

令和元年6月26日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16996

研究課題名(和文) ヒト幹細胞から誘導された網膜神経節細胞の発生に関する研究

研究課題名(英文) Developmental analysis of retinal ganglion cell derived from human ES/iPS cells

研究代表者

横井 匡 (Tadashi, Yokoi)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・感覚器・形態外科部・医師

研究者番号：80514025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、確固とした軸索を形成し、機能を有する網膜神経節細胞をヒトiPSから誘導した。この網膜神経節細胞は、分化を決定づける転写因子Brn3bを発現した後に軸索を伸ばすことになるが、どのような因子が軸索の発育に関わるかは明らかでなかった。本研究において、網膜神経節細胞の特徴的な軸索が、既知の神経成長または抑制因子に応答し、網膜神経節細胞軸索の特徴を模倣することを示した。軸索成長促進因子であるNGFを加えると軸索は有意に伸長し、軸索成長阻害因子であるSEMA3Aを加えると軸索成長が有意に抑制された。今後さらに網膜神経節細胞の分化・軸索形成のメカニズムについて研究を進める計画である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、我が国における失明原因の1位は緑内障であり、これは、網膜神経節細胞の細胞死によって引き起こされる。また、網膜神経節細胞の細胞死による眼科疾患は、緑内障の他、遺伝性視神経症や視神経炎をはじめとして様々な疾患が存在する。これら治療法の開発には、ヒト由来の網膜神経節細胞を得ることが非常に有用であり、我々の研究室ではヒトiPSから網膜神経節細胞を樹立した。今回、本細胞を用いて、神経分化にかかわる因子についてその作用を検討し、軸索成長についての知見が得られた。今後疾患治療のための軸索再生等に向けた、さらなる研究を遂行する予定である。

研究成果の概要(英文)：We have generated the functioning retinal ganglion cells (RGCs) with axons derived from human iPSCs. Determination of RGC lineage is almost completed after the expression of Brn3b, and RGCs elongate their axons, thereafter. In this in-vitro RGCs generation model, there have been little knowledge regarding the factors associated with their axonal development. In this study, we demonstrated that the axons of human RGCs responded to the known neurotrophic factors, including nerve-attractive and nerve-repulsive factors. The human RGCs significantly elongates their axons by the administration of nerve growth factor, but reduced them by semaphorin3A. We further aim to reveal the molecular signaling associated RGC development, using this in vitro system.

研究分野：眼科

キーワード：ヒトiPS細胞 網膜神経節細胞 Brn3b NGF Semaphorin3A 軸索再生

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

### 1. 研究開始当初の背景

再生医学の研究では、iPS 細胞や ES 細胞などの多能性幹細胞の導入によって、さまざまな細胞や組織を作製する研究が進められている。これまで、脳、下垂体、腎臓、膵島、腸管等の臓器再生の報告がなされてきた。なかでも、多能性幹細胞を用いた神経網膜再生の研究は、まだ不完全ではあるもの、立体構造を有する全層が作製されており、最も進んだ分野の一つといえる。

また、iPS 細胞から誘導された網膜色素上皮細胞については、既に高橋らのグループによってヒトへ移植が行われるまでに至っている。

一方、iPS 細胞や ES 細胞からの網膜全層の作製は、Meyer、笹井ら(1、2)によって、3次元培養による誘導の成功が報告されたももの、視細胞層を含む網膜外層に比し、網膜神経節細胞層を含む網膜内層の再生は不十分であった。さらに、網膜神経節細胞の形成は細胞体に限られ、神経細胞として最も重要な構造である軸索伸長は得られていなかった。

我々は2014年に、ヒト iPS 細胞から機能をもつ長い軸索を有する網膜神経節細胞を自己分化誘導させることに世界で初めて成功した(3)。また、マウス iPS 細胞、ES 細胞、ヒト ES 細胞からも同様に網膜神経節細胞を誘導することに成功している。(論文投稿中)この細胞は1~2cm に及ぶ長い軸索を有し、その軸索は軸索流(fast、slow、順行性、逆行性すべて)、活動電位・電流の機能をもつことが証明された。この網膜神経節細胞誘導系においては、分化誘導初期には網膜前駆細胞マーカーである Rx や Pax6、Chx10 の発現が認められ、次いで網膜の中で最も早く細胞が特異化される網膜神経節細胞のマーカーである Math5 や Brn3b が、前駆細胞マーカーの発現に引き続いて上昇するという、眼の初期発生における分子動態を十分に模倣するモデルであることが確認されている。

