

平成 年 月 日現在

研究種目：若手（B）
 研究期間：2008～2009*
 課題番号：20791287
 研究課題名（和文） 誘導多能性幹細胞から神経網膜細胞への分化誘導
 研究課題名（英文） Differentiation of retinal cells from induced pluripotent stem cells.

研究代表者
 平見 恭彦（HIRAMI YASUHIKO）
 財団法人 先端医療振興財団 先端医療センター 眼科 副医長
 研究者番号：00462721

研究成果の概要（和文）：

網膜変性疾患に対する細胞移植・再生治療の開発の一環として移植細胞の供給源の開発を行った。マウスおよびヒトの人工多能性幹細胞(iPS 細胞)から網膜を構成する細胞、特に網膜変性疾患において移植細胞の供給が必要となる網膜視細胞および網膜色素上皮細胞への分化誘導が可能なことを示し、iPS 細胞が細胞移植医療の細胞供給源となる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, whether induced pluripotent stem cells (iPSCs) can differentiate into retinal cells was tested. Treating iPSCs with Wnt and Nodal antagonists in suspension culture induced expression of markers of retinal progenitor cells and generated RPE cells. Subsequently, treatment with retinoic acid and taurine generated cells positive for photoreceptor markers. It showed that iPSCs can be induced to differentiate into retinal cells which have a possibility to be used as patient-specific donor cells for transplantation therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：眼発生・再生医学

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は遺伝子の異常による網膜視細胞の細胞死が進行性の網膜変性を引き起こす遺伝的網膜変性疾患である。変性が進行した網膜に対しては現在有効な機能回復の

手段はなく、視細胞移植による視機能再生が有望な治療法の一つである。これまで国外では本疾患の患者への胎児網膜細胞の移植の報告があるがいまだ治療法として確立されておらず治療の可能性を示唆するにとどま

っている。また動物実験レベルでは国外国内とも疾患モデル網膜に対する胎児あるいは新生児の幼若な網膜、体性幹細胞あるいは胚性幹細胞から分化誘導された視細胞の移植効果が報告されている。細胞移植を臨床の治療に応用するにあたり移植する細胞を大量に準備する必要があるが、我が国の現状を考えると胎児網膜については大量に準備することは困難であり、胚性幹細胞の臨床応用については卵子、受精卵の使用に関する倫理的問題がまだ議論の途上にある上、同種間移植による移植後の拒絶反応の問題も解決する必要がある。

一方 2006 年にマウス体細胞へのレトロウイルスによる遺伝子導入により胚性幹細胞と近い特性(自己複製能・分化多能性)を持つ iPS 細胞が発表された(Takahashi K and Yamanaka S, Cell 2006)。臨床応用の面で患者本人から採取した細胞を大量に培養して必要な組織や細胞へ分化させることができる可能性を示す画期的な発見であり、移植医療の細胞の供給源として大いに期待ができる。これまでに研究代表者の所属部局である理化学研究所網膜再生医療研究チームの高橋政代チームリーダーを中心として進められてきた研究で、胚性幹細胞からの網膜細胞への誘導については網膜色素上皮(Haruta M, Invest Ophthalmol Vis Sci 2004)、網膜視細胞(Ikeda H, Proc Natl Acad Sci U S A 2005)と成果が蓄積されており、胚性幹細胞が網膜再生医療において移植細胞の供給源となりうる可能性が示されている。

2. 研究の目的

眼科的疾患(主に網膜変性疾患)に対する細胞移植・再生治療の開発の一環として移植細胞の供給源の開発を行う。すなわちマウスおよびヒトにおいてレトロウイルスによる遺伝子導入により体細胞から未分化増殖能・分化多能性を持つように誘導された人工多能性幹細胞(iPS 細胞)から網膜を構成する細胞、特に網膜変性疾患において移植細胞の供給が必要となる網膜視細胞への分化誘導の研究、および分化誘導で得られた細胞が眼内への細胞移植後に視機能の維持・再生に有効かどうかの検証実験を行う。

3. 研究の方法

これまでに胚性幹細胞での研究においてはマウス由来の Feeder 細胞である PA6 との共培養により神経分化および部分的に網膜色素上皮への分化が誘導されることが報告されている。また、発生初期の分化の研究に応用して Wnt シグナルの阻害タンパクである Dkk-1 および nodal シグナルの阻害タンパク LeftyA を培地中に添加した胚様体の培養により高率に神経細胞が誘導されることが報

