

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09757

研究課題名 (和文) 次世代型移植用網膜シート作製のための分子基盤の確立

研究課題名 (英文) Establishment of the molecular basis for the preparation of the next-generation retinal sheets for transplantation

研究代表者

増田 智浩 (Masuda, Tomohiro)

立命館大学・総合科学技術研究機構・研究員

研究者番号：30796496

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) : 大型のiPS細胞由来移植用網膜シートの作製を目指している。その分子基盤を得るための本研究の結果、RX遺伝子高発現細胞のみを使用することで高品質な網膜スフィロイドを形成することができた。RX遺伝子高発現細胞でも網膜層構造を構築するタイプのスフィロイドとしないタイプに分かれ、WNT経路が重要な役割を果たしていることが示唆された。興味深いことに、動物モデルへの移植検証では両者に機能的差は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜層構造形成に古典的WNT経路と非古典的WNT経路の両経路が重要な役割を果たしていることが示唆された。網膜の層構造形成メカニズムは未知な部分が多く、本成果はその謎を解く一端になると期待できる。またRX遺伝子を高発現する細胞のみを回収し、再構築した網膜組織が移植に適していることが示された。このことは移植組織の大型化が容易になることを意味し、網膜再生治療の発展につながると期待できる。

研究成果の概要 (英文) : We aim to produce large iPS cell-derived retinal sheets for transplantation. As a result of this research to obtain the molecular basis, we were able to form high-quality retinal spheroids by using only cells with high RX gene expression. Even among cells with high RX gene expression, spheroids were divided into those that formed retinal layer structures and those that did not. Our results suggest that WNT pathway plays an important role for the retinal layer formation. Interestingly, no functional differences were found between the two spheroid types when transplanted into the subretinal space of an animal model.

研究分野：発生生物学、細胞生物学、分子生物学、眼科学

キーワード：移植 網膜 視細胞 WNT経路

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2020年に世界で初めてiPS細胞から分化誘導した神経網膜シートを用いた臨床研究が神戸アイセンターで実施された。しかし現行の移植用網膜シートは1mm径程度のサイズで、かつその作製に膨大な費用と労力がかかり一般治療に発展させるには現実的ではない。

我々は分化25日-30日（胎生25日-30日相当）の網膜前駆細胞を多く含む網膜オルガノイドから標的とする細胞のみをソートし、視細胞以外への分化を抑えた大型の移植用網膜組織の再構築を試みることにした。しかし網膜前駆細胞は網膜構成細胞が成熟過程で刻々変化していくヘテロジニアスな細胞集団であり、用いる細胞の特性や移植のタイミングなどが移植後の最終的な生着形態や機能に及ぼす影響は十分には解明されておらず、品質と安全性を担保しつつ大型の移植シートを作製する方法はまだ確立されていない。これまでの研究から、視細胞マーカー陽性細胞が均一に分布したスフィロイドで培養してもサイズがあまり増大せず細胞分裂が制限されているスフィロイド（タイプA）と、スフィロイドが2極化し、その一方は分裂が盛んで時間経過とともに網膜細胞層特有の連続上皮構造の再構築されるスフィロイド（タイプB）ができることを示していた。移植後の網膜シートは、視細胞以外への分化が極力制限され、かつ視細胞層が再構成されることが望まれる。スフィロイド_タイプAとBは、これらのメカニズム（分化制限と視細胞層の再構成）を詳細に検討するのに適しており、次世代型神経網膜作製の基盤になると考えた。

2. 研究の目的

大型の移植用網膜シート作製に適した網膜前駆細胞集団を同定するために、異なるスフィロイドタイプの形成に重要な分子生物学的メカニズムを明らかにする。さらに異なるスフィロイドから調整した移植用網膜シートを動物モデルに移植し、どちらのタイプが移植に適しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

【スフィロイドの作製】

網膜前駆細胞マーカー遺伝子の1つであるRX遺伝子の下流にVenusをノックインしたES細胞（RX_Venus株）から網膜オルガノイドをSFEBq法で分化誘導した。誘導3日目と6日目にBMP4処理を行ったサンプルに対し、それぞれ誘導25日目にVenus陽性細胞をFACSを用いて回収し、スフィロイドを作製した。この際、誘導3日目と6日目にBMP4処理を行ったサンプル（以降それぞれD3BMP4、D6BMP4と記載）のVenus陽性細胞集団の分布パターンが異なっていたことから（図1）、D3BMP4サンプルからはVenus強陽性細胞集団（以降、D3_BMP4-Venus++）を、D6BMP4サンプルからはVenus強陽性細胞集団（以降、D6_BMP4-Venus++）およびVenus強陽性細胞集団（以降、D6_BMP4-Venus+）を採取し、スフィロイドを作製した。

