

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700423

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた緑内障再生医療の開発

研究課題名(英文) Development of regenerative medicine of glaucoma using iPS cells

研究代表者

吉田 哲 (YOSHIDA TETSU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00365438

研究成果の概要(和文): 緑内障の再生医療を念頭に、iPS細胞から網膜神経節細胞および成体における網膜幹細胞であるミュラー細胞を分化誘導する方法の確立、網膜内のミュラー細胞の同定法の探索を行った。まず iPS細胞からの分化誘導を行うために、網膜前駆細胞マーカーである Rx 遺伝子座に赤色蛍光タンパク質 DsRed が発現する組換え BAC を作成し ipS 細胞に安定導入した。また、ミュラー細胞を同定するためにマーカーを探索し、エピブラキンが該当することを見いだした。

研究成果の概要(英文): To develop the regenerative medicine of glaucoma, I tried to introduce iPS cell into retinal ganglion cell and Muller cell, which is an adult stem cell in retina. At the same time, identification of the marker genes of Muller cell were also taken place. First, a recombinant BAC clone, which has a red fluorescent protein DsRed gene at the position of a retinal progenitor cell marker Rx gene, was constructed. And, I found a gene called Epiplakin was a marker gene of Muller cell.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：再生医学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：緑内障、網膜神経節細胞、幹細胞、iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

2006年にマウス(Takahashi and Yamanaka, 2006)、2008年にヒト iPS細胞が樹立された(Takahashi *et al.*, 2007)。iPS細胞は多くの細胞に分化する可能性、すなわち多能性(Pluripotency)を持つが、ES細胞と異なり受精卵から樹立されるのではなく体細胞から樹立できるため、倫理的問題や拒絶反応の間

題を克服する再生医療の切り札として注目されている。このような背景の下、現在、iPS細胞を用いた再生医療の研究が盛んに行われている。ES細胞や iPS細胞を用いた再生医療の標的は、膵臓の細胞が脱落することによっておこる糖尿病や中脳黒質のドーパミン作動性ニューロンの脱落によりおこるパーキンソン氏病のような、1種類の細胞の変

性が原因でおこる疾患が主であり、既に Jaenisch らのグループにより、iPS 細胞からドーパミン作動性ニューロンの誘導が報告されている (Wernig *et al.*, 2008)。

網膜変性疾患などの眼科領域においては、加齢黄斑変性などの再生医療を念頭に、ES 細胞から視細胞への高効率な誘導が積極的に行われている (Osakada *et al.*, 2008)。加齢黄斑変性は、網膜色素上皮細胞が細胞死をおこし二次的に視細胞も変性をおこすことにより失明に至る病であり、先進国において高齢者失明の 1 位を占める。日本における高齢者失明の主要な原因は、網膜神経節細胞が変性する緑内障であるが、網膜神経節細胞は 7 種類の網膜細胞のなかで最も早くに分化するため ES 細胞や iPS 細胞からの誘導が困難であり、再生医療に関する研究はあまり検討されてこなかった。

## 2. 研究の目的

(1) 緑内障モデルマウスおよびマウス iPS 細胞を用いて緑内障の再生医療の系を確立する。その際、緑内障モデルマウスに分化誘導しない iPS 細胞をそのまま移植、iPS 細胞を網膜神経節細胞に分化誘導させてから移植、iPS 細胞を Müller 細胞に分化誘導させてから移植するという、3 つの方法を試みる。

(2) 成体網膜における幹細胞であるといわれているミューラー細胞を iPS 細胞から分化誘導し、緑内障の再生医療を行う。

(3) 網膜に存在するミューラー細胞自体を利用して緑内障の再生医療ができないかどうかの検討を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 理研の高橋政代博士のグループが行った ES 細胞から視細胞を分化誘導する培養法である SFEB (Serum free embryoid body) 法を用いて (Ikeda *et al.*, 2005)、まず iPS 細胞を網膜前駆細胞への分化誘導を行う。その後遺伝子導入や液性因子の添加により網膜神経節細胞やミューラー細胞の分化を行う。

(2) 生体内や試験管においてミューラー細胞を同定するために、ミューラー細胞の新たなマーカーの探索を行う。

(3) 緑内障は日本においては失明原因の 1 位でありながら、モデルマウスの報告は非常に少なく、発祥機構の研究は遅れている。我々は、SOD1 (Superoxide dismutase 1) 遺伝子に欠損を持つマウスを解析しているうちに、このマウスが緑内障様の症状を呈していることを見いだした。このマウスを解析することにより、緑内障の発症機構の解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) iPS 細胞に網膜前駆細胞マーカー遺伝子 Rx の発現調節下で赤色蛍光タンパク DsRed を発現する組換え BAC を作成し、iPS 細胞に安定導入した。この細胞を用いて iPS 細胞から分化誘導した網膜前駆細胞を単離することに成功した。網膜から neurosphere 法により選択的に培養した網膜幹細胞に Math5 遺伝子を強制発現させることにより網膜神経節細胞が分化する事が報告されている (Yao *et al.*, 2007)。現在、iPS 細胞から分化誘導した網膜前駆細胞にアデノウイルスをもちいて Math5 遺伝子を強制発現させることにより、iPS 細胞由来網膜神経節細胞の分化誘導を試みている。一方、iPS 細胞から Muller 細胞への分化誘導系の確立も行っている。Muller 細胞は網膜細胞の中で唯一のグリア細胞であり、網膜前駆細胞に於いて Notch シグナルが活性化されることにより分化誘導されることが報告されている (Hatakeyama and Kageyama, 2004)。そこで、iPS 細胞由来網膜前駆細胞に EDTA を加えることにより Notch シグナルを活性化させることにより (Rand *et al.*, 2000)、Muller 細胞の分化誘導を試みている。

