

令和元年6月6日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11334

研究課題名(和文) 株化視細胞前駆細胞を用いた杆体細胞錐体細胞分化機構の解明

研究課題名(英文) Study on photoreceptor cell differentiation using cloned photoreceptor cell precursor

研究代表者

鈴木 登 (Suzuki, Noboru)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：40235982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々が樹立した株化 pax6導入iPS細胞は網膜神経前駆細胞の中でも視細胞前駆細胞に相当する。しかしその分化メカニズムはあまり明らかではない。今回網羅的トランスクリプトーム解析を行った。杆体視細胞への分化を誘導するSDF1刺激により、この細胞内ではthyroid hormone synthesis経路、Nitrogen metabolism経路、Prostate cancer経路の活性化が起こっていることが示された。既に杆体視細胞への分化にはthyroid hormone receptor betaの発現が起こることが知られているが、それを確認してさらに進展させる成績が得れた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視細胞前駆細胞から視細胞への分化メカニズムや細胞相互の関連性はあまり明らかではない。我々が樹立した株化 pax6導入iPS細胞は網膜神経前駆細胞の中でも視細胞前駆細胞に相当する分化段階の細胞である。この細胞を用いて視細胞前駆細胞の分化機構を解析した。そこでこの細胞をSDF1刺激して経時的に網羅的トランスクリプトーム解析を行った。これまでに視細胞に対して網羅的トランスクリプトーム解析は行われておらず、極めて独創性の高い研究である。臨床的には全く分子病態の明らかではない色覚異常をもたらす分子を同定できる可能性がある。同時に現時点では知られていない視細胞の全く新規な病態を明らかにする可能性も高い。

研究成果の概要(英文)：Among the retinal neural progenitor cells, the pax6-transfected iPS cells established by us correspond to photoreceptor precursors in mice. However, the differentiation mechanism of the photoreceptors is not so clear.

We conducted a total transcriptome analysis of the cloned photoreceptor precursor upon SDF1 stimulation using next generation sequencer.

We found that activation of the thyroid hormone synthesis pathway [KEGG:04918], nitrogen metabolism pathway [KEGG:00910], and prostate cancer pathway [KEGG:05215] is taking place in this cell by SDF1 stimulation that induces differentiation into rod photoreceptors. It has already been known that the expression of thyroid hormone receptor beta occurs upon differentiation into rod photoreceptors. Our findings confirmed involvement of thyroid hormone pathway for the rod photoreceptor differentiation and extended in more detail of the differentiation.

研究分野：再生医学

キーワード：網膜視細胞 杆体細胞 錐体細胞 SDF1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜組織は光情報受容の主体である神経網膜と網膜色素上皮から構成されている。神経網膜は発生学的に中枢神経系由来の組織であり一旦障害を受けるとその修復は困難である。

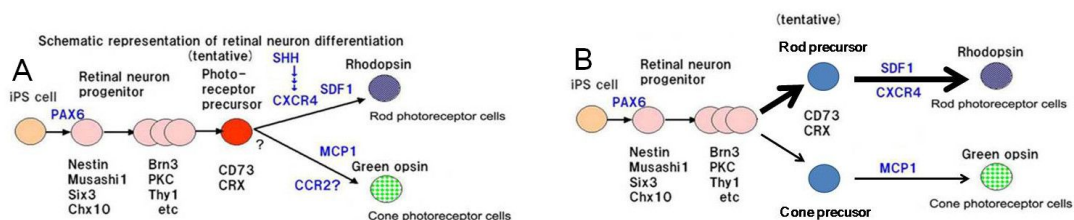
近年、理化学研究所の高橋らはヒト iPS 細胞から視細胞などを含む神経網膜や網膜色素上皮細胞などの眼の構成細胞を分化誘導しそれらを用いた臨床研究を行なっている。網膜疾患での失明の主要な原因は視細胞変性であり、一方最近増加している緑内障では網膜神経節細胞の変性が問題となる。最終的に神経節細胞や視細胞に分化できる神経網膜前駆細胞株の確立とそれを用いた網膜構成細胞の分化の調節機構の解明が待ち望まれている。

視細胞は明暗を感知する杆体視細胞と色覚を担う錐体視細胞とに大別される。これまでに視細胞の発生に關与する多くの転写因子が同定された。Maf 群転写因子 Nr1 (neural retina leucine zipper) 及び核内受容体 Nr2e3 (nuclear receptor subfamily 2, group E, member 3) は杆体視細胞に特異的に発現し、杆体視細胞に特異的な遺伝子発現を活性化、S 錐体に特異的な遺伝子発現を抑制する。ホメオボックス型転写因子 CRX (cone-rod homeobox containing gene) はロドプシン等網膜特異的遺伝子の発現をもたらす。

2. 研究の目的

この視細胞分化の過程で、網膜前駆細胞から神経節細胞や双極細胞、さらに視細胞前駆細胞から杆体視細胞と錐体視細胞とに分化する段階に關わる分子やその受容体、その後の細胞内シグナル伝達の詳細は不明である。iPS 細胞に pax6 を導入し限界希釈後に視細胞前駆細胞株を作成した (Neuroscience Letters 2012; 509: 116-120)。

網膜前駆細胞株 10 クローンのうち 8 クローンでは SDF1 との培養でロドプシン、CRX、RX1、NRL の mRNA 発現が濃度依存性に増強する。この作用が CXCR4 を介した SDF1 によるものである事は特異的な阻害剤 AMD3100 の添加実験による CD73 蛋白とロドプシン蛋白の発現抑制から示された。SDF1 は CRX の mRNA 発現を増強するのみならず、転写因子である CRX の核内移行を誘導した。SDF1 はロドプシンプロモーターの遺伝子転写を CRX の活性化、核内移行を介して増強した。培養終了時 (mature) には細胞質は楕円形から長方形となりロドプシンは核から離れた細胞質全体に存在する。現時点で一部の細胞株ではほぼ 100% に近いロドプシン陽性細胞が得られる。一方で SDF1 は iPS 由来網膜前駆細胞の網膜神経節細胞への分化は強く抑制する。このメカニズムの解析は株化網膜前駆細胞を培養して比較検討することで詳細に解明することが出来る。これまで我々は下図の A のモデルを想定していた。即ち、網膜前駆細胞から両者に共通の視細胞前駆細胞が存在して、それぞれ特異的刺激を受けて杆体と錐体の視細胞に分化するモデルである。しかしクローン化細胞株を持



3. 研究の方法

網膜視細胞分化の詳細な比較検討を行うため、上記の細胞を精製純化して、次世代シーケンサーを使用して Bioinformatic な解析を行う。我々がマウス iPS 細胞から作成したクローン化 pax6 導入細胞の一部 (10 株) の中で 8 クローンは視細胞前駆細胞の分化段階に対応する細胞株で in vitro でも in vivo でも杆体視細胞と錐体視細胞に分化する。この細胞株を高純度に精製し回収して網羅的なトランスクリプトーム解析を行う。全 mRNA から cDNA ライブラリを合成した後で Ion PGM シーケンサーを用いて全配列を解析する。RNA-Seq データ解析は、2x 50 bp のランで約 3000 万リードで行う。一次解析はシーケンサー装置で行い、塩基およびクオリティ値を Fastq 形式で算出し、ファイルサイズは約 3 GB 程度のデータを得る。この結果をもとに二次解析を行いリファレンスゲノムへのアライメント、カウント、補正を行う。ここでは TopHat を主体として無料アクセスが可能な Galaxy (リンク先は galaxy.psu.edu) を用いる。一部は有料であるが GiNeS (次世代シーケンシング対応ゲノム解析クラウドサービス) を用いてデータベース化した後に必要な情報のみを取捨

選択し解析を行う。これらの研究を通して網膜神経節細胞や視細胞の分化機構を遺伝子レベルで明らかにする。次世代シーケンサーに関して我々はデータの集積と十分な統計学的解析の経験を持つ。これらをさらに進めて眼発生の分子機構の全体的な理解につなげる。

4. 研究成果

我々がマウス iPS 細胞から作成したクローン化 pax6 導入細胞の一部 (10 株) の中で 8 クローンは視細胞前駆細胞の分化段階に対応する細胞株で in vitro でも in vivo でも杆体視細胞と錐体視細胞に分化する。高純度な網膜の構成細胞を、具体的には網膜神経節細胞、杆体視細胞と錐体視細胞を用いて網羅的なトランスクリプトーム解析を行った。

