

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19592049
 研究課題名 (和文) 網膜移植再生のためのES細胞由来幼若視細胞及び宿主網膜の移植条件の詳細な検討
 研究課題名 (英文) Detailed studies on the conditions of ES derived photoreceptor precursors and the host retinal environment for the successful transplantation
 研究代表者
 万代 道子 (MANDAI MICHIKO)
 独立行政法人理化学研究所・網膜再生医療研究チーム・研究員
 研究者番号：80263086

研究成果の概要：

マウスを用いて網膜細胞移植実験を行い、細胞生着のための知見を得た。グリオーシスやマクロファージの集積を促進するような炎症環境は移植細胞の生着に好ましくない事が示唆された。移植細胞と宿主との免疫適合性も大切と思われ、ES細胞からの分化も種を考慮する必要性が示唆された。変性網膜への移植については、いずれの変性段階においても移植細胞の生着はみられ、異所性であってもシナプスを形成する可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼科学・レクチン・Nr1・移植環境

1. 研究開始当初の背景

我々のところでES細胞からの視細胞分化方法を確立し、移植成果を検討する段階となった。野生株マウスにおいては生後3日令から7日令位の発育段階の視細胞であれば、成体網膜内にきれいに生着することが報告され (MacLaren RE et al. NATURE 444: 203-207, 2006)、変性網膜において機能回復のための視細胞の移植条件を検討するため

に、そのためのよりよい宿主環境の整備と、移植細胞の効率よい準備と純化が必要な段階となった

2. 研究の目的

野生株マウス成体網膜への視細胞生着の報告をうけて、我々のところでもまず野生株生体網膜への移植手技方法を確立した。そこで本研究においては、急性、慢性2つ

の変性モデルを用いてその進行過程の時期を変えて視細胞が生着するかどうかを観察した。また、変性進行期におけるグリオーシスによる宿主側網膜のバリア形成反応を考慮し、異なる移植時期におけるコンドロイチナーゼの効果についても検討した。

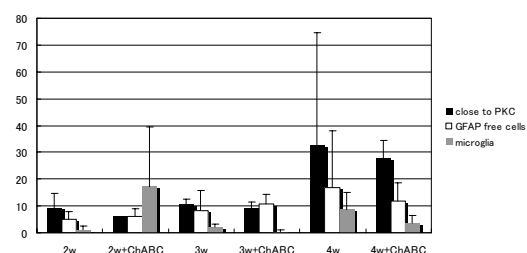
3. 研究の方法

移植時の宿主環境については、6 - 8 週令の BL/6 マウスに 50mg/kg の MNU を腹腔投与し、急性変性モデルを作成、その 1 日後、5 日後、7 日後に移植を行った。C3H/HeJ(rd)マウスでは 3 週令、4 週令、5 週令で移植を行った。MNU 5 日後、7 日後及び rd マウスの移植では、コンドロイチナーゼ (0.05U/ μ l) を添加したものと比較した。移植細胞には生後 3 日から 7 日令の GFP または Nrl-GFP マウス網膜を用いた。移植網膜は 2 週間後に固定し、GFP(移植細胞)、GFAP, Iba1 (microglia) PKC(rod bipolar) の免疫染色を行い、移植細胞の生着数、移植細胞と microglia, glia 細胞、2 次ニューロンとの関係性を評価した。

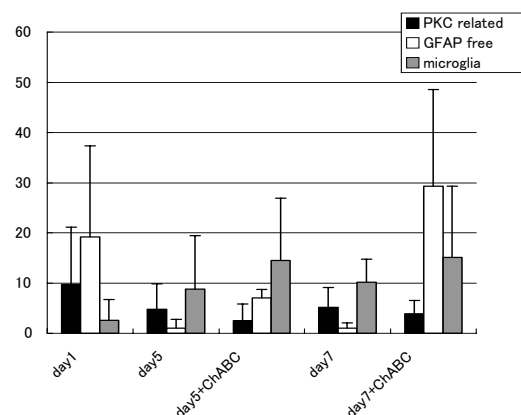
4. 研究成果

まず、6 - 8 週令の BL/6 マウスにおける視細胞移植のプロトコルを確立した。この段階で、異系間での宿主-移植細胞は生着がよくないことを観察し、ES 細胞からの細胞準備においても免疫的な適合性を考慮することが示唆された。ES 細胞からの分化細胞の準備についてはその点も含めて引き続き今後の研究中に検討していく。また、移植後の機能評価の一手段として、網膜組織培養を行い、網膜電位を測定する方法を確立した。移植環境の実験において、rd マウスにおいてはマイクログリア集積数、GFAP 発現と

