

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09942

研究課題名(和文) ES/iPS由来網膜組織を用いた実用的な視機能再建のための次世代治療の開発

研究課題名(英文) Development of advanced regenerative therapy for restoration of substantial visual function using ES/iPS cell derived retinal tissue

研究代表者

万代 道子(Mandai, Michiko)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・副プロジェクトリーダー

研究者番号：80263086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はES/iPS細胞由来の網膜組織を視細胞変性疾患に移植することによる視機能の再建を目指している。本課題では、動物モデルを用いてより実質的な視機能に必要なホスト-グラフト間のシナプス形成を促進する手がかりを得るために、まずはホスト-グラフト間シナプスの密度分布の評価系を作成し、シナプス密度分布を評価した。さらに移植後ホスト網膜の神経節細胞の光応答を対応させて解析することにより、移植により得られた神経節細胞の光刺激受容領域が推定できる可能性が示唆された。また、蛍光組織像と電顕を重ね合わせる技術を用いて移植後のシナプス観察を試み、ホスト-グラフト間シナプスの質的特徴を考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、ES/iPS細胞由来網膜組織を末期網膜変性モデル動物に移植することにより、移植組織が移植後に成熟しホストの網膜とシナプスを形成、ホスト網膜が光に反応するようになること、そして移植後動物が光を認識するようになることを検証してきた。今後、より発展的な治療として、形が分かるなどより実質的な視機能を再建するためには、現在の移植でどの様な質のシナプスがどの様に形成されているかを理解し、さらにそれを改善する方法を追求する必要がある。本研究は、移植後のシナプスを量的質的に評価することに成功し、その考察からシナプス形成を促進させる手がかりを得るとともに、今後の研究を進める上で重要となる評価手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：We aim to develop a therapeutic strategy to restore visual function in retinal degeneration using ES/iPS cell derived retina. In order to enhance functional integration of ES/iPSC-retinas, we first established a protocol to draw a density map of host-graft synapses in the graft area after transplantation in the end-stage retinal degeneration mice. We then analyzed how the host-graft synapse distribution is correlated with light responsiveness of host retinal ganglion cells (RGCs), which seemed to provide a possible information as to receptive field of host RGC after transplantation. We also studied qualitative nature of host-graft synapses utilizing correlative light and electron microscopy.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜再生 網膜変性 多能性幹細胞 細胞移植治療 網膜オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、視細胞の失われた網膜変性疾患に対し、視細胞を主とする iPS/ES 細胞から分化誘導した網膜組織を移植することによる視機能再建を目指して研究を行なっている。これまでに、ES/iPS 細胞由来網膜組織が移植先でさらに成熟し、1) 視細胞が層構造を形成しつつ形態的にも成熟し、光に反応するようになること、さらに 2) これらの移植細胞がホストの双極細胞とシナプスを形成すること、3) ホスト網膜の、脳への最終伝達細胞である神経節細胞において、移植部位で光応答の発火が見られるようになること、4) マウスモデルにおいて、移植後に光を認識するような行動をとるようになること、を報告してきた。(Mandai et al 2017, Stem Cell Rep). これらを元に、すでに網膜色素変性に対し人への臨床研究も開始されているが、現在の課題として、移植部位においてホスト-グラフト間のシナプス形成がまだ不均一であり、視機能再建が得られる部位と得られない部位がまだら状に存在している点が挙げられる。より実質的な視機能を回復するためには、より移植部位全体での均一なホスト-グラフトのシナプス形成が必要である。

2. 研究の目的

現在の移植において、どのような生着状態で、どのようにホスト-グラフトのシナプスが形成されているのかを定量的定性的に評価できるようなシステムを立ち上げ、まずは現時点でのシナプスの形成の状態と移植後の視機能との相関について評価し理解を深める。また移植後形成されるシナプスの質についても検討する。さらに、移植後の機能再建において改善できる可能性のあるポイントを検証するとともに、新たな課題についても考察、検討する。

3. 研究の方法

まずは、ホスト-グラフトのシナプス形成を定量的に評価するシステムを構築し、移植部位におけるホストグラフトシナプスの density map を描けるようにした。さらに、実際に多電極アレイを用いて移植部位での複数電極上でのホスト神経節細胞の活動を記録し、発火細胞とシナプス形成との間にどのような相関が見られるかを検討した。また、ホスト-グラフトのシナプスの質