同一の視細胞前駆細胞 (Clone17 を用いた) に対して杆体視細胞を優先的に誘導する SDF1 刺激と錐体視細胞を誘導する MCP1 刺激と非刺激状態で mRNA を回収して行った検討を行った。同一の視細胞前駆細胞に SDF1 処理 (杆体視細胞誘導) と MCP1 処理 (錐体視細胞誘導) を行った場合には 37 遺伝子が 5% の有意差をもってそれらの発現に差異を認めた。FPKM (Fragments Per Kilo- base of transcript per Million mapped reads) の性質上、同一実験内の相対的な比較として結果を解釈すると、SDF1 は Nr2e3 を誘導しロドプシンを誘導するのに対して MCP1 は既知の転写因子には影響せずに Opn1sw を誘導すると考えられる。この成績は A モデルと矛盾しない。さらに MCP1 で特異的に誘導される mRNA の中に眼発生での機能が未同定の遺伝子が含まれている。その 37 遺伝子の中にオプシン誘導さらには錐体細胞分化の調節に働く分子が存在する可能性があり、現在はそこを詳細に検討している。

我々が樹立した株化 pax6 導入 iPS 細胞は網膜神経前駆細胞の中でも視細胞前駆細胞に相当する分化段階の細胞と考える。この細胞は視細胞分化のシグナルである SDF1 が作用すると、brn の発現が抑制され網膜神経節細胞への分化が遮断される。

我々の実験系ではクローンレベルで視細胞前駆細胞の杆体視細胞と錐体視細胞の分化メカニズムを詳細に解析することができる。このような細胞系はこれまで報告が無く、それを用いた成果として既にその分化に SDF1、MCP1 や FGF が重要に関わることを見出した (論文投稿中)。今後は細胞分化で誘導される転写因子や epigenetic 調節を解明し、視細胞前駆細胞の細胞内シグナル伝達機構にどのような変化をもたらして成熟視神経が分化誘導されるのかを明らかにする。この知見を応用すれば高度に純化された視細胞を in vitro で作成することが容易になり、それらは網膜疾患への移植治療への応用できる。高純度の視神経を移植しより安全でより完全な視力回復が可能な移植法を樹立する為の基礎検討として極めて重要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 24 件)

1. Shimizu J, Suzuki N, et al. Relative abundance of Megamonas hypermegale and Butyrivibrio species decreased in the intestine and its possible association with the T cell aberration by metabolite alteration in patients with Behcet's disease. Clin Rheumatol. 2019 Jan 9. doi: 10.1007/s10067-018-04419-8. [Epub ahead of print] 査読有
2. 鈴木 登. 【膠原病診療 update-診断・治療の最新知見-】 主要疾患の診断・治療の進歩 再発性多発軟骨炎. 日本臨床 2019.3; 77(3): 516-521. 査読無
3. 鈴木 登. 【診断と治療の ABC, リウマチ・膠原病】 (第 2 章) 再発性多発軟骨炎. 最新医学 別冊リウマチ・膠原病 2018.10; 217-228 査読無
4. 鈴木 登. 鈴木 知美. 再発性多発軟骨炎の診断と治療の現状. リウマチ科 2018.4; 59(4): 454-462. 査読無
5. 鈴木 登. 再発性多発軟骨炎は複数のサブグループに分類される. リウマチ科 2018.1; 59(1): 78-82. 査読無
6. Shimizu J, Suzuki N, et al. Relapsing polychondritis patients were divided into three subgroups: patients with respiratory involvement (R subgroup), patients with auricular involvement (A subgroup), and overlapping patients with both involvements (O subgroup), and each group had distinctive clinical characteristics. Medicine (Baltimore). 2018 Oct;97(42):e12837. doi: 10.1097/MD.00000000000012837. 査読有

7. Mertz P, Suzuki N, et al. The Relapsing Polychondritis Damage Index (RPDAM): development of a disease-specific damage score for relapsing polychondritis. *Joint Bone Spine*, 2018 in press 2018 Nov 15. pii: S1297-319X(18)30300-2. doi: 10.1016/j.jbspin.2018.11.001. [Epub ahead of print] 査読有
8. Shimizu J, Suzuki N, et al. Propionate-producing bacteria in the intestine may associate with skewed responses of IL10-producing regulatory T cells in patients with relapsing polychondritis. *PLoS One*. 2018; 20;13(9):e0203657. doi: 10.1371/journal.pone.0203657. eCollection 2018. 査読有
9. Shimizu J, Suzuki N, et al. Organ involvement pattern suggests subgroups within relapsing polychondritis: comment on the article by Dion et al. *Arthritis Rheumatol*. 2018[i14];70(1):148-149. doi: 10.1002/art.40330. 査読有
10. Suzuki N, et al. Cellular and Molecular Mechanisms Governing Functional Recovery of Dementia Mice after Neuronal cell Transplantation. *Journal of Neuroscience and Neurosurgery*. 2018; 1(2):1-8. 査読有
11. 清水 潤, 鈴木 登. ヒト末梢血 T 細胞分化関連遺伝子発現と腸内細菌叢の病理的関連検討. *Medical Science Digest Cutting edge*. 2017;Nov 査読無
12. Shimizu J, Suzuki N, et al. Organ Involvement Pattern Suggests Subgroups within Relapsing Polychondritis. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Sep 21. doi: 10.1002/art.40330. 査読有
13. Suzuki N, et al. Neuronal cell sheet of cortical motor neuron phenotype derived from human iPS cells. *Cell Transplant*. 2017; 26:1355-1364. doi: 10.1177/0963689717720280. 査読有
14. 岡 寛, 鈴木 登. 新たな指定難病としての膠原病関連疾患, 再発性多発軟骨炎 239 例の大規模疫学調査と 35 例の患者会アンケートの結果. *臨床免疫・アレルギー科*. 2016; 65:10-14. 査読無
15. 鈴木知美, 鈴木 登. 再発性多発軟骨炎の病態・診断・治療. *リウマチ科*, 2016;56(4): 422-430. 査読無
16. 清水 潤, 鈴木 登ら. ヒトアレルギー・免疫疾患における Th17 細胞異常と腸内細菌叢 Dysbiosis. *アレルギーの臨床*. 2016; 36: 148-153. 査読無
17. 鈴木 登. 関節症から全身性疾患を診る. 再発性多発軟骨炎. *リウマチ科*. 2016; 55: 203-208. 査読無
18. Arimitsu N, Suzuki N, et al. Human iPS cell derived neural cell sheets exhibit mature neural and extendable scaffold functions and promote recovery in injured mouse spinal cords. *J Stem Cell Res Med*. 2016; 1:41-47. doi: 10.15761/JSCRM.1000106 査読有
19. Shimizu J, Suzuki N. Enhanced Th17 responses with intestinal dysbiosis in human allergic, inflammatory, and autoimmune diseases. *Biomed Res Clin Prac*. 2016; 1: 58-61. 査読有
20. Suzuki N, et al. Cellular Transplantation as the Treatment of Alzheimer's Disease in Mouse Models. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. 2016; 6: 219. 査読有
21. Shimizu J, Suzuki N, et al. Bifidobacteria Abundance-Featured Gut Microbiota Compositional Change in Patients with Behcet's Disease. *PLoS One*. 2016; 11: e0153746. 査読有
22. Shimizu J, Suzuki N, et al. Cutaneous Manifestations of Patients with Relapsing Polychondritis: an association with extracutaneous complications. *Clin Rheumatol*. 2016; 35: 781-783. 査読有
23. Shimizu J, Suzuki N, et al. Cardiac involvement in relapsing polychondritis in Japan. *Rheumatology*. 2016; 55: 583-584[a3]. 査読有
24. Shimizu J, Suzuki N, et al. Possible association of proinflammatory cytokines including IL1 and TNF with enhanced Th17 cell differentiation in patients with

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 清水潤, 鈴木 登ら . 再発性多発軟骨炎は気道軟骨炎および耳介軟骨炎の有無により 2 群に分類される . 第 116 回日本内科学会総会・講演会 . 2019.4.26-28. (ポスター発表)
2. 藤原成芳, 鈴木 登ら . ヒト iPS 由来神経細胞移植による認知機能改善メカニズムについての検討 . 第 18 回日本再生医療学会総会 . 2019.3.21-13 .
3. Arimitsu N, Suzuki N, et al. Neural regeneration after transplantation of Neuronal cell sheet of cortical motor neuron phenotype. The 5th TERMIS-WC 2018. 4-7 September 2018.
4. Arimitsu N, Suzuki N, et al. NEURAL REGENERATION MECHANISMS IN TRANSPLANTATION OF NEURONAL CELLS DERIVED FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS WITH THE EFFECT OF THEIR PARACRINE SECRETION. International society for stem cell research 14th annual meeting. 20-23 JUNE 2018.
5. Fujiwara N, Suzuki N, et al. A STUDY ON THE IMPORTANCE OF REGENERATION OF GABAERGIC NEURONS IN RESTORING COGNITIVE FUNCTION BY HIPs DERIVED NEURAL CELL TRANSPLANTATION TO DEMENTIA MODEL MICE. International society for stem cell research 14th annual meeting. 20-23 JUNE 2018.
6. 藤原成芳, 鈴木 登ら . ヒト iPS 由来神経細胞移植による認知機能改善における改善メカニズムの解明, 第 17 回日本再生医療学会総会 . 2018.3.21-23
7. Arimitsu N, Suzuki N, et al. Reelin Signal Activation is Associated With Motor Function Recovery in the Neuron Transplantation of Hemiplegic Mice. the 51st Winter Conference on Brain Research (WCBR) . 14-19 January 2018.
8. Fujiwara N, Suzuki N, et al. RESTORATION OF REELIN/APOER2 INTERACTION RESTORE COGNITIVE DYSFUNCTION OF DEMENTIA MODER MICE AFTER TRANSPLANTATIOB OF HUMAN IPS CELL-DERIVED NEURAL STEM/PRECURSOR CELLS. International society for stem cell research 13th annual meeting. 14-17 JUNE 2017.
9. 清水潤, 鈴木 登ら . ペーチェット病で認められた腸内細菌叢の Dysbiosis . 第 114 回日本内科学会総会・講演会 . 2017.4.15
10. 鈴木 登 . 再発性多発性軟骨炎 : 診断と治療の現状と未来 . 第 61 回日本[a23]リウマチ学会 . 2017.4.21
11. 有光なぎさ, 鈴木 登ら . 幹細胞由来神経細胞移植による脳損傷マウスにおける神経再生 . 第 16 回日本再生医療学会総会 . 2017.3.7-9
12. 藤原成芳, 鈴木 登ら . ヒト iPS 由来神経細胞移植による認知機能改善と改善メカニズムについての検討 第 16 回日本再生医療学会総会 . 2017.3.7-9
13. 有光なぎさ, 鈴木 登ら . 脳損傷マウスに対する幹細胞由来神経細胞移植による神経再生 . 第 39 回日本分子生物学会 . 2016.12.2.
14. Shimizu J, Suzuki N, et al. Characteristic Compositional and Functional Alteration of Gut Microbiota in Patients with Behcet ' s Disease. 2016 ACR/ARHP annual meeting. 12-17, November, 2016.
15. Fujiwara N, Suzuki N, et al. RESTORATION OF HUMAN APP TRANSGENIC MOUSE COGNITIVE DYSFUNCTION AFTER TRANSPLANT OF HUMAN IPS CELL-DERIVED NEURAL STEM/PRECURSOR CELLS. International society for stem cell research 12th annual meeting 22-25 JUNE 2016.
16. 清水潤, 鈴木 登ら . ペーチェット病における Bifidobacterium 属優位の特徴的な腸内細菌叢 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会 . 2016.4
17. 清水潤, 鈴木 登ら . 再発性多発軟骨炎 (RP) の皮膚病変と皮膚外合併症との関連検討 (多施設アンケート調査) . 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会 . 2016.4
18. Fujiwara N, Suzuki N, et al. Human iPS derived neural stem/precursor improved spatial memory learning of dementia model mice .International Society for Stem Cell

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

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、研究者個人に帰属されます。