告されており、一部は Rx および Pax6 陽性の網膜前駆細胞となることもわかっている。こうして得られた網膜前駆細胞をセルソーティングを利用して選別し、さらに分化誘導を進めることにより効率よくロドプシンおよびリカバリン陽性の視細胞が得られることが明らかになっている。さらに、視細胞のみならず他の網膜細胞においても発生の各段階において発現している遺伝子およびマーカータンパクが報告されており、分化培養条件ごとに遺伝子発現を RT-PCR を用いて、またマーカータンパクの発現については免疫細胞染色を用いて時系列で検討することで特異的マーカーを発現する細胞の出現をモニターできる。これらの手法を用いて iPS 細胞から網膜細胞への分化誘導を試みた。

4. 研究成果

人工多能性幹(iPS)細胞を用いて網膜細胞の分化誘導を試みるという目的に対して、ES 細胞からの網膜細胞の分化誘導に用いた方法を応用して分化誘導を行った。マウス iPS 細胞からの分化誘導は、未分化 iPS 細胞をフィーダー細胞と分離して無血清培地中で浮遊培養を 9 日間行い、その間、培地に Wnt および Nodal シグナルの阻害薬を加えた。その後接着培養を行い、約 15 日目に神経網膜の前駆細胞のマーカーである Rx と Pax6 陽性の細胞および網膜色素上皮の前駆細胞のマーカーである Mitf と Pax6 陽性の細胞を免疫細胞染色および RT-PCR で確認した。さらに分化開始後約 30 日目にタイトジャンクションのマーカーである ZO-1 で染色される多角形状の細胞を確認し、約 45 日目には網膜色素上皮のマーカーである RPE65 陽性の細胞を確認した。分化開始 30 日目には視細胞の前駆細胞のマーカーである Crx 陽性の細胞も確認し、その後から培地にレチノイン酸およびタウリンを添加することにより、視細胞のマーカーであるリカバリンとロドプシン陽性の細胞を確認した。同様にヒト iPS 細胞からの分化誘導は、未分化 iPS 細胞をフィーダー細胞と分離して無血清培地中で浮遊培養を 20 日間行い、その間、培地に Wnt および Nodal シグナルの阻害薬を加えた。その後接着培養を行い、約 40 日目に神経網膜の前駆細胞のマーカーである Rx と Pax6 陽性の細胞および網膜色素上皮の前駆細胞のマーカーである Mitf と Pax6 陽性の細胞を確認した。さらに分化開始後約 60 日目に色素を有する多角形の網膜色素上皮様の細胞を確認した。分化開始 90 日目には視細胞の前駆細胞のマーカーである Crx 陽性の細胞も確認し、その後から培地にレチノイン酸およびタウリンを添加することにより、120 日目には視細胞のマーカーであるリカバリンとロドプシン陽性の細胞を確認した。一方で複数の未分化 iPS 細胞

胞株から同じ方法を用いて分化誘導を行った結果から、iPS 細胞株によって分化誘導の効率が異なることも確認した。使用した未分化 iPS 細胞株はレトロウイルスによって 3 遺伝子 (OCT3/4, SOX2, KLF4) あるいは 4 遺伝子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) を導入して作製されたものであったが、導入された遺伝子の違いによる分化誘導の効率の差は見られなかった。以上の結果から、マウスおよびヒト iPS 細胞から網膜視細胞および色素上皮細胞が分化誘導されたと考えられ、網膜細胞移植の細胞源として iPS 細胞を利用できる可能性が示された。iPS 細胞からの網膜細胞の分化誘導については分化誘導の効率の改善も課題であるが、細胞株ごとの分化効率にも差があるため、患者の自己細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けては同一患者から作製した細胞株間での差異も検討する必要があることが示唆された。

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 1 件)

① Hirami Y, Osakada F, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, Ikeda H, Yoshimura N, Takahashi M. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neuroscience Letters* 458 126-131 2009 査読有

[学会発表] (計 4 件)

① 平見恭彦、ヒト人工多能性幹細胞由来網膜色素上皮細胞および視細胞の分化誘導. 第 113 回 日本眼科学会総会、2009. 4. 16-19 東京

② 平見恭彦、ヒト人工多能性幹細胞由来網膜色素上皮細胞および視細胞の分化誘導. 第 8 回 日本再生医療学会総会、2009. 3. 5-6 東京

③ 平見恭彦、Generation of retinal progenitor cells from mouse induced pluripotent stem cells. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2008 Annual Meeting*, 2008. 4. 27-5. 1 フォートローダーデール 米国

④ 平見恭彦、誘導多能性幹細胞からの網膜視細胞への分化誘導. 第 112 回 日本眼科学会総会、2008. 4. 17-20 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平見 恭彦 (HIRAMI YASUHIKO)

財団法人 先端医療振興財団 先端医療
センター 眼科 副医長

研究者番号: 00462721

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: