

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究（C）（一般）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591969

研究課題名（和文） ES・iPS細胞を用いた網膜神経前駆細胞の分化機構の解析

研究課題名（英文） Differentiation of retinal progenitors derived from ES cells and iPS cells.

研究代表者 鈴木 登

(Suzuki Noboru)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：40235982

研究成果の概要（和文）：網膜を構成する主要な細胞は、網膜神経節細胞、双極細胞と視細胞であり、視細胞は明暗を感知する杆体視細胞と、色覚を担う錐体視細胞とに大別される。これまでに発生あるいは再生の過程で、網膜前駆細胞から神経節細胞や双極細胞、さらに視細胞前駆細胞から杆体視細胞と錐体視細胞とに別れて分化する段階に関わる分子やその受容体、その後の細胞内シグナル伝達が精力的に解析されてきたが、その詳細は十分に明らかではない。我々はマウス ES 細胞並びに iPS 細胞に眼発生に関わる重要な転写因子の一つである pax6 を遺伝子導入した後、限界希釈法を用いることで nestin, musash1, six3, 網膜前駆細胞の分化に関わる転写因子 chx10 を同時に発現する網膜神経前駆細胞株を複数樹立する事に成功した。

iPS 細胞から樹立した網膜前駆細胞は視細胞前駆細胞マーカーである CD73 を非刺激状態で 50%程度、ロドプシン蛋白を中等量発現する。この細胞は様々な成長因子やケモカインに反応して更に分化して green-opsin, blue-opsin, red-opsin を発現する。一方、ES 細胞から樹立した細胞株は優先的に網膜神経節細胞に分化する。即ち視細胞前駆細胞は異なったケモカインで杆体視細胞と錐体視細胞に分化調節されていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The main cells that make up the retina, are photoreceptor cells, retinal ganglion cells, and bipolar cells. The photoreceptor cells are classified into rod-photoreceptor cells for sensing light and dark, and the cone photoreceptors responsible for color vision.

In the course of embryonal development and somatic regeneration occur, differentiation from retinal progenitor cells into bipolar cells, retinal ganglion cells, cone photoreceptors and rod-photoreceptor cells has been extensively studied. Nevertheless, molecules involved in the differentiation processes have not been fully clarified.

We have introduced a gene pax6 which is one of the most important transcription factors involved in the eye development into mouse iPS cells and mouse ES cells. After limiting

dilution culture of the pax6 transfected cells, we have established several retinal neural progenitor cell lines expressing simultaneously nestin, musashi1, six3, and chx10, a transcription factor which is importantly involved in differentiation of retinal progenitor cells. The retinal progenitor cells we have established from iPS cells are 50% positive for cell surface CD73, a retinal progenitor cell marker, and express a moderate amount of rhodopsin protein upon unstimulated condition. The cells differentiate into cells expressing green-opsin, blue-opsin, and red-opsin in response to various chemokines and growth factors.

In contrast, cell lines established from ES cells with the same procedure differentiate into retinal ganglion cells predominantly. Collectively, we found that differentiation of photoreceptor precursor cells into cone photoreceptors and rod-photoreceptor cells are regulated by respective chemokines and growth factors.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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・iPS細胞

#### 1. 研究開始当初の背景

網膜は光情報受容の主体である神経網膜と網膜色素上皮の2層から構成されている。神経網膜組織は、発生学的に中枢神経系由来の組織であり一旦障害を受けるとその修復は困難である。なかでも視細胞は障害を受けやすく、遺伝的原因や虚血等による視細胞障害で失明に至る場合が多い。

網膜疾患での失明の主要な原因は視細胞変性であることから、最終的に視細胞に分化できる神経網膜前駆細胞の分化誘導と視細胞分化の調節機構の解明が待ち望まれている。ことに神経網膜前駆細胞は網膜神経節細胞、双極細胞、視細胞へと分化して行くと共に網膜神経層に遊走してシナプス形成を行うがその制御の詳細は充分明らかで

