

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11498

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来網膜色素上皮細胞を用いた脈絡膜再生

研究課題名(英文) Regeneration of choroidal vessel using human induced pluripotent stem cell derived retinal pigment epithelium

研究代表者

鎌尾 浩行 (Kamao, Hiroyuki)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：30388946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：日本の主要な失明原因の一つである脈絡膜萎縮に対する治療法はない。これに対して、網膜色素上皮細胞(RPE)と血管内皮細胞(HUVEC)を移植することで脈絡膜の再生が得られるか研究を行った。RPEとHUVECを同時に移植するため、iPS細胞から作製したRPE細胞シートとHUVECを共培養することで、HUVECが接着したiPS-RPE細胞シートを作製することに成功した。しかし、脈絡膜萎縮したウサギ網膜にHUVECが接着したiPS-RPE細胞シートを移植したが、脈絡膜の再生は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脈絡膜萎縮は日本の主要な失明原因の一つであるにもかかわらず治療法はないため、様々な研究が行われている。これまでに我々はiPS細胞から作製したRPEを加齢黄斑変性患者に移植する臨床研究に成功している。そこで、これまでの研究結果を基にRPEと血管内皮細胞の同時移植を試みた。動物実験においては脈絡膜の再生は得られなかったが、移植片であるHUVECが接着したiPS-RPE細胞シートを作製することに成功したため、脈絡膜萎縮の治療方法の足掛かりになると考える。

研究成果の概要(英文)：There is no therapy for choroidal atrophy, one of the leading causes of blindness in Japan. We investigated whether transplantation of retinal pigment epithelium (RPE) and vascular endothelial cells (HUVEC) regenerate the choroidal atrophy. A HUVEC adhered to the human iPS-RPE cell sheet was produced by co-culture. Although we transplanted the HUVEC-adhered iPS-RPE cell sheet to choroidal atrophy in rabbit, choroidal regeneration was not obtained.

研究分野：網膜硝子体

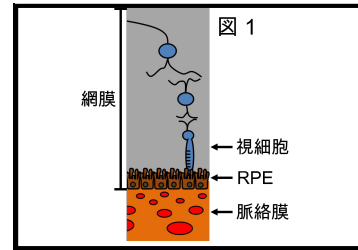
キーワード：ヒトiPS細胞 網膜色素上皮細胞 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

眼球は外界の視覚情報を受けとり脳へ伝える感覚器官で、この視覚情報を受けとる組織が眼球の最内層に位置する網膜です。この網膜は視細胞などの神経細胞と網膜色素上皮細胞 (RPE) で構成されています (図 1)。

2007 年度の調査報告によると、日本の視覚障害者数は約 164 万人、視覚障害による総経済コストは約 8 兆 8000 億円と算出されており、個々の問題だけでなく厳しい医療経済の観点からも視覚障害への対応が迫られています。

この視覚障害の引き起こす主要な病気の一つに“加齢黄斑変性”があります。この加齢黄斑変性は、RPE の機能が低下することで脈絡膜に新生血管 (病的血管) が生じ、これが網膜内出血や浮腫を引き起こすことで視力が低下する病気です。加齢黄斑変性に対する治療として、血管内皮増殖因子 (VEGF) 阻害薬とレーザー治療 (PDT) があり、これにより視力予後が改善しています。しかし治療を継続することで、視細胞に栄養を供給する血管組織である脈絡膜血管が萎縮し視力が低下することが最近報告されるようになり (文献)、これに対する治療方法が無い問題となっています。



2. 研究の目的

これまでに私たちは、ヒト iPS 細胞から RPE を作製し、2014 年に加齢黄斑変性の患者さんへのヒト iPS 細胞由来 RPE の移植に成功しています。これまでに RPE は脈管形成や血管新生に関与する VEGF を分泌していることが確認されています。このため、脈絡膜の血管萎縮部位にヒト iPS 細胞由来 RPE を移植することで、移植細胞より分泌される VEGF が周囲の健全部位より血管を誘導し、萎縮部位の脈絡膜を再生できるのではないかと考えました。

そこで、はじめにレーザーを用いて脈絡膜萎縮のモデル動物の作製を試みました。次にヒト iPS 細胞由来 RPE を作製した脈絡膜萎縮部位に対して移植することで、周囲の脈絡膜血管を誘導できるかを評価しました