ヒト iPS 細胞、ES 細胞から網膜神経節細胞を誘導する過程において発現する転写因子に大きな違いはないが、マウス iPS 細胞、ES 細胞から網膜神経節細胞を誘導する過程においては、初期の Rx の発現がヒトでの発現に比し低く、また、マウスでは水平細胞のマーカーである calbindin の発現がやや早くみられるなど、種間での発現プロファイルの差もとられることができている。網膜神経節細胞を特異化させる決定的な転写因子として、上述の Math5、Brn3b が広く知られている。一方、網膜前駆細胞に発現する Px や Pax6、Chx10 (Vsx2) に引き続き、Math5、さらには Brn3b が発現することは知られているが、Math5、Brn3b の発現調節に関わるシグナルカスケードについては、まだ十分に知られていない。マウスモデルにおいて、Math5 のエンハンサーに Pax6 が結合することでその発現を上昇させることが報告されているもの(4)、Math5 については、その発現調節については未知の部分が多い。Brn3b においては、Math5 に引き続き発現上昇がみられることがはっきりとしているが、その上流にどのような分子が存在するかは明らかでない。また、網膜神経節細胞の分化において、Brn3b と転写因子である Islet1 が協調して発現調節を行うこと(5)、また、Sox4、Sox11 が Math5 と Brn3b の発現カスケードの中間にたつて網膜神経節細胞の分化を促進すること(6)などが報告されているが、いまだ不明な点が多い。

眼の発生においては、下等生物でも4,000以上の遺伝子が働いていると言われる。したがって、網膜神経節細胞については視神経形成の分子メカニズムはほとんどわかっていない状況である。網膜神経節細胞は中枢神経であるのでヒトでは採取できず、過去には動物の *in vivo*、*in vitro* の実験系に頼ってきた。いずれも網膜神経節細胞を単独に検討することは難しく、*in vitro* 系では出生後マウス網膜から単離するなど発生の後期であつて、細胞は軸索をもたず、採取後1週間ほどしか生存できない。これに比べて、我々が iPS 細胞、ES 細胞から作製した網膜神経節細胞は、その分化初期から次期を追って発生を分子生物学的に検討することができ、1カ月以上も生存可能であるので、従来と異なつて網羅的な発生遺伝子の検討が可能である。

網膜神経節細胞はこれまで形態・機能によって20余りのタイプが知られているが、これらのタイプがいかに分化するかについては、ほとんど報告がない。Brn3 ファミリーは Brn3a、Brn3b、Brn3c が含まれ

るが、それぞれ、または、ダブルノックアウトマウスの実験によって、Brn3b 陽性網膜神経節細胞主に長い軸索を有する神経節細胞の分化にかかわるが、メラノプシン陽性の ipRGC の分化は Brn3b 非依存性であり、Islet1 によって調節されていることが報告されている (7)。現状ではこれ以上の知見はなく、我々の *in vitro* での網膜神経節細胞誘導系においてさらに各タイプへの分化メカニズムを明らかにできる可能性がある。網膜神経節細胞は Brn3b を発現し、運命決定された後、軸索伸長を行うが、本経路についても多くは不明である。

(参考文献)

- 1, Eiraku M, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture, *Nature*, 2011
- 2, Meyer JS, et al. Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment, *Stem Cells*, 2011
- 3, Tanaka T, et al. Generation of retinal ganglion cells with functional axons from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*, 2015
- 4, Riesenberger AN, et al. Pax6 regulation of Math5 during mouse retinal neurogenesis. *Genesis*, 2009
- 5, Ling Pan, et al. ISL1 and BRN3B co-regulate the differentiation of murine retinal ganglion cells. *Development*. 2008
- 6, Jiang Y<sup>1</sup>, et al. Transcription factors SOX4 and SOX11 function redundantly to regulate the development of mouse retinal ganglion cells. *J Biol Chem*. 2013
- 7, Shi M, et al. Genetic Interactions between Brn3 Transcription Factors in Retinal Ganglion Cell Type Specification. *PLoS One*. 2013

