

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03810

研究課題名(和文) ヒトiPS由来の網膜神経節細胞およびMuller細胞を用いた網膜・視神経の再生

研究課題名(英文) Regeneration of the retina and optic nerve by use of retinal ganglion cells generated from human iPS cells

研究代表者

東 範行 (Azuma, Noriyuki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・非常勤講師

研究者番号：10159395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞由来の網膜神経節細胞について、再生医療への可能性を検討した。ヒトiPS細胞から網膜神経節細胞を作製し、immopanningによって純化した。軸索の伸長について神経成長因子の効果を判定するシステムを確立した。グリア細胞の神経分化に関する検討を行い、ミュラー細胞が重要な役割を果たしていることを明らかにした。軸索伸長における経路探索(nerve pathfinding)を評価する方法を確立した。免疫不全マウスの眼球内にヒトiPS細胞由来網膜神経節細胞を移植し、網膜内に生着し、分化が進むとともに、視神経内への軸索伸長を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視神経はひとたび障害されると回復せず、重篤な視力障害を来すが、有効な治療法はない。神経保護薬と視神経移植は将来の治療として有望である。我々は初めてヒトiPS細胞から網膜神経節細胞(視神経細胞)の作製に成功し、本研究を行った。視神経の研究をin vitroで行えるようになった意義は大きい。神経保護因子候補化合物の評価、軸索伸長に関する神経成長因子と経路探索物質の評価を行えることは、創薬や再生医療の研究に大きく役立つ。グリア細胞由来の栄養因子も重要である。さらにマウスで視神経移植の可能性を示した。本研究は、視神経障害に対する創薬と再生医療に大きく役立つ。

研究成果の概要(英文)：We investigate reproducing of the optic nerve by retinal ganglion cells generated from human iPS cells (hiPSC-RGC), which were purified by immopanning. We established a system to evaluate effect of neurotrophic factors by morphology of axon elongation and growth cone. We cocultured hiPSC-RGC and glial cells, in which Muller cells mostly affect axonal elongation. We also established a system to evaluate effect of factors that relate to nerve pathfinding by morphology of axon elongation and growth cone. When hiPSC-RGCs were injected into the vitreous cavity of immunodeficient mice, the cells engrafted and differentiated, axons of which elongated and invaded into the optic nerve.

研究分野：眼科学、分子生物学

キーワード：ヒトiPS細胞 網膜神経節細胞 グリア細胞 ミュラー細胞 神経経路探索 視神経移植

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

視神経は、網膜内の細胞体(神経節細胞)から伸びる軸索で構成され、遺伝性障害、虚血、外傷、脱髄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40歳以上の日本人の5%が罹患し、我が国の失明原因の第1位(25%)である。これらの治療は、神経保護薬の検討が行われているが、遺伝子治療、再生医療の研究はほとんど行われていない。人工視覚は、視中枢にチップ埋め込む脳刺激型になり、臨床応用に程遠い。

網膜神経節細胞の研究を行う場合、中枢神経であるのでヒトでの採取は不可能であり、動物の網膜から神経節細胞を単離培養すれば、短い軸索様の神経突起を有するだけで寿命も短く、基礎・臨床研究にまったく不十分である。iPS細胞やES細胞を用いた再生医療研究が求められるが、網膜細胞の再生では色素上皮細胞と視細胞の研究が進み加齢性黄斑変性症での移植の臨床応用が最近行われた。一方で、網膜神経節細胞の作製は困難で、3次元培養によって網膜全体を自己作製しても、視細胞を中心とする外層は分化するが、内層ことに神経節細胞は未分化にとどまっている。機能がある軸索をもつ有効な神経節細胞の作製にはどこも成功していない。

これに対して、我々はヒトおよびマウスのiPS細胞、ES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成功した(国内国際特許申請済み、Sci Rep 2015; 5:8344, Invest Ophthalmol Vis Sci 2016; 57:3348-3359)。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、活動電位・電流の機能をもっている。その作製効率は90%以上で50日以上生存でき、さらにimmunopanningによって純化することにも成功した。これによって、疾患の解明、創薬、視神経移植などの再生医療のin vitro、in vivoの研究を行える道が開けた。

### 2. 研究の目的

ヒトiPS細胞由来網膜神経節細胞を用いて、創薬研究、再生医療研究を行う。網膜神経節細胞の軸索伸長や経路探索の評価システムを確立する。生体内での軸索伸長には、Muller細胞等のグリア細胞が関与していると思われ、共培養による変化を観察するとともに、ケミカルメディエーターの検索を行う。可能であれば、マウス等の小動物に移植実験を行う。

