

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 22 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591970

研究課題名（和文） 虹彩由来網膜幹／前駆細胞の効率的培養法の樹立と分化細胞の生理学的機能評価

研究課題名（英文） The establishment of the effective culture method of retinal stem / progenitor cells derived from iris tissue and the physiologic function test of differentiated cells

研究代表者

山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)

藤田保健衛生大学・共同利用研究施設・准教授

研究者番号：00267957

研究成果の概要（和文）：培養ディッシュ表面を我々が開発した薄層コラーゲンゲルでコーティングすることにより，組織幹細胞マーカーの発現を維持させた状態で継代・維持することができた。次に培養ヒト虹彩組織由来細胞から神経様細胞に分化する細胞を選択・分離し，培養することで効率的に高純度の神経様細胞が培養できた。さらに培養した虹彩由来組織幹／前駆細胞をレチノイン酸含有分化誘導培地で培養することで，網膜神経細胞マーカータンパク質を発現する細胞に分化した。この細胞を細胞電気生理学的手法（パッチクランプ法）にて評価したところ，ナトリウムチャンネルやカリウムチャンネルを有する細胞に分化することを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：When we coated the culture plate surface with lamina collagen gel, the culture cells which were derived from mouse iris tissue were expressed the tissue stem cell marker. Then, we were cultured the nerve-like cells effectively by sorting cells derived from culture human iris tissue. When we cultured tissue stem / progenitor cells derived from human iris tissue in a retinoic acid containing nutrient medium, the cells were differentiated the expressed marker protein of the neural retina cell. Furthermore, the physiologic function of cells were evaluated by the patch clamp method, the cells were detected with a sodium channel and the potassium channel.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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（組織幹細胞による網膜再生）

1. 研究開始当初の背景

網膜変性症などの網膜に障害がある患者数は、推定で約 300 万人以上いると言われていたが、今日の眼科治療(手術など)では、視力を回復させることは非常に難しい。このような状況から、近年目覚ましい研究の進歩により『障害のある網膜神経細胞の代わりに新しい細胞を移植し、その移植細胞が宿主網膜に残存している細胞とネットワークを再構築することで網膜機能を再生させる』という再生医学・医療への期待が高まっている。

ES 細胞や iPS 細胞を用いた様々な再生医学・医療の研究が国内外で多数実施されているが、本研究は成体の自己組織(虹彩)にわずかに存在する組織幹細胞を用いた再生医学・医療の基礎研究である。組織幹細胞は ES 細胞や iPS 細胞と比較して、(1)自己の細胞を用いること、(2)遺伝子導入を行わないこと、などの観点から臨床応用にむけた克服すべき課題が少ない。

2. 研究の目的

本研究期間において、以下の目的に関する研究を遂行した。

- 2-1) 成体マウス虹彩の組織幹細胞(虹彩由来網膜幹/前駆細胞)を未分化状態のまま効率的、かつ継代可能な大量培養法を探索する。
- 2-2) ヒト虹彩由来細胞を用いてマウスの虹彩由来細胞実験の再現性および確認実験を行う。
- 2-3) 虹彩由来網膜幹/前駆細胞から分化誘導した視細胞マーカーを発現する細胞において、神経細胞に特異的な電位依存性ナトリウムチャンネルを指標とした電気生理学的機能を有する網膜神経細胞への分化誘導法を探索する。