はない。

#### 2. 研究の目的

我々はマウス ES 細胞に神経発生に関わる転写因子の一つである pax6 を遺伝子導入した後、限界希釈法を用いることで nestin, musashi1, six3, 網膜前駆細胞の分化に関わる転写因子 chx10 を同時に発現する網膜前駆細胞株の樹立に成功した事を報告した。この網膜前駆細胞に各種のケモカイン、増殖因子、さらにはそれらのノックアウトマウスを用いて、網膜神経節細胞、双極細胞、視細胞へと分化するメカニズムを転写因子レベルとエピジェネティック調節のレベルで解析することを目的とした。

我々の実験系ではクローンレベルで視細胞や双極細胞への分化メカニズムを解析す

ることができる。既にその分化に MCP1 や FGF が重要に関わることを見出した。今後は細胞分化で誘導される転写因子やエピジェネティック調節を解明し、網膜前駆細胞の細胞内シグナル伝達機構にどのような変化をもたらして視神経や双極細胞が分化誘導されるのかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

我々の作成した株化 pax6 導入細胞は *in vitro* でも *in vivo* でも網膜神経節細胞、双極細胞、視細胞に分化するがその分化機構は明らかではない。

これらの網膜前駆細胞株を成長因子等で刺激して網膜神経節細胞、双極細胞、視細胞への分化機構を解析するが、そこでは網羅的なトランスクリプトーム解析を行う。DNA メチル化のレベルで網膜細胞分化制御におけるエピジェネティックな調節をも明らかにする。近年網羅的トランスクリプトーム解析が進み、細胞内シグナルはシグナル蛋白質や蛋白コード mRNA のみならず、非蛋白コード mRNA、センス/アンチセンス RNA が混然として行われていることが明らかになってきた。網膜神経細胞分化の分子メカニズムの解析はこの手法の導入により初めて可能になると考える。さらに同定された mRNA・蛋白質の役割については RT-PCR、免疫染色、ウェスタン法、フローサイトメーターを中心に *in vitro*, *in vivo* で同定して行く。

### 4. 研究成果

iPS 細胞から樹立した網膜前駆細胞は視細胞前駆細胞マーカーである CD73 を非刺激状態で 50%程度、ロドプシン蛋白を中等量発現する。この細胞は様々な成長因子やケモカインに反応して更に分化して green-opsin, blue-opsin, red-opsin を発現する。一方、ES 細胞から樹立した細胞株

は優先的に網膜神経節細胞に分化する。即ち視細胞前駆細胞は異なったケモカインで杆体視細胞と錐体視細胞に分化調節されていることが明らかになった。

### 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 20 件)

1. Sato T, Yamano Y, Tomaru U, Shimizu Y, Ando H, Okazaki T, Nagafuchi H, Shimizu J, Ozaki S, Miyazawa T, Yudoh K, Oka H, Suzuki N. Serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis. *Modern Rheumatology* 2013 in press 査読有
2. 清水潤, 鈴木登. <特集>次世代健康・医療・福祉の化学 神経細胞シートを用いた脳血管疾患への移植応用 月刊「化学工業」2013 印刷中 査読無
3. Shimizu J, Izumi T, Suzuki N. Aberrant activation of Heat Shock Protein 60/65 reactive T cells in patients with Behcet's Disease. *Autoimmune Dis.* 2013 in press 査読有
4. Shimizu J, Izumi T, Arimitsu N, Fujiwara N, Ueda Y, Wakisaka S, Yoshikawa H, Kaneko F, Suzuki T, Takai K, Suzuki N. Skewed TGF $\beta$ /Smad signaling pathway of T cells in patients with Behcet's disease. *Clin Exp Immunol.* 2013 in press 査読有
5. Arnaud L, Devilliers H, Peng SL, Mathian A, Costedoat-chalumeau N, Buckner J, Dagna L, Michet C, Sharma A, Cervera R, Haroche J, Papo T, D'Cruz D, Arlet P, Zwerina J, Belot A, Suzuki N, Harle JR, Moots R, Jayne D, Hachulla E, Marie I, Tanaka T, Lebovics R, Scott D, Kucharz EJ, Birchall M, Kong KO, Gorochoy G, Amoura Z. The Relapsing Polychondritis Disease Activity Index: development of a disease activity score for relapsing polychondritis. *Autoimmunity Reviews* 2013 in press 査読有
6. Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Yoshikawa H, Kaneko F, Suzuki T, Suzuki N. Excessive CD4+ T cells co-expressing interleukin-17 and interferon- $\gamma$  in patients with Behcet's disease. *Clin Exp Immunol.* 2012 168(1): 68-74 査読有
7. 清水潤, 山野嘉久, 遊道和雄, 岡寛, 須賀万

