

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15736

研究課題名(和文)ミトコンドリアに着目した多能性幹細胞からの視細胞の新規高純化培養法の開発

研究課題名(英文)Development of purification method of photoreceptors differentiated from ES/iPS cells focusing on mitochondria

研究代表者

森藤 暁 (Moritoh, Satoru)

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：20647234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、ヒトのES/iPS細胞で報告されている網膜細胞への分化法をもとに、マウスES細胞からの新たな網膜細胞分化法を開発することができた。この網膜分化法は、マウスES細胞を解離したのち、胚様体を形成させ、この胚様体をマトリゲルコートした培養皿に入れたのち、マトリゲルを含んだ網膜分化培地を加え培養を継続するというもので、比較的簡便な分化方法である。当初の目的は、心筋で報告されているように、視細胞はミトコンドリア含量が高いことを利用して、網膜細胞分化系から視細胞を純化することだったが、視細胞を純化する方法の開発までには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多能性幹細胞(iPS/ES細胞)より、立体網膜や眼を構成する様々な細胞の分化誘導が可能になり再生医療への応用が進められている。本研究の当初の目的であった、視細胞はミトコンドリア含量が高いことを利用して、網膜細胞分化系から視細胞を純化する方法の開発までには至らなかったが、本研究によって開発できたマウスES細胞からの新たな網膜細胞分化法は、比較的簡便であり、今後の眼科学分野の再生医療のための基礎研究のなかで、有用な手段の一つになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed a new differentiation protocol for retinal cells from mouse embryonic stem cells based on the previously reported methods of human pluripotent stem cells. After embryoid body formation, we plated embryoid bodies on the Matrigel-coated dishes and covered them using Matrigel-containing retinal differentiation medium. This protocol is relatively simple and easy. Although our first aim of this project was to purify the photoreceptors which have high mitochondrial content differentiated from ES/iPS cells as in the case of previous reports of the purification of the cardiomyocytes, we could not achieve the purification of mitochondria-rich photoreceptors.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：網膜 多能性幹細胞 網膜細胞分化法 マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞 (iPS/ES 細胞) が樹立され、様々な細胞への分化誘導法の開発が行われ、再生医療へ向けた研究が進められている。眼科学領域でも、ヒト iPS 細胞から、立体網膜をはじめ、既に日本で臨床研究が開始されている色素上皮細胞の分化誘導法に加え、視細胞や網膜細胞の分化誘導法、網膜神経節細胞の分化誘導法などが開発されていた。しかし、色素上皮細胞以外では、特定の目的細胞の純度は高くないという状況であった。ミトコンドリアは、発生に伴って形態が成熟し細胞の代謝等に大きな影響を与えることが知られている。iPS/ES 細胞由来の心筋においては、心筋細胞のミトコンドリア含量が他の細胞より多いことを利用して、ミトコンドリアを蛍光色素により染色して細胞選別により純化する方法 (Hattori et al., 2010) や増殖細胞と心筋細胞の代謝の違いをもとに、心筋細胞のみが生存できる培地成分による高純度法 (Tohyama et al., 2013) が開発された。視細胞はミトコンドリアが多く、エネルギー代謝も活発であるため、ミトコンドリア含量やミトコンドリア機能や代謝特性を解析し選別に利用すれば、既存の網膜細胞への分化誘導系から視細胞のみを得るような純度の高い細胞選別法、培養法を開発できるのではないかと考え研究を開始した。

## 2. 研究の目的

多能性幹細胞 (iPS/ES 細胞) より、立体網膜や眼を構成する様々な細胞の分化誘導が可能になっているが、色素上皮細胞以外では、遺伝子改変技術を用いずに特定の眼の細胞を高純度に濃縮できる方法の開発には至っていない状況であった。心筋細胞の分化誘導では、他の細胞とのミトコンドリア含量やエネルギー代謝特性の違いを利用して、心筋細胞の高純度な選別法や培養法が開発されていた。そこで、本研究は、視細胞にミトコンドリアが多く代謝が活発な点に着目し、多能性幹細胞からの網膜細胞への分化誘導系を利用して、視細胞でのミトコンドリア含量が高いことを利用することで、網膜細胞集団から視細胞のみを高純度で濃縮できるような新規な高純度培養法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究材料

理研 BRC より入手したマウス ES 細胞株 EB5 と Rx-GFP については、未分化維持に LIF のみを用いて培養した。外部機関との共同研究により分譲を受けたマウス iPS 細胞株 Nr1-GFP とマウス ES 細胞株 Rx-GFP については、2i+LIF 法により、未分化培養を行った。

