

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20320

研究課題名（和文）幹細胞分化3次元網膜様組織を用いた網膜神経節細胞の神経突起伸長に関する研究

研究課題名（英文）Research of neurite outgrowth from ganglion cells using retinal organoid differentiated from stem cells

研究代表者

前川 有紀 (MAEKAWA, Yuki)

長崎大学・病院（医学系）・助教

研究者番号：30530456

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：網膜疾患において網膜神経節細胞が傷害されると、これを回復させる治療法はなく、再生医療や神経保護療法に注目が集まっている。本研究では、胚性幹細胞および人工多能性幹細胞からの分化誘導により得られる立体的な網膜様組織から神経節細胞の軸索を伸長させる手法を向上させ、軸索伸長および維持に影響する因子を検索することを目的とした。

まず、誘導率が高いマトリゲル上での軸索伸長を免疫組織化学的手法で評価する系を確立した。また、様々な細胞外基質のうちラミニンが軸索伸長に重要であることを明らかにし、伸長した神経突起を光学顕微鏡像の2値化により定量的評価を可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞由来の分化網膜様組織から網膜神経節細胞の軸索伸長を誘導することは、網膜神経節細胞の発生過程における分子機構を明らかにする糸口になるだけでなく、将来の神経節細胞を用いた再生医療や神経保護治療開発において重要な手法になりえる。今回、軸索伸長の定量的な解析方法を確立したこと、細胞外基質であるラミニンが軸索伸長に重要な役割を果たしていることを明らかにしたことは、これらの目的に対する前進であるといえる。

研究成果の概要（英文）：Since irreversible visual impairment due to damage to retinal ganglion cells caused by various retinal diseases cannot be cured, neuroprotective treatments and regenerative medicine are attracting worldwide attention. This research was designed to advance methods of induction and evaluation of neuritogenesis from retinal ganglion cells in retinal organoids differentiated from stem cells and to search for effective factors in neurite outgrowth and maintenance.

A method of evaluating highly-inducible neuritogenesis on thick matrigel using whole-mount immunohistochemistry was established. The importance of laminin for neuritogenesis was demonstrated. Binarization and imaging analysis using phase-contrast optical micrograph enabled a continual and quantitative assessment of neuritogenesis.

研究分野：医学、眼科学、網膜

キーワード：網膜 網膜神経節細胞 軸索 細胞外基質 網膜グリア細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜神経節細胞は、緑内障や糖尿病網膜症、視神経炎、視神経症など様々な網膜疾患・視神経疾患で傷害されると、現代の医療ではこれを再生する治療は存在しないため、不可逆的な視機能低下を来す。このため、神経保護療法や再生医療に対する社会的な期待度は高い。網膜神経節細胞は核および胞体が網膜の内層に分布し、軸索が網膜内側面を伸長して視神経を形成し中脳各野に投射して機能することから、網膜神経節細胞の軸索伸長の機構を解明することは重要な課題である。網膜神経節細胞の解析方法の一つとして、網膜器培養を用いた軸索伸長モデルが旧来用いられてきたが、ヒトでは網膜組織を得ることは倫理的に困難であり、動物でも組織採取に伴う軸索損傷の影響など、いくつかの課題を有した。このため、幹細胞を用いて網膜神経節細胞を分化・獲得し、その軸索伸長を誘導することは、神経保護治療の開発や網膜-視神経発生の新たな知見を得る糸口となると考えられた。