3. 研究の方法

- 3-1) 成体マウス虹彩の組織幹細胞(虹彩由来網膜幹/前駆細胞)を用いて、従来の細胞生物学的実験で使用されている culture dish のコーティング法、または新しいコーティング法を開発、および培地を検討して組織幹細胞マーカーの発現を維持させた状態で継代・維持することができる培養条件を検討した。具体的には、ES 細胞や造血幹細胞などの幹細胞自己複製に関与することが報告されている Wnt シグナル、GSK-3 β 阻害剤、Apoptosis シグナル系阻害剤などによる幹細胞の保護、および各種細胞成長因子の添加による検討などを行い、網膜幹/前駆細胞の継代維持を可能にする効率的な培養条件を探索した。
- 3-2) 本研究期間開始前に既に 40 名以上の患者虹彩組織から分離した初代培養細胞を保存していた。そこで、マウス虹彩組織を用いた研究と並行して、ヒト虹彩由来網膜幹/前駆細胞の効率的な継代・維持培養条件、および分化誘導条件について検証した。なお、ヒト虹彩細胞の培養において、患者自己血清、人工血清代替品、および非動物由来各種成長因子による培養についても検討した。
- 3-3) レチノイン酸、Dkk-1, Lefty-A, BMP-4, BHA, Nodal シグナル阻害剤、BMP 系シグナル阻害剤、Activin-A などの分化誘導薬剤を比較検討して、神経細胞に特異的なナトリウムチャンネルを有する細胞への分化能について細胞電気生理学的手法(パッチクランプ法)を用いて評価した。

4. 研究成果

4-1) マウス虹彩由来細胞を従来の細胞生物学的実験で使用されている culture dish のコーティング法 (コラーゲン溶液, ラミニン, ファイブロネクチンなど) にて継代培養したが, 未分化状態のままで細胞を継代維持することはできなかった。しかしコラーゲンゲル上では細胞の培養効率は低下するが, 未分化マーカーを発現した状態の細胞を維持できたことから, コラーゲンゲルを薄層化し, さらに細胞接着因子を混合して新たに我々が考案・作成した薄層コラーゲンコートディッシュを用いて培養したところ, 幹/前駆細胞マーカーを発現する細胞が継代培養できるようになった。

マウス虹彩を酵素処理して単離した細胞を培養したところ, 神経様細胞に分化する細胞と fibroblast 様の神経細胞に分化しない細胞が混在していた。そこで, 未熟な幹/前駆細胞は接着能力が高いという細胞特性を利用して, 単離した虹彩由来細胞のうち, 短時間で培養ディッシュに接着した細胞のみを培養したところ, 形態的に神経様細胞を呈する細胞を選択・分離培養することができるようになった。

4-2) 本研究期間中にさらに 36 名の患者虹彩組織から分離した初代培養細胞を追加保存することができた。

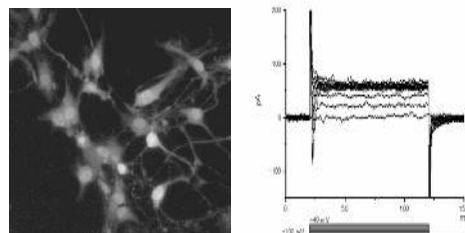
ヒト虹彩由来細胞もコラーゲンゲル上では細胞の培養効率は低下するが, 未分化マーカーを発現した状態の細胞を維持できたことから, コラーゲンゲルを薄層化し, さらに細胞接着因子を混合して新たに我々が考案・作成した薄層コラーゲンコートディッシュを用い,

さらにヒトプール血清, FBS, 血清代替品, Growth Factor などを含む基礎培地に Apoptosis シグナル阻害剤を添加することで, CD29, Sca-1, Nestin などの幹/前駆細胞マーカーを発現する細胞が継代培養できるようになり, さらに一部の細胞マーカーは 12 継代まで保持できた。

ヒト虹彩を酵素処理して単離した細胞を培養したところ, マウス虹彩由来細胞と同様に神経様細胞に分化する細胞と fibroblast 様の神経細胞に分化しない細胞が混在していた。そこで, マウス虹彩由来細胞と同様に, 未熟な幹/前駆細胞は接着能力が高いという細胞特性を利用して, 単離した虹彩由来細胞のうち, 短時間で培養ディッシュに接着した細胞のみを培養し, さらに今後, セルソーターなどを用いて, 細胞を選択分離できるようにするため, 網膜神経細胞へ効率的に分化する細胞の細胞マーカーを探索する。

4-3) 前項の方法で選択した形態的に神経様細胞を呈する細胞を用いて, レチノイン酸を含む分化誘導培地で培養することで効率的に高純度の網膜神経細胞マーカーを発現する細胞を培養することができるようになった。