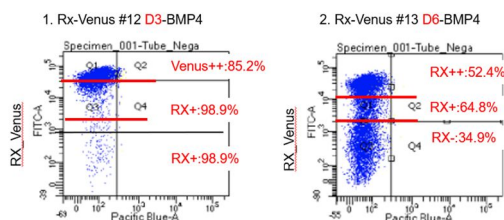


図1 誘導3日目(1)と6日目(2)にBMP4処理を行ったサンプルのVenus陽性細胞の分布パターン

【シングルセル解析】

上記手順でスフィロイドを培養すると、試験計画時に確認された2種類のフェノタイプ（タイプA、タイプB）に加え、Venus陽性細胞のみから構成されるがタイプAと異なり培養とともにサイズが増大し網膜の層構造が形成されるスフィロイド（タイプC）がD6_BMP4-Venus++から誘

導された (図2)。

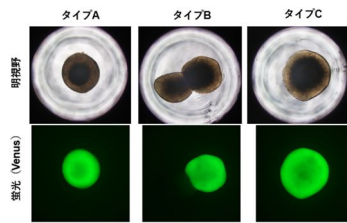


図2 スフィロイド形成 35 日目 (分化誘導開始から 60 日目) のスフィロイドの明視野と蛍光画像

これら 3 種類のスフィロイドについて、層構造形成時期やサイズ増大時期を考慮し、Day (D) 0, D1, D5, D9, D15, D21, D35 の計 7 つのタイムポイントでサンプリングした。

これらのタイムポイントから得られたスフィロイドについて 10XGenomics 社のクロミウムを用いシングルセルシーケンシングを行い、R パッケージ Seurat でデータ解析を行った。

【スフィロイドの移植後の有効性評価】

スフィロイド形成 35 日後にタイプ A および C の網膜部位を適切にカットし、網膜変性免疫不全ラットの網膜下に移植した。移植の約 150 日後にラットの移植眼を摘出し、免疫組織化学染色により、移植網膜の成熟度を確認した。また移植の約 270 日後に MEA (他電極アレイ) を実施し、移植組織の光に対する電気生理学的な応答を確認した。

4. 研究成果

【シングルセル解析】

(1) タイプ B の Venus 陰性部位は脳脊髄系に分化している

D6_BNP4-Venus+から誘導されるタイプ B において形成される Venus 陰性部位の同定を行った。D5 から D35 までのシングルセルデータを統合して解析したところ、D15 から D35 にかけて特定のクラスターが増加してくるのが分かった (図 3 A, B)。これらのクラスターに特徴的に発現する遺伝子を同定したところ、大きく上下に分かれたクラスターの下部 (図 3A 青囲み) が網膜を構成する細胞集団、上部 (図 3A 赤囲み) が非網膜系の細胞集団であることが判明した。特に非網膜系細胞集団についてその特徴を解析すると、毛様体辺縁部のマーカー遺伝子の発現に加え、中脳・菱脳のマーカー遺伝子が発現していた。一方で D6_BNP4-Venus++から誘導されるタイプ C にはこのような非網膜系遺伝子の発現は確認できないことから、これら非網膜系細胞は Venus 弱陽性細胞から分化したと示唆された。

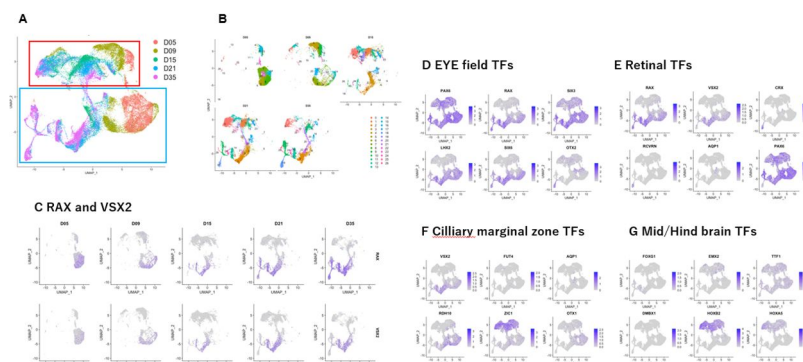


図3 タイプ B のシングルセル解析 A. D5~D35 のデータを統合して作製した UMAP クラスタリング結果 B. D5~D35 統合データについて作製した UMAP についてタイムポイントごとに別表記 C~G. UMAP 上への遺伝子発現プロット

本解析の結果から、品質の高い網膜を作製するには RX が高発現する細胞集団を用いてスフィロイドを形成すると良いことが明らかとなった。また RX 弱発現細胞は網膜分化に不適と判明したが、分化 25 日目に網膜オルガノイドを分散しスフィロイドを再構築することで、RX 弱発現細胞

集団と RX 強発現網膜細胞集団に 2 極化した。このことは仮に RX 弱発現細胞が混入しても、スフィロイドを作製することで網膜細胞と非網膜細胞の分離が起こり、高品質の網膜組織を作製できることを示唆している。