2. 研究の目的

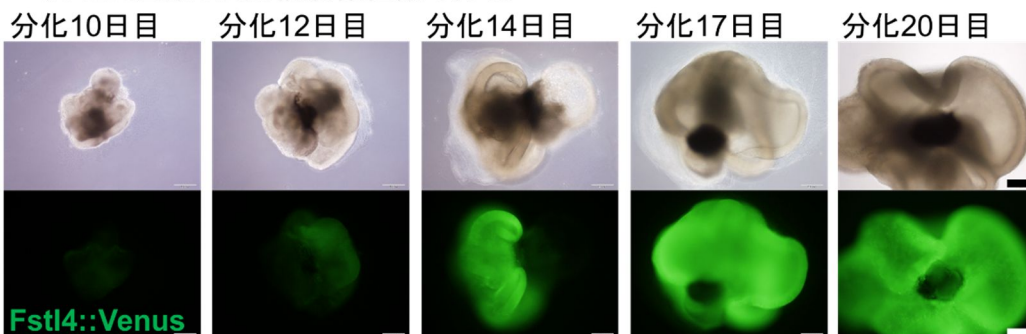
近年確立されたヒトやマウスなどから得られる胚性幹細胞 (ES 細胞) および誘導多能性幹細胞 (iPS 細胞) から立体的な網膜様組織を形成させる手法を用い、この 3 次元網膜様組織から網膜神経節細胞の軸索伸長を効率的に誘導する手法を確立すること、及びその定性的・定量的な評価方法を確立することを第 1 の目的とした。更に、網膜神経節細胞の生存や神経突起伸長に密に関連すると言われるグリア細胞の遊走を誘導し、グリア細胞と網膜神経節細胞のクロストークについて新たな知見を得ることを第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞からの 3 次元網膜様組織の分化誘導および軸索伸長の誘導

網膜神経節細胞の特定のサブタイプで胎生期網膜において発現する *Fstl4* に対する Venus K/I マウス受精卵より作成した ES 細胞を用いて、無結成凝集浮遊培養法 (SFEBq 法) により 3 次元網膜様組織を分化誘導した。得られた 3 次元網膜様組織の眼胞様部分を顕微鏡下で切離し、各種細胞外基質剤の被覆上で接着培養を行った。

マウス ESC 由来 3 次元網膜様組織の分化



(2) 細胞外基質剤の検討

分化 3 次元網膜様組織の眼胞様部位を、マトリゲル、ラミニン、1 型コラーゲン、4 型コラーゲン、フィブロネクチンなどの様々な細胞外基質の被覆上で接着培養し、接着率、軸索伸長発生率を求めた。伸長した神経突起を、生細胞染色、蛍光免疫組織染色、経時光学顕微鏡像の画像解析ソフトウェア ImageJ を用いた画像処理などで評価した。

(3) グリア細胞の分化と遊走の誘導

SFEBq 法により分化させた 3 次元網膜様組織におけるグリア系細胞マーカー glutamine synthetase (GS)、glial fibrillary acidic protein (GFAP) などの発現を Western blot 法を用いて確認した。また、分化 3 次元網膜様組織の眼胞様部位を、様々な細胞外基質の被覆上で接着培養を行い、グリア系細胞の遊走や網膜神経節細胞からの軸索伸長との関連を検討した。

(4) 網膜神経線維萎縮性疾患の構造的・機能的検討

網膜神経線維が萎縮する疾患は多岐にわたるが、緑内障の中でも難治である血管新生緑内障や、治療において神経網膜内層で最も豊富にラミニンを含有する内境界膜の剥離手術が行われる疾患である網膜分離症、網膜前膜、黄斑円孔、黄斑円孔網膜剥離などに着目し、その臨床経過や手術治療後の網膜構造変化、網膜感度変化とその評価方法としての視野検査について検討した。

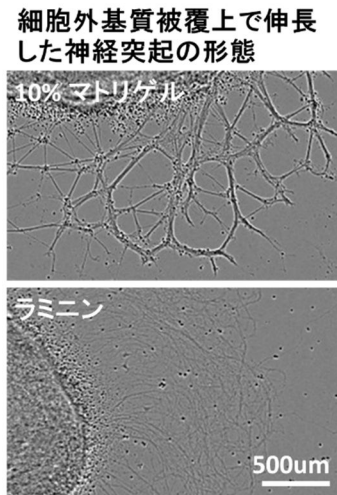
4. 研究成果

(1) 高効率軸索伸長手法と評価方法の確立

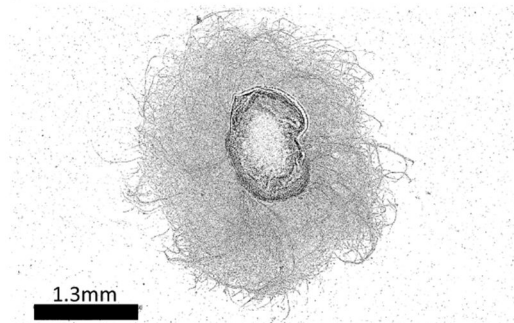
3次元網膜様組織より眼胞様部分を切離し、マトリゲル厚層被覆上で接着培養することで効率の高い軸索伸長が得られた。厚層内での軸索伸長を定性および定量的に評価する手法として、立体組織の whole-mount 蛍光免疫組織染色法およびその解析手法を整備した。

(2) 単独で網膜神経節細胞の軸索伸長を誘導する細胞外基質

様々な細胞外基質の内、ラミニン上で3次元網膜様組織の接着率が良好であり、網膜神経節細胞からの軸索伸長発生率も高いことが示された。ラミニン上で伸長した軸索の形態的な特徴として、神経突起は細く、微細な網目状に走行した。



分化3次元網膜様組織から切離した眼胞様部分の網膜神経節細胞より伸長した神経突起の二値化像



(3) ラミニン被覆上で誘導される軸索の経時定量的評価方法

微細な形態をとるラミニン上での神経突起はカウントや長さによる評価は困難だった。この微細な神経突起の経時的かつ定量的評価方法として、培養器内設置型の自動撮影光学顕微鏡により得られる位相差像を、画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて2値化し、簡潔な処理で数値化し、定量的に評価する手法を確立した。

(4) グリア細胞の分化と遊走の誘導

Western blot 法を用いて、3次元網膜様組織内でグリア細胞のマーカーである glutamine synthetase (GS)および glial fibrillary acidic protein (GFAP)の発現を確認した。また、幹細胞由来の3次元網膜様組織より切離した眼胞様組織をフィブロネクチン被覆上で接着培養することにより、グリア系細胞の遊走およびそれに重なって神経突起束の伸長が誘導されることを確認した。