さらに分化誘導培地で継続して培養した細胞を用いて, 細胞電気生理学的手法 (パッチクランプ法) を用いて評価したところ, 弱いながらもナトリウムチャンネル・カリウムスパイクの波形が検出された。



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18件)

- 1) Tong M., Watanabe E., Yamamoto N., Nagahata-Ishiguro M., Maemura K., Takeda N., Nagai R., Ozaki Y. Circadian expressions of cardiac ion channel genes in mouse might be associated with the central clock in the SCN but not the peripheral clock in the heart. *Biological Rhythm Research* 44 (4), 519-530, 2013.
- 2) 簾内桃子, 竹内早苗, 増田光輝, 山本直樹, 小坂忠司, 宮岡悦良. 眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書. 評価対象: 眼に対する腐食性および強刺激性評価のためのウシ摘出角膜の混濁および透過性試験. *AATEX-JaCVAM J1* (1), 1-15, 2012.
- 3) 簾内桃子, 小坂忠司, 山本直樹, 増田光輝, 竹内早苗, 宮岡悦良. 眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書. 評価対象: 眼に対する腐食性および強刺激性評価のためのニワトリ摘出眼を用いた眼刺激性試験法. *AATEX-JaCVAM J1* (1), 16-29, 2012
- 4) Yamamoto Y., Yamamoto N., Tajima K., Ohno A., Washimi Y., Ishimura D., Washimi O., Yamada H. Characterization of human multicentric osteosarcoma using newly established cells derived from multicentric osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 137 (3), 423-433, 2011.
- 5) Mori Y., Aki K., Kuge K., Tajima S., Yamanaka N., Kaji Y., Yamamoto N., Nagai R., Yoshii H., Fujii N., Watanabe M., Kinouchi T., Fujii N. UV B-irradiation enhances the racemization and isomerization of aspartyl residues and production of Nε-carboxymethyl lysine (CML) in keratin of skin. *J. Chromatogr. B* 879 (29), 3303-3309, 2011.
- 6) Sekiguchi S., Suzuki A., Asano S., Nishiwaki-Yasuda K., Shibata M., Nagao S., Yamamoto N., Matsuyama M., Sato Y., Yan K., Yaoita E., Itoh M. Phosphate overload induces podocyte injury via type III Na-dependent phosphate transporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 300 (4), F848-F856, 2011.
- 7) 山本直樹. アトピー白内障 -発症までのメカニズム-. *IOL&RS* 25 (2), 154-157, 2011.
- 8) 山本直樹. 光学顕微鏡で観察する組織標本の作製法 -組織の固定から標本作製まで-. *日本白内障学会誌*. 23 (1), 40-44, 2011.
- 9) Yamamoto N., Tanikawa A., Horiguchi M. Basic study of retinal stem/progenitor cell separation from mouse iris tissue. *Med Mol Morphol* 43 (3), 139-144, 2010.
- 10) Yamamoto N., Hirano K., Kojima H., Sumitomo M., Yamashita H., Ayaki M., Taniguchi K., Tanikawa A., Horiguchi M. Cultured human corneal epithelial stem/progenitor cells derived from the corneal limbus. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal* 46 (9), 774-780, 2010.
- 11) Atsuzawa K., Nakazawa A., Mizutani K., Fukasawa M., Yamamoto N., Hashimoto T., Usuda N.

Immunohistochemical localization of mitochondrial fatty acid β -oxidation enzymes in Müller cells of the retina. *Histochem Cell Biol* 134 (6), 565-579, 2010.

- 12) Yamada T., Akamatsu H., Hasegawa S., Inoue Y., Date Y., Mizutani H., Yamamoto N., Matunaga K., Nakata S. Melanocyte stem cells express receptors for canonical Wnt-signaling pathway on their surface. *Biochem Biophys Res Commun* 396 (4), 837-842, 2010.
- 13) Uezumi A., Fukada S., Yamamoto N., Takeda S., Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 12 (2), 143-152, 2010.
- 14) Itoh A., Iwase K., Jimbo S., Yamamoto H., Yamamoto N., Kokubo M., Senda T., Nakai A., Nagagasaka A., Nagasaka T., Hibi Y., Seko T. Expression of vascular endothelial growth factor and presence of angiovascular cells in tissues from different thyroid disorders. *World J Surg* 34 (2), 242-248, 2010.