- 智, 鈴木登. 稀な肺疾患 再発性多発 軟骨炎. 呼吸 2012 31(7): 641-645 査読有
8. Arimitsu N, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Takada E, Ueda Y, Suzuki T, Suzuki N. Role of SDF1/CXCR4 interaction in hemiplegic mouse model with neural cell transplantation. International Journal of Medical Science 2012 13: 2636-2649 査読有
9. Suzuki N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Ueda Y, Takada E, Hirotsu C, Suzuki T, Fujiwara N, Tadokoro M. Establishment of retinal progenitor cell clones by transfection with Pax6 gene of mouse induced pluripotent stem (iPS) cells "Neuroscience Letters" 2012 509(2):116-120 査読有
10. Chiba S, Takada E, Tadokoro M, Taniguchi T, Kadoyama K, Takenokuchi M, Kato S, Suzuki N. Loss of Dopamine-receptive Neuron Causes L-dopa Resistant Parkinsonism in Tauopathy. Neurobiology of Aging. 2012 33(10): 2491-2505 査読有
11. Sato T, Fujii R, Konomi K, Yagishita N, Aratani S, Araya N, Aono H, Yudoh K, Suzuki N, Moroe B, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T. Overexpression of SPAC1A1/SAAL1, a new gene that is involved in synovocyte proliferation, accelerates the progression of synovitis in mice and humans. Arthritis & Rheumatism 2011 63(12): 3833-3842 査読有
12. 鈴木登 大学での基礎医学研究者の育成. Bio Clinica 2011 26(1): 13 査読無
13. 鈴木登, 遊道和雄, 岡寛, 山野嘉久 再発性多発軟骨炎. リウマチ科 2011 45(5): 510-514 査読無
14. Shimizu J, Yoshikawa H, Takada E, Hirotsu C, Suzuki N. Unbalanced helper T cell function in Behcet's disease. Inflammation and Regeneration 2010 31(3): 296-301 査読有
15. 清水潤, 高井憲治, 鈴木登. iPS 細胞研究の現状. 聖マリアンナ医科大学雑誌 2010 38(2-3 合併号): 171-173 査読無
16. Hasegawa D, Fujii R, Yagishita N, Matsumoto N, Aratani S, Izumi T, Azakami K, Nakazawa M, Fujita H, Sato T, Araya N, Koike J, Tadokoro M, Suzuki N, Nagata K, Senoo H, Freidman LS, Nishioka K, Yamano Y, Itoh F, Nakajima T. E3 ubiquitin ligase synoviolin is involved in liver fibrogenesis. PloS ONE 2010 5(10): e13590 査読有
17. 岡寛, 山野嘉久, 遊道和雄, 鈴木登, 須加万智. 再発性多発軟骨炎の全国疫学調査. リウマチ科 2010 44(3): 381-383 査読無
18. Kurokawa MS, Suzuki N. Effect of nicotine on differentiation of vascular endothelial cells and mural cells derived from mouse embryonic stem cells. Journal of St. Marianna University 2010 1(1): 15-24 査読有
19. Hazama Y, Kurokawa MS, Chiba S, Tadokoro M, Imai T, Kondo Y, Nakatsuji N, Suzuki T, Hashimoto T, Suzuki N. SDF1/CXCR4 Contributes to Neural Regeneration in Hemiplegic Mice with a Monkey ES-cell-derived Neural Graft. Inflammation and Regeneration 2010 30(3): 193-205 査読有
20. Kumagai Y, Kurokawa MS, Ueno H, Kayama M, Tsubota K, Nakatsuji N, Kondo Y, Ueno S, Suzuki N. Induction of Corneal Epithelium-Like Cells From Cynomolgus Monkey Embryonic Stem Cells and Their Experimental Transplantation to Damaged Cornea. Cornea 2010 29(4): 432-438 査読有
- [学会発表] (計 19 件)
1. 藤原成芳, 高井憲治, 高田えりか, 廣津千恵子, 齊藤亜沙子, 有光なぎさ, 神野崇生, 清水潤, 鈴木登. ヒト iPS 細胞由来神経細胞移植による認知症モデルマウスの認知機能改善効果の検討. 第 12 回日本再生医療学会総会 神奈川 2013.
2. 有光なぎさ, 神野崇生, 藤原成芳, 高井憲治, 清水潤, 田中雄一郎, 橋本卓雄, 鈴木登. ヒト induced pluripotent stem cell (hiPS) 細胞からの皮質運動神経分化誘導. 第 12 回日本再生医療学会総会 神奈川 2013.
3. 神野崇生, 有光なぎさ, 藤原成芳, 高井憲治, 清水潤, 田中雄一郎, 橋本卓雄, 鈴木登. ヒト誘導多能性幹細胞の運動神経分化誘導と脳卒中モデルマウスへの移植応用 日本脳神経外科学会 第 71 回学術総会 大阪 2012.
4. Shimizu J, Suzuki N. T cell overactivation through TGF  $\beta$  /Smad signalling pathway in patients with Behcet's disease 「TGF- $\beta$ ファミリーシグナル国際共同研究拠点」第 2 回国際シポジウム 東京 2012.
5. 神野崇生, 有光なぎさ, 藤原成芳, 高井憲治, 清水潤, 田中雄一郎, 橋本卓雄, 鈴木登. ヒト iPS 細胞の神経分化誘導と片麻痺モデルマウスへの移植. 第 11 回日本再生医療学会総会 神奈川 2012.
6. 藤原成芳, 高井憲治, 高田えりか, 廣津千恵子, 有光なぎさ, 神野崇生, 清水潤, 鈴木登. ヒト iPS 細胞由来神経細胞のアルツハイマー病モデルへの移植実験. 第 11 回