(5) 強度近視による網膜分離症に対する硝子体切除及び内境界膜剥離術後の視力と網膜の構造的変化の関連性を検討し、術後には分離の残存よりも網膜菲薄化が視力予後に有意に関連することが明らかになった。血管新生緑内障では、長期的な治療経過を解析し、治療開始3年目で小数視力0.7以上を全体の25%近くで維持できており、10年前の既報群と比較すると目覚ましい改善がみられるものの、今だ30%程度は少数視力0.1未満と視力予後不良であり、現行の治療における限界が明らかとなった。また、網膜感度の評価系として最も普及した静的視野検査であるハンフリー視野計(カールツァイスメディテック社、アメリカ)では、黄斑部機能が障害されている症例での片眼検査では固視の移動・不安定性が検査精度に影響することが知られているため、眼底をトラッキングしながら黄斑部の任意の位置の感度を測定するMP-1(ニデック社、イタリア)、および両眼開放同時視野検査が可能なimo(クリュートメディカルシステムズ、日本)に着目し、黄斑前膜および黄斑円孔における黄斑部視野感度を検討した。片眼性の黄斑円孔や黄斑前膜におけるimoによる両眼開放同時視野検査では、患眼・検眼での検査精度項目の有意差は認められなかった一方で、眼位異常の影響を受けやすいなどの特徴を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 前川有紀、原 佑妃、松本牧子、築城英子、隈上武志、北岡 隆	4. 巻 72(6)
2. 論文標題 ぶどう膜炎に続発した血管新生緑内障2症例の前房内VEGF濃度と治療経過.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床眼科	6. 最初と最後の頁 787-793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Maekawa Y, Onishi A, Matsushita K, Koide N, Mandai M, Suzuma K, Kitaoka T, Kuwahara A, Ozone C, Nakano T, Eiraku M, Takahashi M	4. 巻 41
2. 論文標題 Optimized Culture System to Induce Neurite Outgrowth From Retinal Ganglion Cells in Three-Dimensional Retinal Aggregates Differentiated From Mouse and Human Embryonic Stem Cells.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Curr Eye Res	6. 最初と最後の頁 558-568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3109/02713683.2015.1038359	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 前川有紀、佐藤健人、松本牧子、築城英子、隈上武志、北岡隆
2. 発表標題 血管新生緑内障の3年間の臨床治療成績
3. 学会等名 第58回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山郁人、前川有紀、草野真央、築城英子、北岡隆
2. 発表標題 黄斑円孔網膜剥離に対する硝子体手術成績
3. 学会等名 第89回九州眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤健人、前川有紀、隈上武志、北岡隆
2. 発表標題 当院での3年間に行ったバルベルト緑内障手術の長期データ報告
3. 学会等名 第89回九州眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Maekawa, Syougo Ikeda, Eiko Tsuiki, Takashi Kitaoka
2. 発表標題 Binocular random perimetry of unilateral macular hole without occlusion
3. 学会等名 ARVO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野良太、ヤッセルヘルミーモハメド、前川有紀、米田愛、木下博文、山田義久、築城英子、藤川垂月茶、隈上武志、北岡隆
2. 発表標題 黄斑前膜において内境界膜剥離の有無が術後網膜に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋美和、前川有紀、森田梢、町田祥、上松聖典、北岡隆
2. 発表標題 光学式眼軸長測定装置の角膜曲率半径と術後屈折誤差に対する角膜疾患の影響
3. 学会等名 第42回日本眼科手術学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前川有紀、池田章吾、築城英子、北岡隆
2. 発表標題 片眼性網膜前膜における両眼開放同時静的視野検査による網膜感度評価
3. 学会等名 第57回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前川有紀、原佑妃、松本牧子、築城英子、隈上武志、北岡隆
2. 発表標題 ぶどう膜炎に続発した非虚血性血管新生緑内障2症例の前房内VEGF濃度と治療経過
3. 学会等名 第71回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前川有紀、築城英子、北岡隆
2. 発表標題 強度近視の網膜分離症に対する硝子体手術の術後経過
3. 学会等名 第56回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前川有紀、大西暁士、小出直史、鈴間潔、万代道子、北岡隆、高橋政代
2. 発表標題 マウスES細胞由来分化網膜から神経節細胞の神経突起を伸長させる細胞外基質の検討
3. 学会等名 第120回日本眼科学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Maekawa Y, Onishi A, Koide N, Suzuma K, Mandai M, Kitaoka T, Takahashi M
2. 発表標題 Extracellular matrices preferable to neurite outgrowth from retinal organoids differentiated from mouse embryonic stem cells.
3. 学会等名 ARVO2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 前川有紀、大西暁士、小出直史、鈴間潔、万代道子、高橋政代、北岡隆
2. 発表標題 マウスES細胞由来分化網膜の神経説細胞より伸長する神経突起の観察と解析
3. 学会等名 第48回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 前川有紀、築城英子、草野真央、脇山はるみ、北岡 隆
2. 発表標題 黄斑部脈絡膜申請血管に対する硝子体内注射後の通院中断に影響する因子の検討
3. 学会等名 第55回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2016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
研究協力者	北岡 隆 (KITAOKA Takashi)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	木下 博文 (KINOSHITA Hirofumi)		
研究協力者	大野 梢 (OHNO Kozue)		
研究協力者	米田 愛 (YONEDA Ai)		
研究協力者	井上 大輔 (INOUE Daisuke)		
研究協力者	山田 香菜子 (YAMADA Kanako)		
研究協力者	恒成 由美子 (TSUNENARI Yumiko)		
研究協力者	浜崎 幸子 (HAMASAKI Sachiiko)		
研究協力者	鈴間 潔 (SUZUMA Kiyoshi)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高橋 政代 (TAKAHASHI Masayo)		
研究協力者	万代 道子 (MANDAI Michiko)		
研究協力者	大西 暁士 (ONISHI Akishi)		
研究協力者	渡邊 健人 (WATANABE Takehito)		