[学会発表] (計 35 件)

- 1) Yamada T., Hasegawa S., Inoue Y., Date Y., Mizutani H., Yamamoto N., Nakata S., Matsunaga K., Akamatsu H. Wnt/beta-catenin signaling regulates melanocyte stem cell differentiation induced by UVB irradiation. International Society for Stem Cell Research 10th Annual

Meeting. 2012. Yokohama.

- 2) 山本直樹、大熊真人、谷川篤宏、堀口正之、宮地栄一. 分化誘導した虹彩由来網膜幹/前駆細胞の生理学的機能評価. 第 11 回日本再生医療学会総会, 2012. 神奈川県
- 3) Yamamoto N., Hirano K., Sumitomo M., Yamashita H., Nakamura M., Hara K., Tanikawa A., Horiguchi M., Taniguchi K., Kojima H. Generation and analysis of a new immortalized human corneal epithelium cell line. 2011 In Vitro Biology Meeting, 2011. North Carolina
- 4) 山本直樹. 水晶体の組織幹細胞と水晶体再生の可能性. 第 115 回日本眼科学会総会, 2011. 東京
- 5) 山本直樹、大熊真人、谷川篤宏、堀口正之、宮地栄一. 虹彩由来網膜幹/前駆細胞の分化細胞における生理学的機能評価. 第 43 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2011. 大阪
- 6) 山本直樹. 水晶体の恒常的な透明性維持機構解明に関する研究. 第 50 回日本白内障学会総会・第 26 回日本眼内レンズ屈折手術学会総会合同学会, 2011. 福岡
- 7) 山本直樹、大熊真人、谷川篤宏、谷口孝喜、堀口正之、宮地栄一. 虹彩由来網膜幹/前駆細胞の網膜神経細胞への分化誘導と生理学的機能評価. 第 43 回藤田学園医学会, 2011. 愛知
- 8) 山本直樹. 網膜幹細胞を用いた網膜再生医療研究. 第 42 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2010. 静岡
- 9) 山本直樹. アトピー白内障の発症に関与する因子とそのメカニズムの解明. 第 49 回日本白内障学会総会・第 25 回日本眼内レンズ屈折手術学会総会合同学会,

2010. 大阪

- 10) 山本直樹、谷川篤宏、堀口正之. ヒト虹彩由来細胞から網膜神経細胞への分化誘導. 第9回日本再生医療学会総会, 2010. 広島
- 11) 伊達靖、赤松浩彦、長谷川靖司、山田貴亮、井上悠、水谷宏、山本直樹、松永佳世子、中田悟. Single EB 培養法を利用した分化誘導因子の探索. 第9回日本再生医療学会総会, 2010. 広島
- 12) 田原千愛、赤松浩彦、長谷川靖司、山田貴亮、吉村知久、水谷宏、山本直樹、松永佳世子、中田悟. 組織再生過程における幹細胞の遊走能の役割. 第9回日本再生医療学会総会, 2010. 広島

[図書] (計1件)

- 1) 山本直樹. アトピー白内障 – その発症に関与する要因とメカニズム – 病気の分子形態学, 学際企画株式会社, 東京, 2011.

[その他]

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/~kyoriken/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)

藤田保健衛生大学・共同利用研究施設・
准教授

研究者番号 : 00267957

(2) 研究分担者

谷川 篤宏 (TANIKAWA ATSUHIRO)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号 : 40324412

大熊 真人 (OHKUMA MAHITO)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号 : 50329710

堀口 正之 (HORIGUCHI MASAYUKI)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号 : 70209295

宮地 栄一 (MIYACHI EI-ICHI)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号 : 90129685

(3) 連携研究者

千田 隆夫 (SENDA TAKAO)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

→岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 10187875