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞の培養とヒト iPS 細胞由来 RPE の作製

目的：移植細胞を作製するため。

方法：文献 に準じて、ヒト iPS 細胞の培養とヒト iPS 細胞由来 RPE の作製を行う。

(2) ヒト iPS 細胞由来 RPE と血管内皮細胞の共培養

目的：ヒト iPS 細胞由来 RPE が血管内皮細胞の細胞増殖を促すかを確認する。また共培養が可能であれば、血管再生を目的に共移植用の移植片も作製する。

方法：血管内皮細胞は市販されているヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いる。2 重皿を用いて、ヒト iPS 細胞由来 RPE を上側、HUVEC を下側に培養する。培地は臨床応用を念頭に、血清フリーの培地を用いる。

(3) 脈絡膜萎縮のモデル動物の作製

目的：本研究の治療対象である脈絡膜萎縮のモデル動物がないため、これを作製する。

方法：細胞移植や移植後の評価を考え、ヒトと同程度の大きさの眼球を有する有色ウサギを使用する。ウサギの網膜に対して PDT を施行する。PDT の方法は、臨床で用いられているベルテポルフィン静脈内投与 (6mg/m²) とレーザー (波長 689nm, エネルギー 50J, 83 秒) を行う。PDT 後、経時的に造影剤検査で脈絡膜の血流状態を評価する。

(4) 萎縮部位へのヒト iPS 細胞由来 RPE 移植

目的：ヒト iPS 細胞由来 RPE 移植により脈絡膜萎縮部位の血管が再生するかを確認する。

方法：細胞移植の方法は文献 に準じる。移植後、経時的に造影剤検査で脈絡膜の血流状態を評価する。また、光干渉断層像 (OCT) や組織切片で組織学的評価脈に脈絡膜血管の状態を評価する。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞の培養とヒト iPS 細胞由来 RPE の作製

文献 に準じて、ヒト iPS 細胞の培養とヒト iPS 細胞由来 RPE の作製を行うことができた。

培養した iPS 細胞は、免疫細胞染色にて未分化マーカーである OCT3/4、Nanog、SSEA-4、TRA-1-60 の発現を確認した。また多能性は、免疫不全マウスの精巢に細胞移植し奇形種形成の確認にて行った。

作製したヒト iPS 細胞由来 RPE は、RT-PCR にて RPE 特有遺伝子である BEST1、RPE65、MERTK、CRALBP の発現と、免疫細胞染色にて RPE 特有遺伝子である PAX6、MITF、BEST1、RPE65 の発現を確認した。また機能評価として、成長因子分泌である VEGF と色素上皮由来因子 (PEDF) の分泌を ELISA 法で確認した。

(2) ヒト iPS 細胞由来 RPE と HUVEC の共培養

ヒト iPS 細胞由来 RPE と HUVEC の共培養が可能かを評価するために、血管内皮細胞用培地、

RPE 用培地、作製したヒト iPS 細胞由来 RPE の培養上清 (1 日間、2 日間) を用いて、血管内皮細胞の細胞増殖率を評価した。

結果: 血管内皮細胞用培地、RPE 用培地、作製したヒト iPS 細胞由来 RPE の培養上清 (1 日間、2 日間) のそれぞれの VEGF 濃度は、1.44、2.64、2.80、0 ng/ml であった。

・ HUVEC の細胞数 (図 2)

縦軸: HUVEC の細胞数

横軸: EM-血管内皮細胞用培地、F10-RPE 用培地、F10-1-作製したヒト iPS 細胞由来 RPE の培養上清 (1 日間) F10-2-作製したヒト iPS 細胞由来 RPE の培養上清 (2 日間)

HUVEC の細胞数はヒト iPS 細胞由来 RPE の培養上清 (1 日間) が有意に高かった。

・ HUVEC の管腔形成 (コラーゲン上で培養)

縦軸: HUVEC の細胞数 (図 3)

横軸: EM-血管内皮細胞用培地、F10-RPE 用培地、F10-1-作製したヒト iPS 細胞由来 RPE の培養上清 (1 日間) F10-2-作製したヒト iPS 細胞由来 RPE の培養上清 (2 日間)

HUVEC の管腔形成は、ヒト iPS 細胞由来 RPE の培養上清 (1 日間) での培養が血管内皮細胞用培地と同等であった。

また、2 重皿を用いてヒト iPS 細胞由来 RPE を上側、HUVEC を下側に培養し、共培養ができることも確認したことから、ヒト iPS 細胞由来 RPE が分泌する VEGF により HUVEC との共培養が可能であると結論付けた。