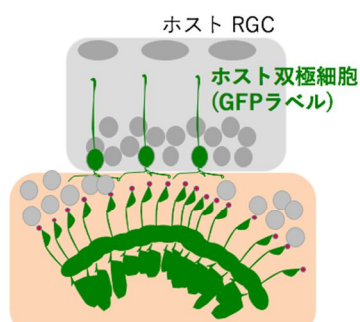
の評価として電顕的観察も試みた。また、実際にシナプス定量を用いて、前年度までに報告してきた双極細胞欠損型網膜細胞や宿主側の環境因子としてグリオーシスの除去を期待できるコンドロイチナーゼ ABC (ChABC) の効果について検討、加えて他にホストグラフトの視機能ネットワーク再建に関わる因子を検討した。

4. 研究成果

まず移植範囲においてホスト-グラフトシナプスの密度分布を評価できるようにした。ホストの双極細胞が GFP 蛍光を発するレポーターマウスと、グラフトのシナプスマーカーが tdTomato ラベルされたレポーターラインを用い(マウス ES 細胞) 分化した網膜を移植し、さらに後シナプスマーカーの mGluR6 または cacna1s を染色することにより、ホストとグラフトのシナプスを同定した。(図 1) 前年度までに開発した、グラフト内の双極細胞を遺伝子改変により除去した網膜組織を用いると、移植細胞とシナプスを形成するホストの双極細胞の率は変わらないのに対し、ホスト双極細胞あたりにシナプス形成する視細胞 (rod) の数 (シナプス数) が増加する、という結果が得られ、このことはホスト側の方にグラフトとのシナプス形成を阻害する要素がまだ何かあることを示唆していると考えられた。そこで移植時に ChABC の同時投与を行なったが、明らかなシナプス形成の変化は見られなかった。

Host-graft synapse formation

Genetic labeling + IHC



グラフト視細胞の前シナプスマーカー
(tdTomato-ribeye)

Mandai et al *Stem Cell Reports*, 2017
Matsuyama et al in submission

Ribeye::cacna1s or mGluR6

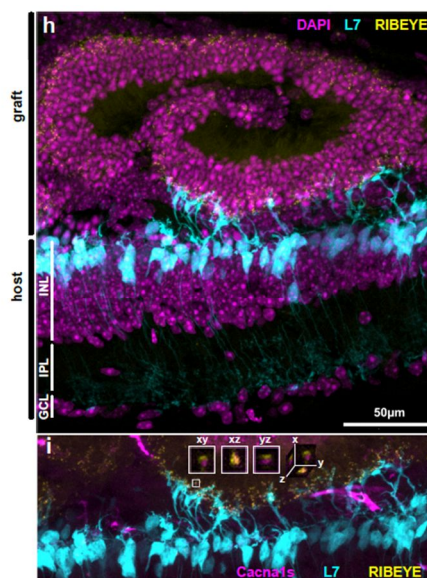


図 1 双極細胞が GFP ラベルされたホストマウス(視細胞変性モデル)に前シナプスマーカーに tdTomato をラベルしたレポーター株から分化させた網膜組織を移植、さらに後シナプスマーカーを染色することでホスト/グラフトシナプスを同定した。

次に、イマリスの画像解析ソフトを用いることにより、3次元的にシナプスを自動同定し、手動補正することにより、移植部位上でのホスト-グラフトシナプスの分布を density map として表示することができるようになった（図2）。