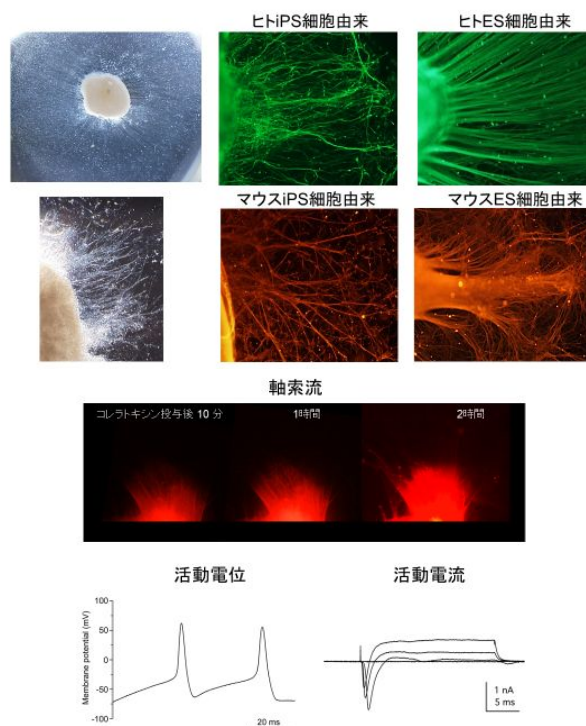
### 3. 研究の方法

#### 1. iPS細胞・ES細胞由来の網膜神経節細胞の調整

ドナーとなる網膜神経節細胞はヒト或いはマウス由来のiPS細胞或いはES細胞から作製される。機械的に単離ではなく、immunopanningによって純化する、

#### 2. 神経栄養因子の検討

神経細胞の分化や軸索の伸長を亢進するさまざまな栄養因子が知られている。これらの候補のうち、網膜神経節細胞に有効なものをin vitroで検討する。細胞の分化度と軸索伸長や成長先端の形



態の定量的評価法を確立する。網膜神経節細胞の分化や軸索伸長に特に有効な化合物を見出す。

### 3. Muller 細胞等グリア細胞との共培養による分化と軸索伸長の形態学的・分子生物学的検討

網膜神経節細胞と Muller 細胞でみられた軸索の変化を病理組織科学的に検討する。軸索の構造変化を neurofilament や Tuj1 等の免疫染色や電子顕微鏡的観察によって観察する。軸索の成長先端変化を growth associated protein 43 や phalloidin-actin の免疫染色で検討する。さらに間接着因子についても免疫染色や電子顕微鏡で観察する。分子生物学的には RTPCR やマイクロアレイによる遺伝子の発現の変化を検討する。

### 4. Muller 細胞の細胞外因子の検討

培養液のプロテオーム解析を行う。共培養と網膜神経節細胞の単独培養でサブトラクションを行い、細胞外の液性因子をリストアップする。網膜神経節細胞の分化度に応じて因子を絞り込む。候補因子を in vitro で網膜神経節細胞に加え、同様の細胞分化や軸索伸長の変化が起こるかを形態学的、分子生物学的に検討する。

### 5. 軸索の経路探索 (pathfinding)

軸索は網膜内で視神経入口部に向かい、視神経を経て、視交叉では同側性と交叉性線維に分かれ、外側膝状体や上丘に至る。この経路探索 (pathfinding) には、適宜な場所で、さまざまな忌避物質や誘導物質が道標となっており、これらの物質の効果をまず in vitro で検討する。最近の研究では、発生期に限らず成獣でもこれらの物質が存在することが示唆され、ビーズでの除放など、中枢内で道標となる物質を用いて軸索を誘導する方法を開発する。

### 6. 移植実験

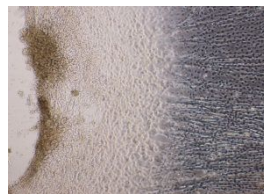
さまざまな視神経障害疾患のモデルマウスを作成する (外傷性、遺伝性など)。毛様体から硝子体内への注射等によって網膜神経細胞の移植を行う。既にヒト細胞を免疫不全マウスに移植する。計画2~4で同定された軸索伸長を促す、あるいは経路探索の物質を同時に投与して、軸索伸長を病理組織学的に検討する。

## 4. 研究成果

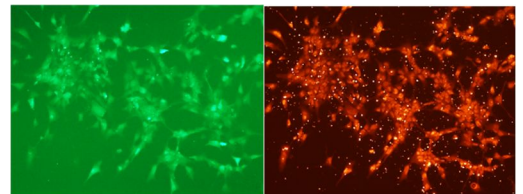
### 1. iPS 細胞・ES 細胞由来の網膜神経節細胞の調整

Immunopanning によって網膜神経節細胞を純化した。可視化のため細胞内に GFP が導入した。ヒト細胞を用いることを主体とし、純化を進め、レシピエント内で軸索を伸ばす至適な発生段階の細胞を準備した。

コロニーから機械的に単離した神経節細胞塊



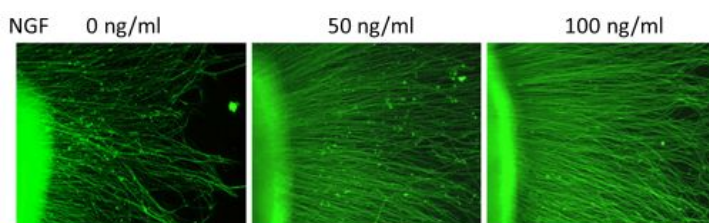
Immunopanning で純化された神経節細胞 GFP 導入 Math5



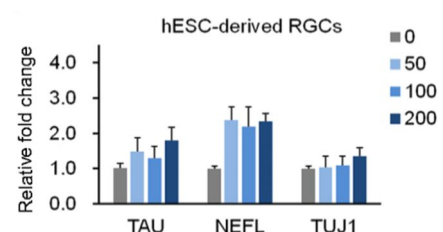
### 2. 神経栄養因子の検討

神経栄養因子の効果を、細胞の分化度と軸索伸長や成長先端の形態を定量化して検討する方法を確立した。軸索の伸長と本数、成長先端の形態変化を定量的に解析した。これによって、栄養因子の効果を判定できる。

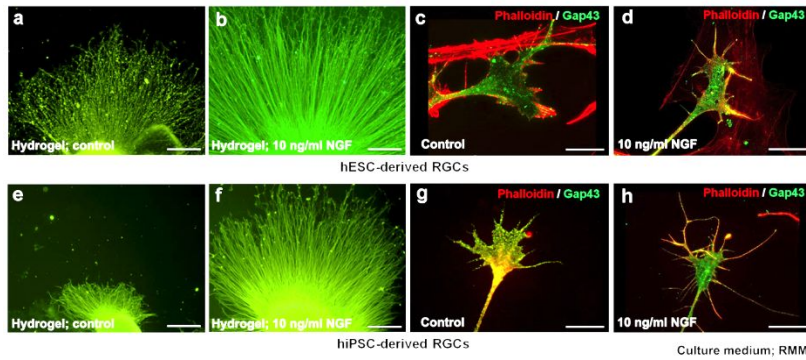
#### 軸索伸長に対する神経栄養因子の効果



#### 薬物の軸索分化・伸長に対する影響の定量化



## NGFの軸索伸長に対する効果



### 3. Muller細胞と共培養による分化と軸索伸長の形態学的・分子生物学的検討

網膜神経節細胞と Muller 細胞を共培養すると、軸索の顕著な伸長がみられた。軸索の構造に変化はなかったが、軸索の成長先端のフィロポディアの拡大がみられた。

### 4. Muller細胞の細胞外因子の検討

培養液のプロテオーム解析を行った。細胞外の液性因子をリストアップし、分泌因子、細胞間接着因子など約 50 候補を絞り込んだ。

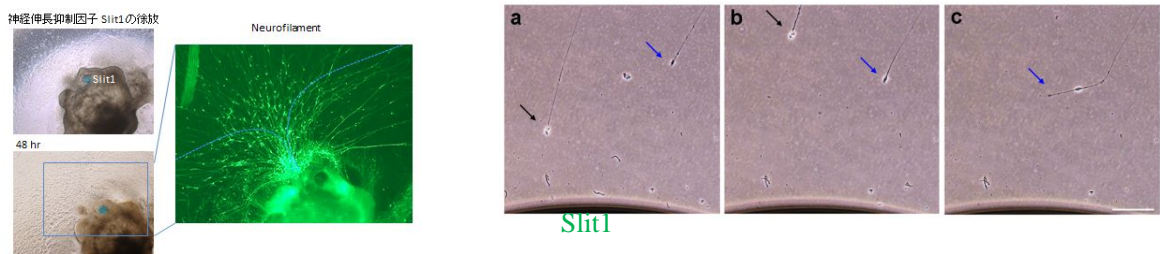
### 5. 軸索の経路探索 (pathfinding)

経路探索 (pathfinding) 物質の効果をまず in vitro で評価する方法を確立した。ビーズでの除放によって、軸索の伸長方向を定量的に評価し、個々の軸索は動画で評価した。これによって中枢内で道標となる物質を用いて軸索を誘導する物質の評価を行った。

### 忌避物質 Slit1 徐放による軸索伸長方向の誘導

コロニー内ビーズ

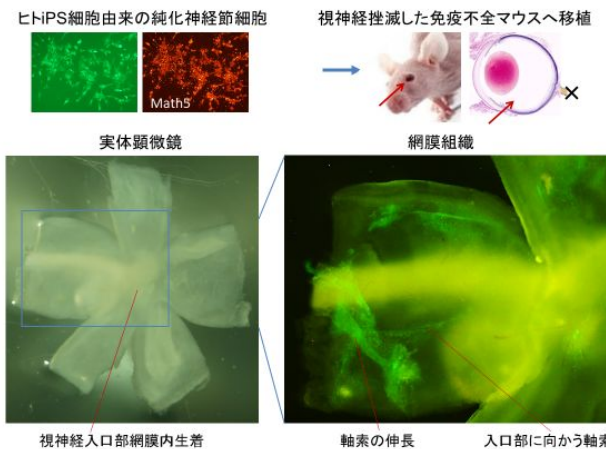
動画 (黒の軸索は伸長停止 青は避けて屈曲)



### 6. 移植実験

視神経障害マウスにおける網膜神経細胞の移植を行った。免疫不全マウスの視神経を挫滅して視神経障害モデルとし、毛様体から硝子体内へヒト iPS 細胞由来網膜神経節細胞を注した。細胞は網膜に生着し、分化を進め、軸索は視神経乳後部に向かって伸長し、視神経内に侵入した。中枢までの到達は得られなかった。神経成長因子の投与によって、軸索の伸長はさらに良好となった。

### ヒト細胞の免疫不全マウスへの視神経移植



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Haque NM, Ohtsubo M, Nishina S, Nakao S, Yoshida K, Hosono K, Kurata K, Ohishi K, Fukami M, Sato M, Hotta Y, Azuma N, Minoshima S.	4. 巻 2
2. 論文標題 Analysis of IKBKG/NEMO gene in five Japanese cases of incontinentia pigmenti with retinopathy: Fine genomic assay of a rare male case with mosaicism.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 205-214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-00836-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka S, Yokoi T, Katagiri S, Yoshida T, Nishina S, Azuma N.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Structure of the retinal margin and presumed mechanism of retinal detachments in choroidal coloboma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ophthalmology Retina	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oret.2020.10.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakao S, Nishina S, Tanaka S, Yoshida T, Yokoi T, Azuma N.	4. 巻 64(6)
2. 論文標題 Early laser photocoagulation for extensive retinal avascularity in infants with incontinentia pigmenti.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 613-620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-020-00768-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 三井田千春、仁科幸子、石井杏奈、松岡真未、松井孝子、吉田朋世、横井匡、岡前むつみ、大橋智、上條有康、山田和歌奈、相賀直、東範行.	4. 巻 13(10)
2. 論文標題 医療機関と教育機関の連携による小児のロービジョンケア.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 眼臨紀	6. 最初と最後の頁 655-661
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 八木-小川瞳、仁科幸子、横井匡、永井章、阪下和美、中村早希、東範行 .	4. 巻 13(6)
2. 論文標題 ビタミンA欠乏による眼球乾燥症をきたしたダウン症児の一例.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 眼臨紀	6. 最初と最後の頁 419-423
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 飯森宏仁、佐藤美保、鈴木寛子、彦谷明子、堀田喜裕、吉田朋世、仁科幸子、東範行	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 (亜)急性後天共同性内斜視に関する全国調査 デジタルデバイスとの関連について .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 眼臨紀	6. 最初と最後の頁 42-47
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 吉田朋世、仁科幸子、三井田千春、赤池祥子、横井匡、東範行	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Information and communication technology機器と斜視に関するアンケート調査.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 眼臨紀	6. 最初と最後の頁 34-41
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中尾志郎、仁科幸子、八木瞳、田中慎、吉田朋世、横井匡、東範行	4. 巻 13(2)
2. 論文標題 外直筋鼻側移動術を施行した動眼神経麻痺の一例.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 眼臨紀	6. 最初と最後の頁 105-110
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurata K, Hosono K, Hayashi T, Mizobuchi K, Katagiri S, Miyamichi D, Nishina S, Sato M, Azuma N, Nakano T, Hotta Y	4. 巻 20(6)
2. 論文標題 X-linked Retinitis Pigmentosa in Japan: Clinical and Genetic Findings in Male Patients and Female Carriers.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 1518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20061518.	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 Tanaka S, Yokoi T, Azuma N.	4. 巻 137(3)
2. 論文標題 Foveal neovascularization detected by optical coherence tomography angiography in incontinentia pigmenti.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JAMA Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 e184197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jamaophthalmol.2018.4197	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 Tanaka S, Yokoi T, Katagiri S, Yoshida T, Nishina S, Azuma N. Severe recurrent fobrovascular prolifertion after combined intravitreal bevacizmaz injection and laser photocoagulation for aggressiove posterior retinopathy of prematurity.	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Severe recurrent fobrovascular prolifertion after combined intravitreal bevacizmaz injection and laser photocoagulation for aggressiove posterior retinopathy of prematurity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Retin Cases Brief Rep.	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ICB.0000000000000887	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 Hirayama J, Alifu Y, Hamabe R, Yamaguchi S, Tomita J, Maruyama Y, Asaoka Y, Nakahama K, Tamaru T, Takamatsu K, Takamatsu N, Hattori A, Nishina S, Azuma N, Kawahara A, Kume K, Nishina H.	4. 巻 9:196
2. 論文標題 The clock components Period2, Cryptochrome1a, and Cryptochrome2a function in establishing light-dependent behavioral rhythms and/or total activity levels in zebrafish.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37879-8	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 0件）

1. 発表者名 仁科幸子、細野克博、横井匡、吉田朋世、深見真紀、木村肇二郎、森隆史、堀田喜裕、東範行
2. 発表標題 PRPS1遺伝子変異を同定した左右差のあるLeber先天黒内障女児の1例.
3. 学会等名 第59回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松岡真未、仁科幸子、三井田千春、松井孝子、赤池祥子、越後貫滋子、吉田朋世、横井匡、東範行
2. 発表標題 低年齢児におけるSpot Vision Screenerの屈折異常判定基準値の検討
3. 学会等名 第76回日本弱視斜視学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仁科幸子、細野克博、横井匡、吉田朋世、富田香、深見真紀、小崎健次郎、堀田喜裕、東範行.
2. 発表標題 網膜ジストロフィーを発症したCDK9変異による多発奇形症候群の1例
3. 学会等名 第45回日本小児眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太刀川貴子、清田真理子、齋藤雄太、東範行、仁科幸子、丸子一郎、根岸貴志、野田英一郎、松本直、外山琢.
2. 発表標題 未熟児網膜症診療録データベース化に向けた標準化の試み
3. 学会等名 第45回日本小児眼科学会総会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 東 範行.
2. 発表標題 シンポジウム:眼に関する幹細胞研究と治療への応用. ヒトiPS細胞由来の網膜神経節細胞の病態解明と治療の研究...
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東 範行
2. 発表標題 細胞分裂の制御
3. 学会等名 Japan Macula Club
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東 範行
2. 発表標題 眼疾患から見いだされた細胞分裂の制御
3. 学会等名 AMED老化PJ主催ワークショップ「ライフコースと個体および臓器スケーリング」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東 範行
2. 発表標題 Ranibizumab for the treatment of ROP global, multi-center, P3 study results.
3. 学会等名 第58回日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井 匡
2. 発表標題 In-vitro hypoxia re-perfusion model of human iPS-derived retinal ganglion cell.
3. 学会等名 第123回日本眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井 匡
2. 発表標題 網膜変性疾患への治療最前線 患者由来iPS細胞による疾患細胞モデルの作製と解析
3. 学会等名 第73回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾志郎, 吉田朋世, 横井匡, 仁科幸子, 東 範行.
2. 発表標題 Bloch-Sulzberger症候群の4例
3. 学会等名 第75回日本弱視斜視学会総会・第44回日本小児眼科学会総会 合同学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井匡, 片桐聡, 田中慎, 八木瞳, 吉田朋世, 仁科幸子, 東 範行.
2. 発表標題 Sept-source OCTによる視神経内ピットの組織の検討.
3. 学会等名 第58回日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田朋世, 横井匡, 仁科幸子, 東 範行.
2. 発表標題 黄斑低形成における黄斑部血管形成解析.
3. 学会等名 第58回日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2019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 分担者	高田 修治  (Takada Shuji)  (20382856)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・部長   (82612)	
研究 分担者	横井 匡  (Yokoi Tadashi)  (80514025)	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   (82612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------