

眼の難病クリスタリン網膜症の発症メカニズムを解明

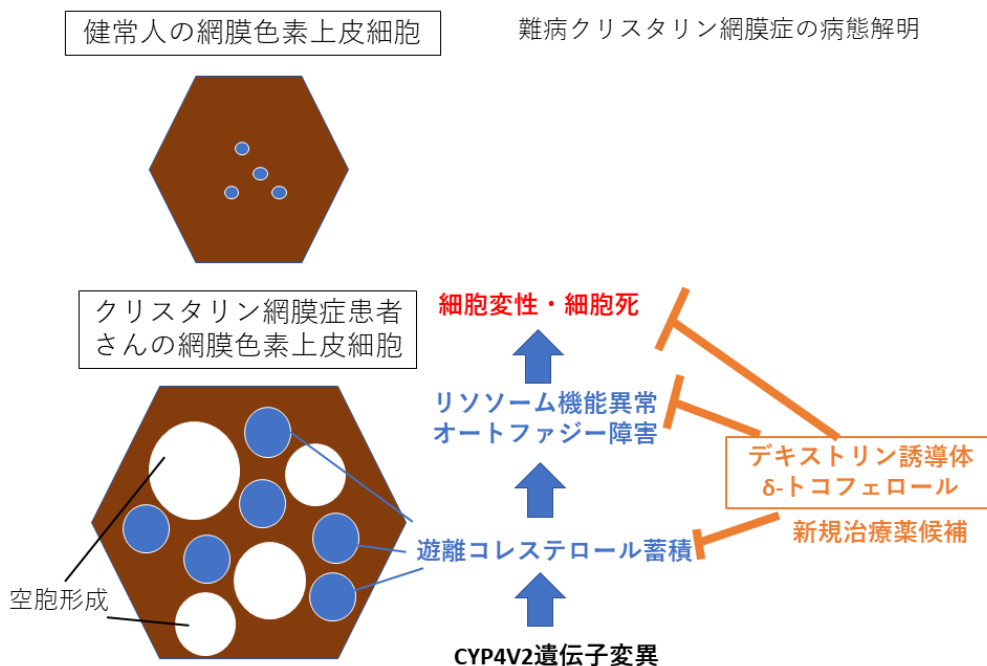
—治療薬の有力候補発見により創薬研究の進展に期待—

概要

京都大学医学部附属病院 畑匡侑 助教と池田華子 同准教授らの研究グループは、理化学研究所統合生命医科学研究センターメタボローム研究チーム（有田誠 TL、池田和貴副 TL）・京都大学 iPS 細胞研究所（CiRA：サイラ）・新潟薬科大学との共同研究で、患者由来の iPS 細胞を用いて、眼の難病であるクリスタリン網膜症の病態解明に成功しました。この新規の疾患発症機序を通して、いまだ治療薬のないクリスタリン網膜症に対する創薬研究の進展が期待されます。

クリスタリン網膜症は、日本人に多い遺伝性網膜変性疾患であり、病初期には網膜色素上皮細胞が障害され、その後 2 次的に視細胞障害が生じて網膜変性が進行することで最終的に失明に至ると考えられています。クリスタリン網膜症の原因遺伝子は、チトクローム P450 の CYP4V2 であると報告されていましたが、その病態は全く分かっていませんでした。本研究では、疾患特異的 iPS 細胞を用いて、患者さん由来の網膜色素上皮細胞を得ることで、試験管内での疾患モデルの作成に成功しました。患者さん由来の網膜色素上皮細胞では、空胞形成を伴う細胞変性が生じており、その結果、細胞死が引き起こされていました。また、患者さん由来の網膜色素上皮細胞に対して、網羅的脂質解析を用いることで、細胞内の遊離コレステロール蓄積がリソソーム機能障害を介して細胞変性・細胞死を引き起こしていることが明らかとなりました。更に、シクロデキストリン誘導体や δ -トコフェロールといった化合物は、網膜色素上皮細胞内の遊離コレステロール蓄積を阻害することで、クリスタリン網膜症の病態を改善させることが示されました。

本研究は、2018 年 3 月 26 日の週に「米国科学アカデミー紀要」(PNAS) に掲載されました。



1. 背景

クリスタリン網膜症は、網膜色素変性の類縁疾患に属する、進行性の遺伝性網膜変性疾患です。日本人に多く、病初期には網膜色素上皮細胞が障害され、その後2次的に視細胞障害が生じて網膜変性が進行することで最終的に失明に至ると考えられています。クリスタリン網膜症の原因遺伝子 *CYP4V2* のタンパク発現は網膜色素上皮細胞で強いことが知られています。また、*CYP4V2* 遺伝子は脂質代謝に関与するチトクローム P450(*CYP*)遺伝子ファミリーに属すること、そして、網膜色素上皮細胞は体内で最も活発な脂質代謝部位であることから、その内部での脂質代謝異常がクリスタリン網膜症の病態に関与していることが推測されています。これまで、*CYP4V2* による脂質代謝の全体像、そして、クリスタリン網膜症における網膜変性メカニズムは全く不明でした。病態研究が進んでいない理由として、病変組織、すなわち患者さんの網膜色素上皮細胞は生検などにより採取することができない部位であること、また適切な疾患モデルが存在しないことなどがありました。

2. 研究手法・成果

私たちは、*CYP4V2* ホモ変異をもつクリスタリン網膜症の患者さん3名および *CYP4V2* 変異のない健常人3名から iPS 細胞を樹立し、5~6 か月かけて iPS 細胞から網膜色素上皮細胞へと誘導しました。興味深いことに、クリスタリン網膜症患者さん由来の網膜色素上皮細胞では、健常人由来の細胞に比べて、細胞の空胞形成、大型化、メラニン色素沈着などの変性所見が強く認められ、徐々に細胞死が引き起こされていました。透過電子顕微鏡で細胞内の構造を詳細に確認すると、患者さん由来の網膜色素上皮細胞ではメラノソーム、オートファゴソームの蓄積がみられ、クリスタリン網膜症の病態にオートファジーが関与している可能性を示唆する所見を認めました。実際に、クリスタリン網膜症患者さん由来の網膜色素上皮細胞では、リソソーム機能障害によるオートファジー分解系の障害が生じていることが明らかとなりました。

次に、*CYP4V2* タンパクの脂質代謝への関与が考えられることから、LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) を用いた網羅的な脂質解析を行いました（理化学研究所との共同研究）。予想外なことに、クリスタリン網膜症患者さん由来の網膜色素上皮細胞内において、コレステロールエステル低下を認め、一方で、遊離コレステロールは増加していました。そこで、遊離コレステロールを減少させる作用のあるシクロデキストリン誘導体（2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: HPBCD や 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin: HPGCD）を患者さん由来の網膜色素上皮細胞に投与すると、リソソーム機能障害が軽減し、細胞障害が抑制されることが明らかになりました。同じく遊離コレステロールの減少作用を認めた δ -トコフェロールでも、細胞障害に対する改善効果を認めました。

本研究では、患者さん由来 iPS 細胞から誘導した網膜色素上皮細胞を用い、網羅的脂質解析を行うことで、当初は予想しえなかった病態を解明することができました。更に、病態に基づいた治療候補化合物検索により、遊離コレステロール蓄積阻害剤は、現在治療法のないクリスタリン網膜症に対して、有効な治療法となりうることを明らかにしました。

3. 波及効果、今後の予定

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（HPBCD や HPGCD）は、同じく難病である

ニーマンピック病 C 型の中枢神経症状に効果が期待されている化合物であり、熊本大学が中心となって臨床応用に向けて既に開発がすすめられています。私たちは、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と考えています。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、下記機関より資金的支援を受けて実施されました。

- 公益財団法人 小野医学研究財団
- ノバルティスファーマ
- 公益財団法人 武田科学振興財団
- 財団法人日本失明予防協会
- 日本学術振興会(JSPS)・文部科学省 科学研究費補助金：若手研究 B
- 日本医療研究開発機構 (AMED)：橋渡し研究 A シーズ
- 日本学術振興会(JSPS)・文部科学省 科研費新学術領域研究 (脂質クオリティが解き明かす生命現象：リボクオリティ)

関連研究機関：理化学研究所統合生命医科学研究センター、慶応義塾大学薬学部、新潟薬科大学薬学部

<用語解説>

クリスタリン網膜症：網膜色素変性の類縁疾患に属する、進行性の遺伝性網膜変性疾患のひとつ。常染色体劣性遺伝形式の網膜変性疾患の 10%を占めており、特に日本や中国など東アジアに有病率が高い。この疾患の特徴として、1. クリスタル様沈着物が眼底（特に網膜色素上皮細胞の付近）などに沈着すること、2. 網膜色素上皮細胞の萎縮が視細胞の萎縮に先行すること、があげられる。これらの特徴から、クリスタリン網膜症では網膜色素上皮細胞が初期病巣で、視細胞変性は二次的な変化と考えられている。

遺伝性網膜変性：遺伝子異常による視細胞および網膜色素上皮細胞の変性を特徴とし、網膜色素変性を代表疾患とする一連の疾患群。緑内障、糖尿病網膜症につぐ、日本人の失明原因の第 3 位であり、59 歳以下の中途失明原因に限ると第 1 位と失明原因の多くを占める。しかしながら、遺伝性網膜変性の病態の多くははまだ不明であり、有効な治療法は確立されておらず、難病指定を受けている。

疾患特異的 iPS 細胞：2007 年に報告されたヒト人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS 細胞)の作成技術により、特定の疾患の遺伝背景をもつ疾患特異的 iPS 細胞を患者さんの体細胞から樹立することが可能になった。iPS 細胞は多能性を獲得した幹細胞であり、既に確立された分化方法を用いて、例えば、患者由来 iPS 細胞を網膜色素上皮細胞へと分化させることで、患者の遺伝情報を有した網膜色素上皮細胞 (病変細胞)を獲得可能となる。この技術を用いることで、すでに遺伝性網膜変性の一部では、病態の試験管内での再現、病態解明の報告がされており、疾患特異的 iPS 細胞は病態解明・創薬研究になくてはならないツールになりつつある。

オートファジー：細胞内のタンパク質や細胞内小器官をリソソームにより分解する機構。まず細胞質に隔離膜が現れ、細胞質を包み込んで二重膜構造体（オートファゴソーム）を形成し、それが加水分解酵素を持つリソソームと融合して、タンパク質などが分解される。オートファジーは自食作用ともよばれ、特に飢餓状態で活性化し、エネルギー産生やタンパク質新生に寄与すると考えられる。また、リソソームの内腔は通常 pH5 前後に酸性化されており、加水分解酵素は酸性条件下で効率よく働く。

LC-MS/MS(liquid chromatography-tandem mass spectrometry) を用いた網羅的な脂質解析：リピドミクスとは、生体内の脂質および脂質代謝物の微細な変化を網羅的かつ高解像度で捉える技術であるが、リピドミクス測定では、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置（LC-MS/MS）がよく使用されており、クロマトグラフィーで分離した化合物の構造を、質量分析装置を用いて同定する。具体的には、化合物の保持時間、精密質量、同位体比、MS/MS スペクトルの 4 つの情報から化合物を同定している。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Reduction of lipid accumulation rescues Bietti's crystalline dystrophy phenotypes

著者：畑 匡侑、池田 華子、岩井 祥子、飯田 悠人、後藤 謙元、浅香 勲、池田 和貴、磯部 洋輔、堀 あや、
中川 沙織、大和 進、有田 誠、吉村 長久、辻川 明孝

掲載誌：Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America