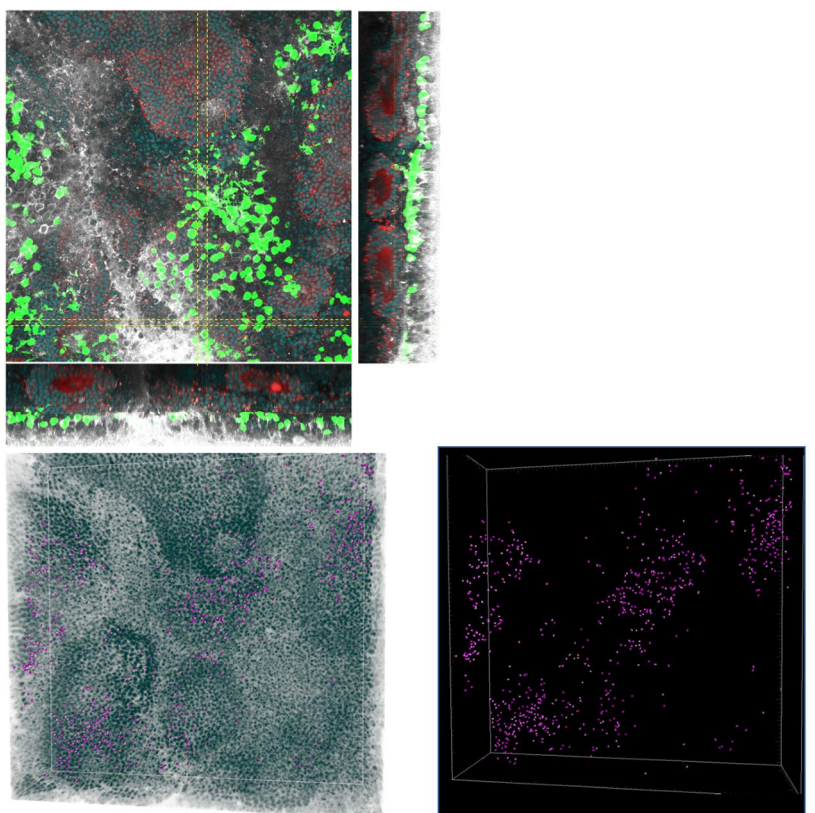


図2 イマリス画像解析ソフトを用いてホスト/グラフトシナプスを自動同定し、移植部位でのホスト/グラフトのシナプス分布を表示できるようになった。

さらにシナプス密度分布と多電極アレイを用いた移植後ホスト網膜の神経節細胞の光応答を照合すると、神経節細胞の反応がその周辺の一定距離内にあるシナプスの数と相関する傾向がみられ、これは移植後の神経節細胞の光刺激受容領域を反映しているとも示唆された。また、この相関関係は、野生株よりも双極細胞を欠失させた次世代遺伝子改変株でより強い傾向が見られた。

また、これらのレポーターシステムを応用することにより、シナプスが電顕レベルでどのような構造を持っているかを、CLEM (Correlative light and electron microscopy) という蛍光組織

像と電顕を重ね合わせる技術を用いて観察することが可能になった。電顕的観察より、移植後には様々な成熟段階のシナプスが形成されていることが示唆された。生体内の視細胞のシナプスは、視細胞と双極細胞の他に、水平細胞が寄与して triad を形成しているが、これらの移植後のシナプス観察より、移植後視細胞シナプスへの水平細胞の寄与は移植後の視機能再建において重要な要素の一つであることが示唆された。また、視細胞変性モデルでは、水平細胞もただちに退縮する像を観察しており、移植後のホスト-グラフトのシナプス形成に水平細胞が関与する可能性も考えられる。そこで、次のステップとして、移植後シナプス形成の量的質的要素にホスト内及びグラフト内の水平細胞がそれぞれどの様に寄与しているかを検討するために、CRE 誘導型水平細胞の欠失マウス、双極細胞がラベルされたレポーターマウス、視細胞変性モデルを掛け合わせ、水平細胞を欠失させた視細胞変性-双極細胞レポーターモデル動物を確立した。これらのモデルを用いた移植後シナプス形成及びホスト網膜の光応答については今後の課題において引き続き研究を進めていく予定である。

今回の研究課題により移植後の視機能再建において重要なホスト-グラフト間のシナプス形成に対するより詳細な理解を得るとともに、今後更に発展的な研究において、より良い視機能再建を目指していく上での重要な手がかりとツールを得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuyama T, Tu HY, Sun J, Hashiguchi T, Akiba R, Sho J, Fujii M, Onishi A, Takahashi M, Mandai M	4. 巻 24
2. 論文標題 Genetically engineered stem cell-derived retinal grafts for improved retinal reconstruction after transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102866	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9件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 万代道子
2. 発表標題 iPS細胞を用いた網膜再生医療
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 万代道子
2. 発表標題 網膜色素変性に対するiPS由来網膜移植治療
3. 学会等名 第40回日本眼薬理学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 万代道子
2. 発表標題 iPS由来網膜シートを用いた再生医療
3. 学会等名 第21回日本ロービジョン学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 万代道子
2. 発表標題 次世代型ヒトES細胞由来網膜組織の末期網膜変性ラットへの移植後の表現型
3. 学会等名 第124回日本眼科学学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 万代 道子
2. 発表標題 Transplantation of ES/iPS-derived 3D retina~Over view of current work
3. 学会等名 10 Years Vision Research in Paris (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wu You-ren
2. 発表標題 Transplanted Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Ganglion Cells Integrate and Form Synapses in a Retinal Ganglion Cell-depleted Mouse Model
3. 学会等名 Joint French-Japanese Scientific Seminar Vision Restoration: Emerging Therapies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 万代道子
2. 発表標題 iPS由来網膜組織を用いた再生治療
3. 学会等名 日本眼科学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 万代道子 Tu Hung-Y ほか
2. 発表標題 ヒトiPS 細胞由来網膜移植後のラット及びサル網膜変性 モデルでの中長期生着と機能検証
3. 学会等名 日本眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 万代道子
2. 発表標題 Regeneration therapy for retinal degeneration using iPS cell-derived retinal tissue
3. 学会等名 眼薬理学会 (招待講演)
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

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