(2) 網膜層構造の形成には Wnt 経路が重要である

網膜層構造がスフィロイドで形成される D9 に注目してタイプ A と C の違いを解析したところ、特に網膜前駆細胞からなるクラスター群において、タイプ A もしくはタイプ C に多いクラスターが存在することが明らかとなった (図 4)。

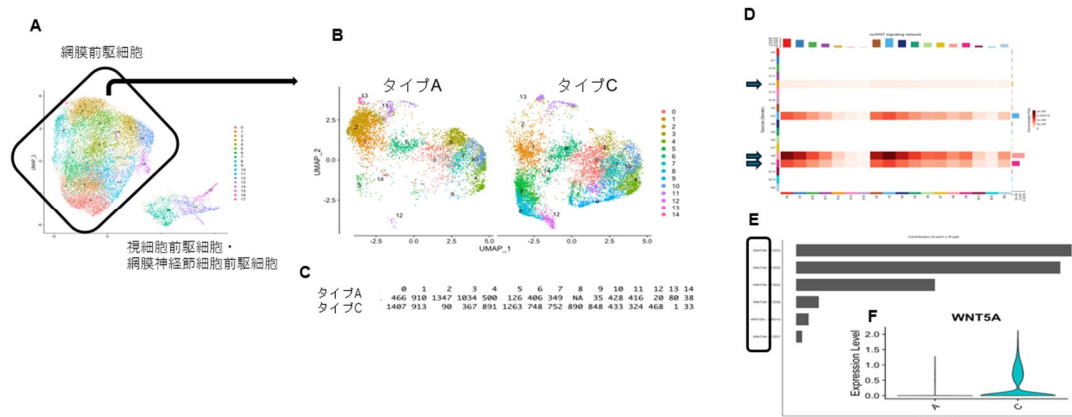


図 4 D9 におけるタイプ A とタイプ C のシングルセル解析と細胞間ネットワーク解析 A. D9 におけるタイプ A とタイプ C のサンプルデータを統合した UMAP クラスターリング B. 網膜前駆細胞集団のみを単離し、UMAP のパラメーターを変更した再解析結果 C. B のクラスターごとのタイプ A とタイプ C それぞれの細胞数 D. Pathway 解析 E. Ligand-Receptor connection 解析 F. タイプ間の WNT5 遺伝子発現

細胞間ネットワーク解析により D9 に特徴的な Pathway 解析により、非古典的 (non-canonical) WNT 経路のリガンドがタイプ A もしくはタイプ C に特異的に発現していることが示唆された。特にタイプ C に特徴的なクラスターにおいて特異的なリガンドの発現が多いことが認められた (図 4D 矢印)。特に貢献度が高いリガンドを解析すると、WNT5A が同定された (図 4E)。実際 WNT5A の発現解析を行うと遺伝子の発現レベルがタイプ C でタイプ A と比べて明らかに高かった (図 4F)。それ以外の細胞間ネットワークに参与する経路 (古典的 WNT, Hedgehog, NOTCH, IGF, FGF, BMP) ではタイプ A と C の間で有意な差が確認できなかった。以上の結果から、D9 の網膜層構造形成過程において WNT5A を介した非古典的 WNT 経路が何らかの形で関与していることが示唆された。

同様の解析を D5 のタイプ A とタイプ C に対して行った。まずこれらのサンプルデータを統合し UMAP クラスターリング解析を行った。形成された網膜前駆細胞からなる 1 塊のクラスターのうち、タイプ A は向かって左側のサブクラスターを構成する細胞が多く、タイプ C は向かって右側のサブクラスターを構成する細胞が多いことが判明した (図 6A, B)。次に D5 に特徴的な Pathway を解析した。その結果 D5 では古典的 WNT 経路に関係するリガンドの発現が特異的に高いことが判明した。特にタイプ C に特徴的なクラスターにおいて特異的なリガンドの発現が多いことが認められた (図 6C 矢印)。さらにこれらのクラスターにおいて特に貢献度が高いリガンドを解析すると、WNT2B が同定された (図 6D)。一方で WNT5A も含む、それ以外の細胞間ネットワークに参与する経路 (非古典的 WNT 経路, Hedgehog, NOTCH, IGF, FGF, BMP) ではタイプ A と C の間で有意な差が確認できなかった。