- 日本再生医療学会総会 神奈川 2012.
7. Kono T, Arimitsu N, Fujiwara N, Takai K, Shimizu J, Tanaka Y, Hashimoto T, Suzuki N. Experimental trans-plantation of human iPS cells derived neural cells in a mouse model of hemiplegia. Intemational Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting Kanagawa 2012.
  8. Fujiwara N, Takai K, Takada E, Hirotsu C, Arimitsu N, Kono T, Shimizu J, Suzuki N. Transplantation of neural cells derived from human ips cells into an alzheimer' s disease model. Intemational Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting Kanagawa 2012.
  9. 鈴木登. 教育講演：本邦における再発性多発軟骨炎の現状と課題. 第34回日本呼吸器内視鏡学会学術集会 静岡 2011.
  10. Yamano Y, Sato T, Araya N, Yagishita N, Shimizu Y, Ando H, Utsunomiya A, Izumo S, Jacobson S, Suzuki N. Clinical subtype of HAM/TSP based on clinical course and laboratory findings. The 15th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses will be held in Leuven Belgium 2011.
  11. Yoshioka T, Kurokawa MS, Takakuwa Y, Nakano H, Ooka S, Nagai K, Arito M, OkamotoK, Suzuki N, Kato T. Proteomic analysis of peripheral blood mononuclear from Behcet' s disease. 第55回日本リウマチ学会 兵庫 2011.
  12. Yamano Y, Sato T, Tomaru U, Okazaki T, Nagafuchi H, Ozaki S, Shimizu J, Yudo K, Suzuki N. Increased expression of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 in patients with relapsing polychondritis. 第55回日本リウマチ学会 兵庫 2011.
  13. 鈴木登. リウマチ治療と肺障害（シンポジウム3）RA の集約的治療. 第25回日本臨床リウマチ学会 東京 2010.
  14. Shimizu J, Suzuki N. Strong TGF-beta and its receptor gene expressions in Behcet' s disease. 14th International Congress of Immunology 兵庫 2010.
  15. 千葉俊明, 田所衛, 谷口泰造, 鈴木登, 加藤誠也. 難治性パーキンソニズムを伴うタウ型認知症モデルマウスにおける組織・病理学的検討. 第29回分子病理学研究会 茨城 2010.
  16. Shimizu J, Yoshikawa H, Suzuki N, Kaneko F, Kaneko S. Unbalanced T cell response in Behcet' s disease. 14th International Conference on Behcet' s Disease イギリス 2010.

17. 岡寛, 遊道和雄, 山野嘉久, 清水潤, 須賀万智, 鈴木登, 尾崎承一. 成人スチル病・軟骨炎・掌蹠膿疱症 わが国の再発性多発軟骨炎の臨床像と治療の実態に関する疫学調査 162 症例の集計結果. 第54回日本リウマチ学会総会学術集会 兵庫 2010.
18. 岡寛, 遊道和雄, 山野嘉久, 清水潤, 須賀万智, 鈴木登, 尾崎承一. 我が国の再発性多発軟骨炎の臨床像と治療の実態に関する疫学調査～162 症例の集計結果. 第54回日本リウマチ学会総会学術集会 兵庫 2010.
19. Shimizu J, Suzuki N. ベーチェット病における T 細胞抑制系シグナルの異常. 第54回日本リウマチ学会総会学術集会 兵庫 2010.

〔図書〕（計7件）

1. Shimizu J, Suzuki N. Behcet' s Disease. Current Research in Immunology 2013 in press 総ページ数未定
2. 鈴木登. 在宅看護・介護のための難病ガイド 改訂第2版「原発性免疫不全症候群」. 日本医学出版（東京）印刷中 総ページ数未定
3. 鈴木登. 在宅看護・介護のための難病ガイド 改訂第2版「特発性好酸球増多症候群」. 日本医学出版（東京）2013 印刷中 総ページ数未定
4. 鈴木登. よくわかるリウマチ治療薬の選び方・使い方「第1章ステロイド」. 羊土社 2011. 12-32
5. 鈴木登. 今日の治療指針 2011 年版 「再発性多発軟骨炎 relapsing polychondritis」 医学書院 2010 753-754
6. 鈴木登. 膠原病ハンドブック 第I章② 再発性多発軟骨炎－再発性多発軟骨炎 relapsing polychondritis－. 全国膠原病友の会 2010 84-88

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

1. 名称：再発性多発軟骨炎の検査方法およびそれに用いられる検査キット  
発明者：鈴木登  
権利者：聖マリアンナ医科大学  
種類：特許  
番号：2010-126487  
出願年月日：平成22年6月2日  
国内外の別：国内
2. 名称：神経細胞シート及びその製造方法  
発明者：鈴木登  
権利者：聖マリアンナ医科大学  
種類：特許

番号：2012-165108  
出願年月日：平成24年7月22日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者 鈴木 登

(Suzuki Noboru)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：40235982