## 2 . 研究の目的

再生医学では iPS 細胞や ES 細胞などの多能性幹細胞の導入により、*in vitro* においてさまざまな細胞や組織を作製する研究が進められている。視覚器では、2次元培養または、3次元培養を用いて、網膜の色素上皮と視細胞が作製された。しかし、視神経を構成する軸索をもつ網膜神経節細胞の作製はどこも成功していなかった。我々の研究グループは、昨年、世界に先駆けて、ヒト iPS 細胞から長い軸索を有する網膜神経節細胞の誘導に成功した。

視神経が障害される疾患には、視神経炎や遺伝性障害、虚血、外傷などさまざまな疾患があり、重篤な視力障害を起こす。中でも緑内障は我が国の失明原因の第1位(25%)を占め、先進国における失明原因の主たる原因となっている。これらの疾患の原因解明、治療ことに将来の再生医療を考える上で、網膜神経節細胞の発生分化に関するより深い理解が必要である。

*In vitro* における網膜神経節細胞の誘導の成功は、これまでほとんど *in vivo* によって理解されてきた網膜神経節細胞の研究を加速度的に進める可能性を秘めている。本研究は、我々が確立した網膜神経節細胞の誘導技術を用いて、発生期における網膜神経節細胞また、その特徴的な軸索の分化や発現調節に関わる分子メカニズムを解明することを目的とする。これによって、遺伝性疾患を始めとする視神経疾患の病態解明、将来の再生医療などの治療に資することが期待される。

## 3 . 研究の方法

研究期間の中で、より網膜神経節細胞の生理機能を有することを確立させることが優先され、Brn3b を発現したあとに起こる軸索の形成について、軸索伸長・発生に関わる様々なシグナル分子が軸索に及ぼす影響に重きをおいて検討した。

軸索誘導に関わる因子として、nerve growth factor(NGF)、軸索伸長抑制因子として semaphorin3A,

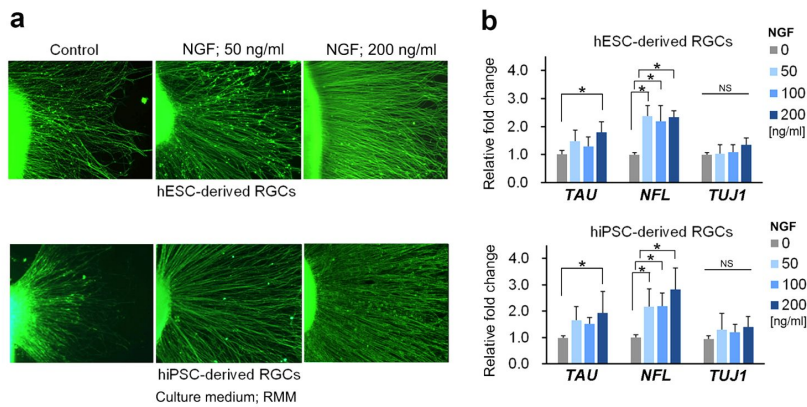
Slit1 を用い、ヒト iPS 細胞由来 RGC の軸索成長にどのように作用するかを検討した。

これら 3 つの神経栄養因子を 3 種類の投与方法を用いて軸索伸長に及ぼす影響を免疫染色、定量 PCR を用いて検討した。投与方法は、培養皿に直接因子を投与するもの、徐放剤（メドジェル）に含ませ、接着したコロニーの手前におき、因子を徐放させるもの、また、アガロースビーズに薬剤をしみこませ、接着したコロニーに局所的に投与する方法を用いた。軸索伸長の可視化は RGC の軸索マーカーの一つである、TUJ1 を用いて染色した。直接培養皿に投与したものについては、RGC のマーカーである、TAU, Neurofilament L, TUJ1 の発現を PCR を用いて定量化した。軸索伸長は TUJ1 で染色した軸索を二値化し、ImageJ を用いて定量化した。

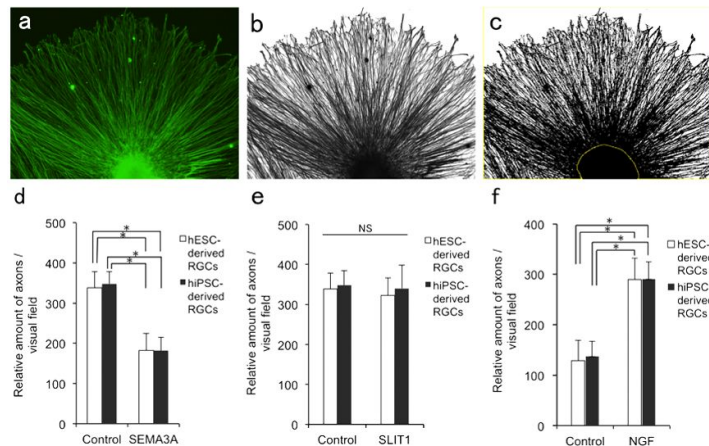
#### 4 . 研究成果

##### 1) 培養皿への薬剤直接投与によるヒト RGC 軸索の伸長

神経成長因子である NGF を投与すると、濃度依存的に軸索伸長が亢進した。これは、軸索の免疫染色、また、RT-PCR で確認された。これは、ヒト iPS 細胞、ES 細胞由来 RGC で同様の傾向であった。（図 1）



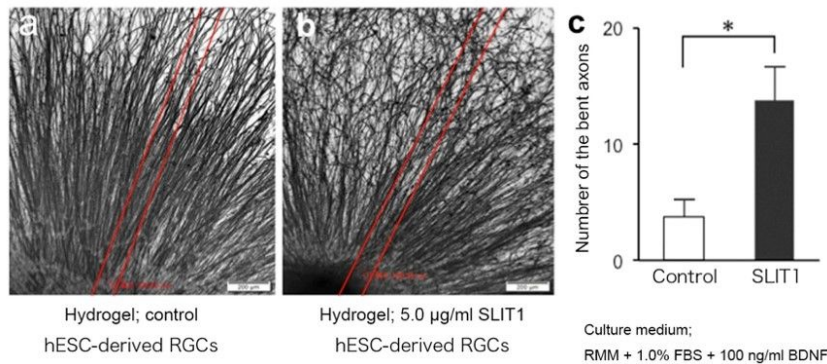
神経成長抑制因子である SEMA3A の投与では、軸索伸長が抑制され、また RT-PCR でも軸索成長抑制が確認された。ヒト iPS 細胞 ES 細胞由来 RGC で同様の結果であった。神経成長抑制因子である Slit1 の投与では、軸索伸長抑制ではなく、軸索伸長方向の乱れが観察された。したがって RT-PCR においては、RGC 軸索関連因子の変動を認めなかった。軸索伸長亢進、抑制については ImageJ を用いて定量化した。（図 2）



##### 2) 徐放剤（メドジェル）を用いた徐放投与

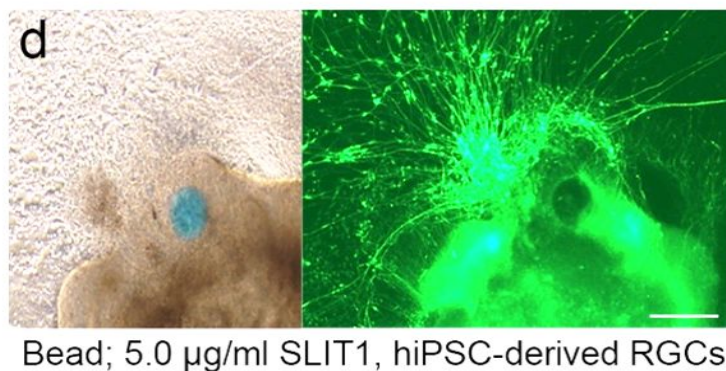
同様の NGF, SEMA3A, Slit1 を徐放剤（メドジェル）に浸透させ、接着させた RGC の前方に留置した。NGF

では徐放剤に向かって軸索が伸長し、SEMA3A では軸索伸長が阻害されると同時に、軸索が徐放剤を避けるように伸長する事がわかった。Slit 1 では軸索伸長阻害を認めなかったが、SEMA3A と同様に徐放剤を避けるように軸索が伸長した。(図3)



### 3) アガロースビーズを用いた局所投与

アガロースビーズに上記因子を浸透させ、ヒト iPS / ES 細胞より誘導した Embryoid body (胚様体) と、眼胞の分岐部に針を用いて留置した。NGF, SEMA3A では軸索伸長に変化がなかったが、Slit1 を投与すると、これを避けるように軸索が伸長した。(図4)



これらの結果から、ヒト iPS/ES 細胞由来 RGC の軸索は、これまで報告された NGF や SEMA3A, Slit1 の神経軸索に対する効果と同様の影響を受けることが確認され、これまで当研究室で確認された、軸索としての機能、構造を有するのみならず、これら代表的因子にも正確に反応するものであることがわかった。したがって、本研究は、今後本ヒト iPS/ES 細胞由来 RGC を用いた軸索再生研究、Brn3b 発現以降の軸索伸長におけるシグナルカスケードに関する研究を進められる素地となる結果である。

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Tanaka S, Yokoi T, Azuma N. Foveal Neovascularization Detected by Optical Coherence Tomography Angiography in Incontinentia Pigmenti. *JAMA Ophthalmol.* 2019 Mar 1;137(3):e184197. Epub 2019 Mar 14.
2. Yoshida T, Katagiri S, Yokoi T, Nishina S, Azuma N. *Am J Ophthalmol Case Rep.* Optical coherence tomography and video recording of a case of bilateral contractile peripapillary staphyloma. 2018 Dec 5;13:66-69. doi: 10.1016/j.ajoc.2018.12.002. eCollection 2019 Mar.
3. Yokoi T, Katagiri S, Hiraoka M, Nakayama Y, Hosono K, Hotta Y, Nishina S, Azuma N. ATYPICAL FORM OF RETINOPATHY OF PREMATURITY WITH SEVERE FIBROVASCULAR

PROLIFERATION IN THE OPTIC DISK REGION. Retina. 2018 Aug;38(8):1605-1612.

4. Hosono K, Nishina S, Yokoi T, Katagiri S, Saito H, Kurata K, Miyamichi D, Hikoya A, Mizobuchi K, Nakano T, Minoshima S, Fukami M, Kondo H, Sato M, Hayashi T, Azuma N, Hotta Y. Molecular diagnosis of 34 Japanese families with Leber congenital amaurosis using targeted next generation sequencing. Sci Rep. 2018 May 29;8(1):8279. doi: 10.1038/s41598-018-26524-z.
5. Wakayama A, Nishina, S, Miki A, Utsumi T, Sugawara J, Hayashi T, Sato M, Kimura A, Fujikado T. Incidence of side effects of topical atropine sulfate and cyclopentolate hydrochloride for cycloplegia in Japanese children:a multicenter study. Jpn J Ophthalmol, 2018 DOI 10.1007/s10384-018-0612-7
6. Takahashi M, Yokoi T, Katagiri S, Yoshida-Uemura T, Nishina, S, Azuma N. Surgical treatments for fibrous tissue extending to the posterior retina in eyes with familial exudative vitreoretinopathy. Jpn J Ophthalmol, 2018 Jan; 62(1): 63-67.
7. Katagiri S, Yokoi T, Yoshida-Uemura T, Nishina S, Azuma N. Characteristics of retinal breaks and surgical outcomes in rhegmatogenous retinal detachment in familial exudative vitreoretinopathy. Ophthalmology Retina, 2017, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oret.2017.11.003>
8. Yokoi T, Tanaka T, Matsuzaka E, Tamalu F, Watanabe SI, Nishina S, Azuma N. Effects of neuroactive agents on axonal growth and pathfinding of retinal ganglion cells generated from human stem cells. Sci Rep. 2017 Dec 1; 7(1): 16757. doi: 10.1038/s41598-017-16727-1.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 横井 匡. 黄斑低形成他. シンポジウム 20 黄斑疾患の診断のための OCT angiography. 第 72 回日本臨床眼科学会, 東京, 2018.10
2. 横井 匡. 緑内障のトランスレーショナルリサーチ. シンポジウム 2 ヒト iPS・ES 細胞由来網膜神経節細胞を用いた軸索再生研究. 第 123 回日本眼科学会, 東京, 2019.4
3. 横井 匡. Novel concepts for development of therapeutics against refractory ocular diseases. International symposium 4. In vitro ischemia reperfusion model of human iPS-derived retinal ganglion cell. 第 123 回日本眼科学会, 東京, 2019.4

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

分担者なし

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。