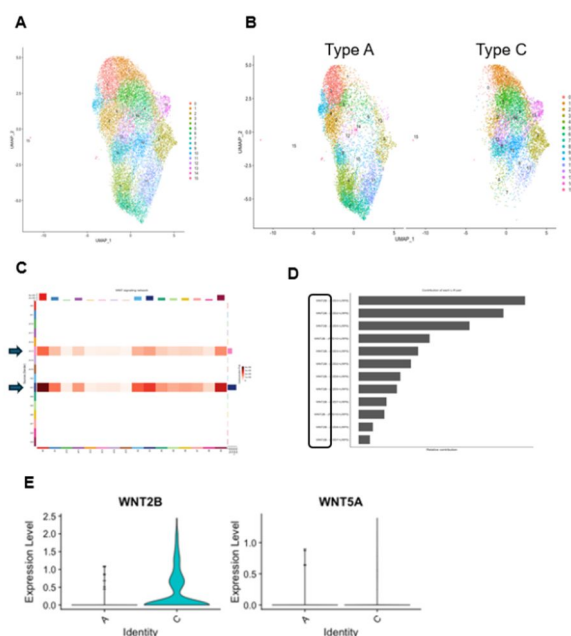


図6 D5におけるタイプAとタイプCのシングルセル解析と細胞間ネットワーク解析 A. D9におけるタイプAとタイプCのサンプルデータを統合したUMAPクラスタリング B. タイプAとタイプCそれぞれのUMAPクラスタリング C. Pathway 解析 D. Ligand-Receptor connection 解析 E. タイプ間の WNT5 遺伝子発現

また層構造形成後のD35においてはタイプAとタイプCを構成する細胞のクラスターに明確な違いは確認できなかった。以上のことから網膜層構造の形成にはWNT経路が重要で、古典的経路と非古典的経路を活用することで網膜層構造が形成されていることが示唆された。

(3) スフェロイドタイプによる移植後の組織生着に差は無い

タイプAとタイプCのいずれがより移植に適しているかを明らかにするため、スフェロイド形成35日目（網膜分化誘導60日目）のスフェロイドを免疫不全視細胞変性ラットの網膜下に移植した。そして移植の約5カ月後に眼球を摘出し、移植組織の免疫組織化学染色を行った。タイプAスフェロイド由来移植片について移植後の組織の生着状況を確認したところ、これまでの知見と同様にロゼット構造が形成された（図7A矢印）。視細胞の成熟を示すロドプシン（RetP1）および錐体オプシン（Opsin R/G+B）の発現についても、オプシン陽性細胞がロゼット構造の内側で確認された。タイプCについてもロゼット構造が形成され（図7B矢印）、ロドプシンおよび錐体オプシンに対する陽性細胞がロゼット構造の内側で確認された。タイプAとタイプCの成熟度を比較すると、定性的には両者に差が確認できず、意外なことに移植時点での網膜層構造の有無が移植後の網膜の成熟に影響を与える可能性は低いことが示唆された。

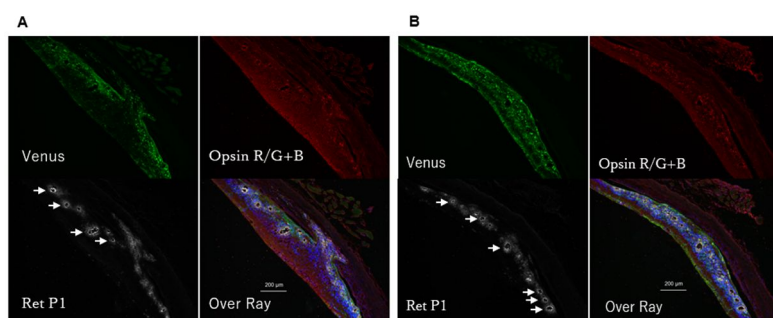


図7 移植組織の免疫組織化学染色 A. タイプAスフェロイド移植網膜の免疫組織像 B. タイプCスフェロイド移植網膜の免疫組織像 Venus: RX_Venus蛍光, Opsin R/G+B: 錐体オプシン (Red, Green, Blue抗体の混合) 抗体, RetP1: ロドプシン抗体

次に機能面から両者の違いを評価するために、移植の約270日後にMEA（他電極アレイ）を実施し、光に対する電気生理学的応答を測定した。その結果、タイプA、タイプCともに光に対して反応することが示された。以上の結果は、移植スフェロイドが網膜層構造の有無にかかわらず移植後に視細胞が成熟して光受容能を獲得し、ホスト細胞とシナプスを形成したことを示唆している。どちらのタイプを用いても移植後に一定の光応答が得られることは、移植用網膜シートの大形化に必要な技術的難易度が低いことを示唆しており、移植シートのサイズ制限問題の解消が比較的容易に実現する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasuaki Iwama, Tomohiro Masuda, Mika Yoshimura, Michiru Matsumura, Kanako Kawai, Masayo Takahashi, Koji Nishida, Itoshi Nikaido, Michiko Mandai
2. 発表標題 Genomic characterization of human pluripotent stem cell-derived RAX-positive sub-populations that direct retinal layer structuring and non-retinal tissue
3. 学会等名 ARVO 2024（国際学会）
4. 発表年 2024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
---------	---------