### (2) 本研究で開発したマウス ES 細胞からの網膜細胞への分化方法

網膜前駆細胞マーカーである Rax 遺伝子座に GFP がノックインされたマウス ES 細胞株 (Rx-GFP) を用いて、ヒト ES/iPS 細胞で報告されていた分化方法 (Boucherie et al., 2013; Sluch et al., 2015) をもとに網膜細胞への分化方法の検討を行った。マウス ES 細胞を解離したのち、低吸着の 96 ウエルプレートに 1 ウエル当たり 3000 個をまいて、胚様体を形成させ、この胚様体をマトリゲルコートした培養皿に入れたのち、マトリゲルを含んだ網膜分化培地を加え培養を継続するというものである。網膜分化培地には、マウス 3 次元網膜形成の改良法 (Assawachananont et al., 2014) で用いられているレチノイン酸受容体阻害剤 AGN193109 を使用した。

### (3) 3 次元網膜分化方法と FACS 解析

外部機関との共同研究により 3 次元網膜作製法 (Ito et al., 2017; Ueda et al., 2018) の指導を受け実施し、FACS 解析については、立命館大学内で、川村晃久博士、十河孝浩博士、小池千恵子博士との共同研究により実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 2016 年度

研究を開始するにあたり、理研 BRC から、マウス ES 細胞株 (Rx-GFP, EB5) を購入し、マウス ES 細胞の導入と網膜細胞分化系の立ち上げを行なった。Rx-GFP 株を用いて、既報の立体網膜の分化法 (Eiraku et al., 2011) を高酸素 CO<sub>2</sub> インキュベーターではなく通常の CO<sub>2</sub> インキュベーターにより試したが、長期培養の結果、GFP 陽性の網膜形成効率が低かったため、他の網膜分化法を検討することにした。そこで、比較的簡単な分化培地を用いている既報の中で、分化後細胞レベルでのミトコンドリアの観察により適する 2 次元的な分化培養系として、ヒト ES/iPS 細胞で報告された、未分化細胞塊をマトリゲルで挟み網膜細胞へと分化させる方法 (Boucherie et al., 2013; Sluch et al., 2015) が、マ

ウスES細胞でも可能かどうかの検討を行なった。まず、Rx-GFPを用いて、ヒトでの未分化細胞塊の代わりに、胚様体の大きさや分化培地を変え、マトリゲルコートした培養皿に胚様体を加えその上からマトリゲル入りの網膜分化培地を加え、胚様体をマトリゲルで挟む状態にし、レポーターGFPの発現を指標に分化条件の最適化を行なった。その結果、ES細胞3000個で胚様体を形成させたのち、網膜分化培地にレチノイン酸受容体阻害剤AGN193109を添加する条件で、分化開始後6日で、Rx-GFPのGFP蛍光が強く誘導されたため、この条件を用いることにした(図1)。この条件で、EB5株を用いて分化開始後30日(D30)までの経時的なサンプリングを行ない、未分化マーカー(*Nanog*)、網膜前駆細胞マーカー(*Rx*, *Pax6*, *Chx10*)、視細胞マーカー(*Crx*, *Recoverin*, *Nrl*)等の遺伝子発現をRT-PCRにより検討した(図2)。その結果、培養後期のサンプルにおいて、視細胞マーカー遺伝子の発現が上昇することが確認されたため、少なくとも一部の細胞は、本研究で実施した胚様体をマトリゲルで挟み込む方法により、網膜系の細胞への分化が起こっており、視細胞への分化も起こっていることが考えられた。

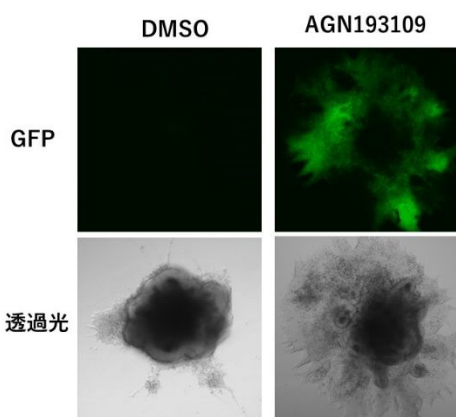


図1、マウス ES 細胞からの新規網膜細胞分化法

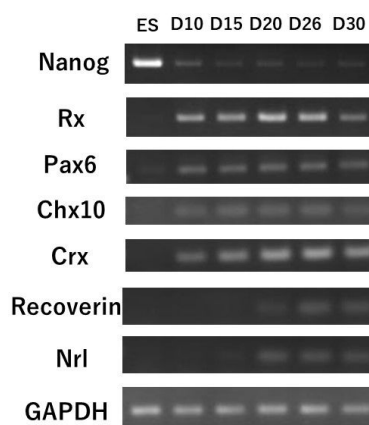


図2、網膜細胞マーカー遺伝子発現

## (2) 2017年度

研究代表者の福島県立医科大学から、立命館大学への異動にともない、まず、立命館大学へのマウスES細胞の再導入と細胞培養の立ち上げから開始した。MTAを再度締結して、理研BRCから、マウスES細胞株Rx-GFPとEB5を購入し、立命館大学へ導入し、立命館大学で、マウスES細胞の維持培養および網膜分化培養などの立ち上げを実施した。2016年度に、ミトコンドリアの観察に適した2次元分化培養法として、シャーレ内で胚様体をマトリゲルで挟むことによる分化培養法を福島県立医科大学において確立しているが、立命館大学でもこの分化法の確認を行った。Rx-GFP陽性細胞が、視床下部前駆細胞と網膜前駆細胞の可能性の両方の可能性があるため、分化開始後7日での抗体染色により、Rx-GFP陽性細胞の多くがPax6でも陽性となっていることから、この分化法により網膜前駆細胞へ分化していることが確認できた(図3)。2017年度は、より生体に近い分化培養法である既報の3次元網膜の分化培養法の導入を中心に行なった。当初の3次元網膜の分化実験では、初期には効率よく網膜細胞への分化が見られたが、その後の成熟培養中に網膜以外の細胞の割合が多くなってしまい、3次元網膜の作製には至らなかった。このため、外部機関との共同研究により3次元網膜作製法(Ito et al., 2017; Ueda et al., 2018)の指導を受け、立命館大学で、3次元網膜の分化培養を行ない、抗体染色により網膜層構造へ分化を確認することができた。視細胞のミトコンドリア解析を行なうため、当初は、レポーターノックイン系統を作る予定にしていたが、より信頼度が高いと考えられる、トランスジェニックマウスから作製された桿体視細胞を蛍光ラベルできるマウスiPS細胞(Nrl-GFP)を入手して、研究を行なうことにした。

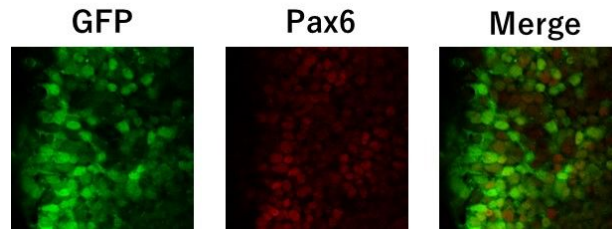


図3 分化開始後7日における GFP 抗体と Pax6 抗体との共染色画像

(3) 2018 年度

視細胞におけるミトコンドリア解析を進めるため、視細胞を蛍光ラベルできる多能性幹細胞として、外部機関の共同研究先からマウス iPS 細胞株である Nr1-GFP 株を導入した。この Nr1-GFP 株を用いて、本研究により見出した網膜細胞への分化法を試したが、GFP の蛍光が確認できなかった (data not shown)。これまで用いていた理化学研究所細胞バンクからの Rx-GFP 株は、LIF のみを加えて未分化培養していたが、Nr1-GFP 株は、LIF に加え 2 つの阻害剤を加える未分化培養法 (2i+LIF 法) という違いがある。2i+LIF 法によって未分化維持された Rx-GFP 株についても外部機関との共同研究により入手して、本研究により見出した網膜細胞への分化法で分化させたが、GFP 蛍光が観察できなかった (data not shown)。2i として加える阻害剤のうちの 1 つの CHIR99021 は、Wnt シグナルを活性化させることや、もう 1 つの阻害剤 PD325901 で DNA の低メチル化が誘導されることが報告されていることなどから、LIF のみで未分化培養された株では、網膜細胞に分化したが、2i+LIF で未分化培養された株では、本分化条件では、網膜細胞への分化が阻害された可能性があるのではないかと考えている。以上から、2i+LIF で未分化維持された Nr1-GFP 株を用いる解析では、本研究により見出した網膜細胞への分化法は使えないと判断した。

