

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：患者由来 iPS 細胞を用いた加齢黄斑変性の病態解明・治療法の開発研究
2. 研究開発代表者： 辻川 明孝（香川大学医学部）
3. 研究開発の成果

1) ドルーゼンを持つ患者および正常人からの iPS 細胞樹立

京都大学 iPS 研究所基盤技術研究部門にて、癒合軟性ドルーゼンを有する患者 4 名、正常 3 名分の iPS 細胞の樹立した。

2) iPS 細胞樹立患者・正常対照者の遺伝子解析

4 名の疾患患者に対して 80 万個の SNP ジェノタイピングを実施した。高速エクソームシーケンスは当初の予定を変更し、網膜色素上皮(RPE)にまで分化しえた。iPS 細胞由来 RPE から DNA 抽出をおこなった。

3) 各患者由来 iPS 細胞から RPE への分化誘導、単層 RPE シートの作成

樹立された iPS 細胞を用いて、浮遊培養法による RPE への分化誘導を行い、シート状の RPE を作成した。

4) iPS 由来分化 RPE の形態評価

iPS 細胞由来の RPE を用いた免疫染色にて、患者・健常人由来 RPE とともに、ZO-1、アクチンの発現を確認でき、RPE が分化誘導されていることを確認できた。電子顕微鏡により分化 RPE 細胞の apical 側に微絨毛が存在し、タイトジャンクションおよび細胞質には豊富なメラニン顆粒を含んでおり、成熟した分化 RPE であることを確認した。通常の培養皿より、メンブレン上での培養で、より、極性をもった成熟した RPE に分化することが明らかになった。分化間もない RPE では、形態に関して患者・正常人での差異はなかったが、加齢状態を模する長期培養後の患者 iPS 由来 RPE では、細胞質内に空胞が観察された。

5) iPS 由来分化 RPE の機能・代謝・細胞ストレス評価

RPE 機能評価・代謝評価の実験系確立を行った。蛍光ビーズの細胞内への取込みを確認した。小胞体ストレス誘導薬であるタプシナルジンやツニカマイシンを投与した群では、ビーズ取込みの低下を認めた。フルオレセイン標識豚視細胞外節を用いた食食評価においても同様の結果であった。

次に、患者 iPS 由来および正常人 iPS 由来 RPE を用いて蛍光ビーズの食食実験を行った。フローサイトメトリーを用いた定量評価で、患者由来 RPE では食食能の低下を認めた。また、長期培養の患者 iPS 由来 RPE では、小胞体ストレスマーカーである CHOP や GRP78 蛋白の発現が上昇していた。

6) iPS 由来分化 RPE の遺伝子プロファイリング評価

患者及び健常人 iPS 由来の分化 RPE の遺伝子プロファイル評価目的で、各々から RNA を抽出し、発現 ライブラリーを作成した。健常人由来の RPE に関して、高速シーケンスにて遺伝子発現プロファイリングを行っている。

7) 遺伝子多型とドルーゼン形成の関連性に関するメカニズム解明

培養系でドルーゼンの形成状況を確認するために、メンブレン上でシート状に iPS 由来 RPE を長期間培養し、RPE 下にドルーゼン様沈着物が形成されるか検討した。その結果、RPE 下に APOE や補体成分である C5b-9 陽性の物質が沈着していることがあきらかになった。患者由来 RPE では、正常人由来 RPE と比べて、その沈着が多いように見えた。また、iPS 由来 RPE では長期培養にて、小胞体ストレスが惹起されていることがあきらかになった。

8) サルでの VCP 阻害剤のドルーゼンの消失・新規形成抑制効果の検討

眼底にドルーゼンを認めるカニクイザル 5 匹に対し、KUS 化合物を 10mg/kg/day から経口投与した。経過観察期間中、ドルーゼンの増加は認めなかった。また、ドルーゼン数や形態が減少と判定されるものがあつた。投薬期間中の全身、眼の副作用は認められず、眼・主要臓器の組織像にも投薬による影響は認められなかった。

9) VCP 阻害剤による患者 iPS 由来分化 RPE の賦活化検討

培養網膜色素上皮細胞である ARPE19 細胞を用いて、VCP 阻害剤が小胞体ストレスを抑制し、細胞保護効果を有していることを確認した。また、ARPE19 に小胞体ストレスを惹起し、食食能を低下させると、VCP 阻害剤の添加により食食能が若干改善することが明らかになった。