も 2-4 週令では 2 週令が最大で、あとは徐々に低下した。2-4 週令においていずれの時期にも視細胞の生着がみられ、移植細胞による特異的なマイクログリアの活性化や GFAP 強陽性像はみられなかった。2 週令でのコンドロイチナーゼ添加はマイクログリアの集積を増強した。多くの移植細胞は残存した外層のさらに外側に位置したが、PKC 陽性細胞の突起伸展によりシナプス形成は可能な位置にあるものも多く見られた。



MNU モデルにおいては 3-5 日令にマイクログリア集積と GFAP が増強するが、早期の MNU 投与後 1 日目は比較的的生着がよかった。このモデルではグリオーシスの影響がみられ、5 日目、7 日目の移植においてはコンドロイチナーゼを添加しなければグリアのバリアを超えての生着は極めて少なかった。しかし、コンドロイチナーゼ添加は同時にマイクログリアの集積も増強する傾向がみられた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Suzuki T, Akimoto M, Imai H, Ueda Y, Mandai M, Yoshimura N, Swaroop A, Takahashi M.
Chondroitinase ABC Treatment Enhances Synaptogenesis Between Transplanted and Host Neurons in Model of Retinal Degeneration. Cell Transplantation. 16:493-503, 2007 査読有
- ② Oishi A, Nagai T, Mandai M, Takahashi M, Yoshimura N.
The effect of dendritic cells on the retinal cell transplantation.
Biochemical and Biophysical Research Communications. 363:292-296, 2007 査読有
- ③ Osakada F, Ikeda H, Mandai M, Wataya T, Watanabe K, Yoshimura N, Akaike A, Sasai Y, Takahashi M.
Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. Nature Biotechnology. 26:215-224, 2008 査読有
- ④ Homma K, Osakada F, Hirami Y, Jin ZB, Mandai M, Takahashi M.
Detection of localized retinal malfunction in retinal degeneration model using a multi-electrode array system. J Neurosci Res. 2552:2175-2182, 2008 査読有
- ⑤ 高橋政代: 細胞移植による網膜の再生。メディカルバイオ 4: 24-29, 2007 査読有
- ⑥ 高橋政代: 網膜細胞を増やす! あたらしい眼科 24: 1327-1329, 2007 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 万代道子、ヒトおよびサルES細胞からの網膜色素上皮および視細胞分化誘導、第111回日本眼科学会総会、07. 4. 19-22、大阪
- ② 万代道子、網膜の再生医療をめざして、第7回日本再生医療学会総会、08. 3. 14、名古屋
- ③ 万代道子、網膜再生治療開発の戦略 眼科幹細胞研究の現状、第112回日本眼科学会総会、08. 4. 17-20、パシフィコ横浜
- ④ 本間耕平・万代道子、多点電極測定系によるMNU網膜変性モデルを用いた網膜神経機能測定法の評価、第31回日本神経科学大会、08. 7. 9-11、東京国際フォーラム
- ⑤ 万代道子、移植ホスト網膜の環境の検討—成体網膜と新生児網膜、第62回日本臨床眼科学会、08. 10. 23-26、東京国際フォーラム
- ⑥ 本間耕平・万代道子、多点電極測定系による網膜変性モデルにおける視細胞機能の複数点同時計測、第46回日本生物物理学会年会、08. 12. 3-5、福岡国際会議場
- ⑦ 万代道子、マウス変性網膜への視細胞移植、厚生労働省難治性疾患克服研究事業 網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班 平成20年度班会議、09. 01. 16-17、名古屋市立大学 病棟・中央診療棟 3F 大ホール
- ⑧ 万代道子、マウス網膜への視細胞移植の条件検討、第8回日本再生医療学会総会、09. 03. 05-06、東京国際フォーラム

[図書] (計 5 件)

- ① 高橋政代・万代道子、日本組織工学会監修 日本医学館、網膜の再生医療 第3章

臨床応用への道 ティッシュエンジニアリング 2007、2007、6 頁

- ② 万代道子・高橋政代、羊土社、実験医学 26、網膜疾患の再生医療 第 2 章幹細胞の臨床応用、2008、7 頁
- ③ 高橋政代、日本臨牀 66、網膜の再生 幹細胞の実用化を目指して-レビューを含めて-特集：再生医学と医療、2008、5 頁
- ④ 高橋政代、メディカルドゥ、遺伝子医学 MOOK、第 1 章治療を目的とした細胞移植 網膜細胞移植の可能性と限界、2008、4 頁
- ⑤ 高橋政代、数研出版、理科通信サイエンスネット第 33 号、iPS細胞登場 再生医療へ正しい理解を、2008、4 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

万代 道子 (MANDAI MICHIKO)
独立行政法人理化学研究所・網膜再生医療研究チーム・研究員
研究者番号：80263086

(2) 連携研究者

高橋 政代 (TAKAHASHI MASAYO)
独立行政法人理化学研究所・網膜再生医療研究チーム・チームリーダー
研究者番号：80252443