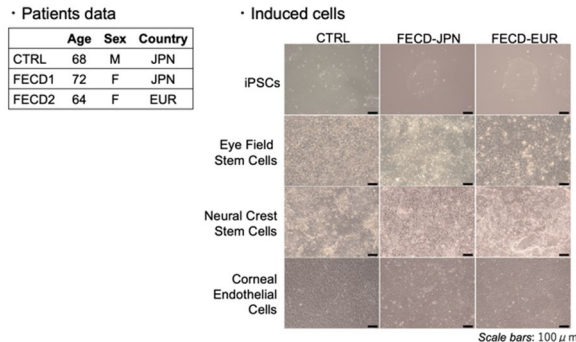
3. 研究の方法

慶應義塾大学の倫理委員会の承認を得て、角膜外来を受診した患者様で同意を得られた方から、Fuchs 角膜内皮変性症疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、既存の分化誘導方法に準じた方法で角膜内皮細胞へ誘導した。本研究では第一に、樹立した角膜内皮変性症患者由来 iPS 細胞の多分化能の検証、in vitro での角膜内皮への分化能力を確認する。第二に疾患表現型に関連する分子での病態を再現可能であるか検討する。第三にそれらの結果を踏まえ、ハイスループットスクリーニングによる薬剤評価系を作出し、新たな創薬を目指す。

4. 研究成果

- (1). 本研究では樹立した iPS 細胞を用いて三胚葉分化能を行い、いずれの細胞株からも内胚葉、中胚葉、外胚葉の三胚葉成分が得られた。また核型解析で異常がないこと、および多能性マーカーに関連する定量的 PCR も実施し、細胞源としての妥当性を検証した。Z01, CDH2 などを用いた免疫組織学的検討によりほぼすべての細胞でそれらの染色を確認した。また iPS 細胞から誘導して経時的にヒト角膜内皮細胞の複数の分化誘導指標遺伝子の発現上昇を認めることも確認した。

Induction of Corneal Endothelial Cells from FECD-derived iPSCs



(ア)

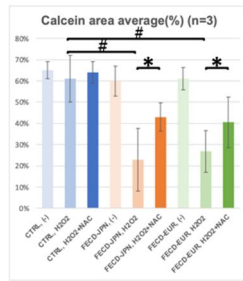
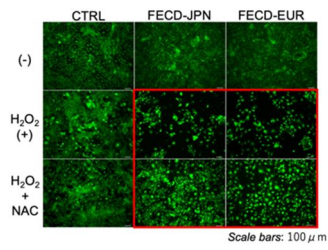
- (2). 研究期間内に Fuchs 角膜内皮変性症患者 iPS 由来誘導細胞を用いた疾患モデリングの評価系としての適性を疾患表現型の確認を実施した。iPS 細胞の段階では明らかな差異を認めないが、既報に準じた方法で角膜内皮細胞へ誘導すると様々なストレスに関連した表現系を確認した。ER ストレスに関しては EIF2 のリン酸化の亢進を確認したほか既知の pathway の変化を確認することができた。さらに研究期間にそれぞれの誘導細胞のキャラクタライゼーションを bulk RNAseq を用いて解析を実施した。ENCODE プロジェクトで用いられている解析パイプラインを用いて遺伝子発現定量解析、主成分分析、ヒートマップでの可視化を行った。既に樹立している健常人株、日本人株、欧米人株由来の誘導内皮細胞における発現変動遺伝子を解析し、既知の病態生理に関連する分子を確認した為疾患モデルとしての適性を確認した。