(3) 脈絡膜萎縮のモデル動物の作製

脈絡膜萎縮モデル動物にを作製させる目的で、ヒトと同程度の大きさの眼球を有する有色ウサギに光線力学療法を施行した。光線力学療法の方法は、臨床で用いられているベルテポルフィン濃度とレーザー設定では脈絡膜萎縮を誘導することができなかったため照射時間を 2 倍 (166 秒) に変更し行った。レーザー照射 1 ヶ月後と 3 か月後にフルオレセイン造影検査にて網膜血管、インドシアニングリーン造影検査にて脈絡膜血管の血流状態を評価した。結果は網膜血管の血流状態に有意な変化は認めなかった。一方、脈絡膜血管はレーザー照射 1 ヶ月後において照射部位に一致した低蛍光を認めたため、レーザー治療により脈絡毛細血管の血流が低下することが示された。さらにレーザー照射 3 ヶ月後においても同様の照射部位に一致した低蛍光を認めたため、照射時間 2 倍 (166 秒) による光線力学療法はウサギ脈絡膜の血流低下を誘導することが示された。

(4) 萎縮部位へのヒト iPS 細胞由来 RPE 移植

ヒト iPSC-RPE による脈絡膜再生を確認するため、光線力学療法で作製した脈絡膜萎縮モデル動物に対してヒト iPSC-RPE の細胞シートを移植した。始めにヒトと同程度の大きさの眼球を有する有色ウサギに光線力学療法を施行し、脈絡膜血管の灌流障害を認めたレーザー照射 1 ヶ月後において細胞移植を施行した。その後、経時的にインドシアニングリーン造影検査にて脈絡膜の循環状態を評価した。結果は、レーザー照射部位の低還流領域に移植した細胞シート周辺において脈絡膜還流の回復は認めなかった。また組織学的所見においても、レーザー照射部位の網脈絡膜が萎縮していた。

次に、ヒト iPSC-RPE と HUVEC の同時移植による脈絡膜再生を確認した。(図 4)

作製した脈絡膜萎縮動物モデルに HUVEC が接着した hiPSC-RPE の細胞シートを移植した。結果は、レーザー照射部位の低還流領域に移植した細胞シート周辺において脈絡膜還流の回復は認めなかった。また組織学的所見においても、レーザー照射部位の網脈絡膜が萎縮していたため、ヒト iPSC-RPE と HUVEC の同時移植による脈絡膜の再生は確認できなかった。

最後に、ヒト iPSC-RPE と HUVEC の同時移植で、移植した HUVEC が細胞増殖または管腔形成が起こるかを、免疫不全マウスに移植し確認した。

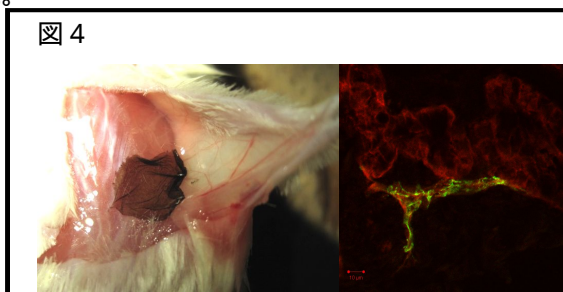
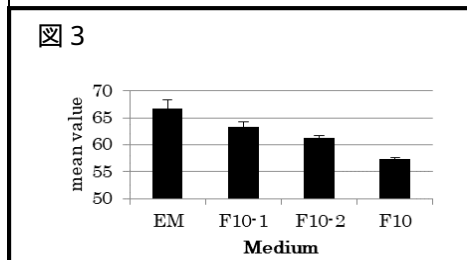
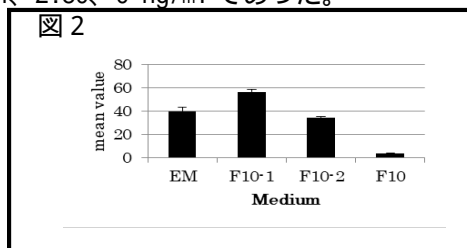
マウスの背中に細胞移植 (茶色)

移植 7 日目の免疫組織化学染色

赤色: ヒト細胞 (HLA-1)

緑色: 血管内皮細胞 (CD31)

マウスの背中では移植した HUVEC の細胞増殖と管腔形成を確認したため、今回の脈絡膜萎縮に対する再生は移植される側の状態で、治療の結果が変わることが分かった。



引用文献

Hayashi K, et al. Am J Ophthalmol. 151, 137-147 (2011)

Kamao H, et al. Stem Cell Reports. 2, 205-218 (2014)

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
--	---------------------------	-----------------------	----