この Nr1-GFP 株は、3次元網膜に分化誘導が可能であるため、Nr1-GFP 株を3次元網膜に分化させ、分化開始後39日と43日の凝集塊をトリプシンにより解離させ、ミトコンドリア蛍光色素 TMRM を用いて染色をして、FACS 解析を行ったところ、GFP 陽性で TMRM 蛍光強度の高い強い細胞群 (図4 黒丸内) が存在していることから、この細胞群は、ミトコンドリア量の多い Nr1-GFP 陽性と考えられる桿体視細胞であることが考えられた。

Nr1-GFP (D43 + D39)

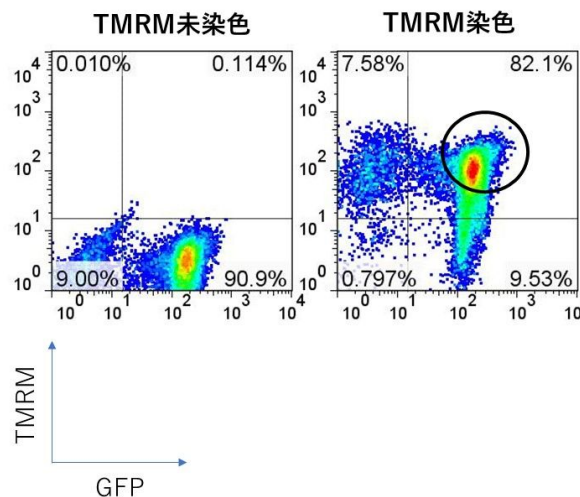


図4、マウス iPS 細胞株 Nr1-GFP より作製した 3 次元網膜での FACS 解析

(4) 2019 年度

本研究による分化法を利用するため、マウス ES 細胞株 EB5 を用いて視細胞や視細胞のミトコンドリアを蛍光ラベルできるようなノックイン細胞を作出するための、CRISPR/Cas9 を利用したノックイン用ベクターの構築を中心に実施したが、CRISPR/Cas9 用のベクターとノックインベクターの基本ベクターの構築までで研究期間を終了してしまい、ノックインベクターの最終段階までの構築には至らなかった。

以上から、本研究でマウス ES 細胞株を用いた新規網膜分化法を開発することはできたも

の、本研究の当初の目的であった、多能性幹細胞から網膜細胞を分化させ、視細胞にミトコンドリアが多いことを利用して、視細胞を濃縮する方法の開発という当初の課題を達成することはできなかった。

<引用文献>

- Assawachananont, J., Mandai, M., Okamoto, S., Yamada, C., Eiraku, M., Yonemura, S., Sasai, Y., and Takahashi, M. (2014). Transplantation of embryonic and induced pluripotent stem cell-derived 3D retinal sheets into retinal degenerative mice. *Stem Cell Reports* 2, 662-674.
- Boucherie, C., Mukherjee, S., Henckaerts, E., Thrasher, A.J., and Sowden, J.C. (2013). Brief report: Self-organizing neuroepithelium from human pluripotent stem cells facilitates derivation of photoreceptors. *Stem Cells* 31, 408-414.
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T., and Sasai, Y. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 472, 51-58.
- Hattori, F., Chen, H., Yamashita, H., Tohyama, S., Satoh, Y.S., Yuasa, S., Li, W., Yamakawa, H., Tanaka, T., Onitsuka, T., et al. (2010). Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat. Methods* 7, 61-66.
- Ito, S. ichiro, Onishi, A., and Takahashi, M. (2017). Chemically-induced photoreceptor degeneration and protection in mouse iPSC-derived three-dimensional retinal organoids. *Stem Cell Res.* 24, 94-101.
- Sluch, V.M., Davis, C.H.O., Ranganathan, V., Kerr, J.M., Krick, K., Martin, R., Berlinicke, C.A., Marsh-Armstrong, N., Diamond, J.S., Mao, H.Q., et al. (2015). Differentiation of human ESCs to retinal ganglion cells using a CRISPR engineered reporter cell line. *Sci. Rep.* 5, 1-17.
- Tohyama, S., Hattori, F., Sano, M., Hishiki, T., Nagahata, Y., Matsuura, T., Hashimoto, H., Suzuki, T., Yamashita, H., Satoh, Y., et al. (2013). Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 12, 127-137.
- Ueda, K., Onishi, A., Ito, S. ichiro, Nakamura, M., and Takahashi, M. (2018). Generation of three-dimensional retinal organoids expressing rhodopsin and S- and M-cone opsins from mouse stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495, 2595-2601.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	本間 美和子  (Homma Miwako)  (40192538)	福島県立医科大学・医学部・准教授    (21601)	