- (3). さらにドラッグリポジショニングを目的とした Fuchs 角膜内皮変性症患者 iPS 由来誘導細胞を用いた疾患モデリングとして、酸化ストレス負荷で細胞死を短時間で誘導し、生細胞染色 (Calcein) および死細胞染色 (PI) での評価系を確立した。Calcein 染色による生細胞の総面積は、酸化ストレス誘導後の疾患群では、コントロール群に比べて有意に低値であった。また抗酸化ストレス作用を有する N-acetyl-L-Cysteine (NAC) での病態改善効果も確認できしており、疾患群で酸化ストレス誘導及び NAC 添加後では、酸化ストレス誘導のみの群に比べて Calcein 陽性面積の有意な上昇を認めた。また DAPI, PI 陽性細胞数の比率においても同様の有意差を確認できた。各種ストレスモデルおよびそれらのレスキューできる至適条件を 96 well plate を用いた解析方法で陽性対照として実施する工程で、条件設定などの

数か月の微調整、追加の予備検討を必要とした。本学医学部先端医科学研究所遺伝子制御研究部門から供与を受けた 1200 種の薬剤ライブラリを提供頂いてアッセイに着手し、薬効のある化合物のスクリーニングを目下実施している。

Cell death by H₂O₂ can be reduced with N-acetyl-L-cysteine(NAC)

・ Cell viability assay- Calcein staining



#, * p<0.01

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamazaki R, Nejima R, Ichihashi Y, Miyata K, Tsubota K, Shimmura S.	4. 巻 64(6)
2. 論文標題 Descemet stripping and automated endothelial keratoplasty (DSAEK) versus non-Descemet stripping and automated endothelial keratoplasty (nDSAEK) for bullous keratopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 585-590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10384-020-00767-8.	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 Higa Kazunari, Higuchi Junko, Kimoto Reona, Miyashita Hideyuki, Shimazaki Jun, Tsubota Kazuo, Shimmura Shigeto	4. 巻 49
2. 論文標題 Human corneal limbal organoids maintaining limbal stem cell niche function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102012 ~ 102012
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2020.102012	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 Hatou Shin, Sayano Tomoko, Higa Kazunari, Inagaki Emi, Okano Yuji, Sato Yasunori, Okano Hideyuki, Tsubota Kazuo, Shimmura Shigeto	4. 巻 55
2. 論文標題 Transplantation of iPSC-derived corneal endothelial substitutes in a monkey corneal edema model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102497 ~ 102497
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2021.102497	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 Shimizu Shota, Sato Shinri, Taniguchi Hiroko, Shimizu Eisuke, He Jingliang, Hayashi Shunsuke, Negishi Kazuno, Ogawa Yoko, Shimmura Shigeto	4. 巻 11
2. 論文標題 Observation of Chronic Graft-Versus-Host Disease Mouse Model Cornea with In Vivo Confocal Microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 1515 ~ 1515
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics11081515	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 Rusch Robert Maximilian, Ogawa Yoko, Sato Shinri, Morikawa Satoru, Inagaki Emi, Shimizu Eisuke, Tsubota Kazuo, Shimmura Shigeto	4. 巻 22
2. 論文標題 MSCs Become Collagen-Type I Producing Cells with Different Phenotype in Allogeneic and Syngeneic Bone Marrow Transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4895 ~ 4895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22094895	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4件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Inagaki E, Sayano T, Yamazaki R, Fusaki N, Hatou S, Fujinami K, Sugai E, Okano F, Tsubota K, Shimmura S
2. 発表標題 Disease modeling by Human iPSC Derived Corneal Endothelial Cells from Patients with Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy
3. 学会等名 Gordon Research Conferences (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inagaki E, Sayano T, Yamazaki R, Fusaki N, Hatou S, Fujinami K, Sugai E, Okano F, Tsubota K, Shimmura S
2. 発表標題 Altered Aging Phenotypes in Human iPSC Derived Corneal Endothelial Cells from Patients with Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy
3. 学会等名 The 10th APRU Population Aging Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣絵海 佐矢野智子 山崎梨沙 房木ノエミ 羽藤晋 岡野栄之 坪田一男 榛村重人
2. 発表標題 フックス角膜内皮変性症患者由来iPS細胞を用いた疾患モデリング
3. 学会等名 角膜カンファレンス
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shimmura S
2. 発表標題 The Use of Stem Cells for Corneal Disease Models and Cell Therapy
3. 学会等名 Gordon Research Conferences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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

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