(2) 申請者は、臍臓においてのエピブラキンと呼ばれる遺伝子が幹細胞マーカーであることを報告した (Yoshida *et al.*, 2009)。そこで、成体の網膜において幹細胞の機能を持つことが報告されている Muller 細胞 (Das *et al.*, 2006) においてエピブラキンが発現しているかどうかを調べた。その結果、エピブラキンは Muller 細胞に発現しており、NMDA を投与して再生を誘導した網膜において、Muller 細胞における発現量が通常よりも高くなっていることを発見した。このことから、エピブラキン遺伝子は Muller 細胞のマーカーであるだけでなく、Muller 細胞の幹細胞活

性に何かしらの機能をもつことが示唆された。

(3) SOD 遺伝子は活性酸素の除去に働く遺伝子であり、SOD 遺伝子欠損マウスの網膜において酸化ストレスの亢進が認められた。それとともに細胞死が観測されたが、他の網膜細胞に比べ神経節細胞は特に酸化ストレスに対して脆弱であることが認められた。以上のことから、SOD 遺伝子欠損マウスにおいては網膜神経節細胞の細胞死が起こることにより緑内障のモデルとなることが示唆された。現在、このマウスにおける網膜神経節細胞の細胞死機構を詳細に検討することにより、緑内障における網膜神経節細胞死の機構を調べているところである。

#### 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5件)

Kenya Y, Ozawa Y, Yoshida T, Kurihara T, Hirasawa M, Ozeki N, Shiba D, Noda K, Ishida S, Tsubota K. (2011) Retinal ganglion cell loss in superoxide dismutase 1 deficiency. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. in press. 査読有  
Matsuo A, Yoshida T, Yasukawa T, Miki R, Ishikawa K, Fujiwara S, Kume K, Kume S. (2011) Epiplakin1 marks the cholangiocyte lineage in normal liver and adult progenitors in injured liver. Gene Expr Patterns. 11:255-262. 査読有  
Terashima M, Kobayashi M, Motomiya M, Inoue N, Yoshida T, Okano H, Iwasaki N, Minami A, Matsuoka I. (2010) Analysis on the expression and function of BRINP family genes during neural differentiation of mouse embryonic stem cell derived neural stem cells.

J. Neurosci. Res. 88:1387-1393. 査読有  
Yoshida T, Guo X, Namekata K, Mitamura Y, Kume S, Harada T. (2010) Expression of Epiplakin1 in the developing and adult mouse retina. Jpn J. Ophthalmol. 54:85-88. 査読有

Yoshida T, Murata K, Shiraki N, Kume K, Kume S. (2009) Analysis of gene expressions of ES-derived Pdx1-expressing cells: Implications of genes involved in pancreas differentiation. Dev. Growth Differ. 51:463-472. 査読有

[学会発表](計7件)

吉田哲、小泉春菜、結城賢弥、平林由香、鈴木啓一郎、三谷幸之介、小林哲郎、大山学、天谷雅行、岡田洋平、赤松和土、坪田一男、榛村重人、小沢洋子、岡野栄之

ヘルパー依存型アデノウイルスを用いたヒト iPS 細胞の遺伝子変異治療

第10回 日本再生医療学会総会、京王プラザホテル(東京)、2011年3月1日、2日

Yoshida, T., Koizumi, H., Yuki, Y., Kubota, S., Hirabayashi, Y., Suzuki, K., Mitani, K., Kobayashi, T., Ohyama M., Amagai, M., Okada, Y., Akamatsu, W., Tsubota, K., Shimmra, S., Ozawa, Y., Okano, H. A gene therapy for a gene mutation in human iPS cell using helper dependent adenoviral vector.

The 16<sup>th</sup> International Conference of the International Society of Differentiation, From Stem Cells to Organisms.

Nara-ken New Public Hall, Nara, Japan.

November 15-18, 2010.

吉田哲

ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いたヒト iPS 細胞の遺伝子変異治療の試み  
iPS・ES・体性幹細胞 Forum 2010 ~基礎研究  
から臨床応用・創薬研究へ~

秋葉原 UDX GALLERY (東京)

2010年6月29-30日

T. Yoshida, H. Koizumi, K. Yuki, K. Tsubota, H. Okano, Y. Ozawa.

Purification of iPS cells derived from a retinitis pigmentosa patient from feeder cells.

ARVO 2010, The Future of Eye and Vision Research.

Fort Lauderdale, Florida, USA.

May 2-6, 2010.

Tetsu Yoshida, Haruna Koizumi, Kenya Yuki, Keiichiro Suzuki, Kohnosuke Mitani, Kazuo Tsubota, Shigeto Shimura, Yoko Ozawa, Hideyuki Okano.

A gene therapy for a patient with a familial neurodegenerative disease using iPS cell.

Global COE Program Symposium 2010, Education and Research for Stem Cell Medicine.

Center for Integrated Medical Research, Keio University, Tokyo, Japan.

February 25-26, 2010

Yoshida T., Kume S, Harada T, Tsubota K, Ozawa Y.

Expression of Epiplakin1 in the Developing and Adult Mouse Retina

Retina: Neural Stem Cells and Photoreceptor Degeneration.

Okinawa Institute of Science and Technology, Okinawa, Japan.

November 9-12, 2009.

吉田哲、白木伸明、馬場秀夫、後藤瑞希、藤原作平、糸和彦、糸昭苑

Epiplakin1 の発現パターンの解析

第42回日本発生生物学会、トキメッセ(新潟)、2009年5月28-31日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 哲 (YOSHIDA TETSU)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 00365438

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし