

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24年6月11日現在

機関番号： 82612
 研究種目： 挑戦萌芽的研究
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 22659316
 研究課題名（和文）
 ヒト網膜由来 iPS 細胞の樹立
 研究課題名（英文）
 Establishment of human iPS cells originated from retinal tissues
 研究代表者 東 範行 (AZUMA NORIYUKI)
 独立行政法人 国立成育医療研究センター（眼科医長・細胞医療研究室長）
 研究者番号： 10159395

研究成果の概要（和文）：手術で得られたヒト網膜由来細胞から iPS 細胞を樹立した。メチル化解析で、他の組織由来 iPS 細胞と比べて、ES 細胞のような幹細胞に近い性質を持っていた。奇形腫形成で、神経網膜とともに網膜色素細胞がみられた。本細胞は、再生医療に適した完成度の高い網膜細胞の形成に役立つ。

研究成果の概要（英文）：We generated human iPS cells from the retinal tissues obtained during surgery. By methylation analysis, the iPS cells have characteristics of stem cells similar to those of ES cells. Neural retina cells and retinal pigmented epithelia are identified in teratoma formation. Thus the iPS cells are useful to from highly differentiated retinal cells for reproducing medicine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,500,000	0	1,500,000
平成23年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

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：(1)再生医学 (2)iPS細胞 (3)遺伝子・細胞治療 (4)網膜 (5)遺伝学

1. 研究開始当初の背景

日本を含む先進国においては、失明原因のほとんどが先天性あるいは後天性の網膜疾患である。網膜の構造は種によって大きく異なり、ヒト由来の iPS 細胞研究は、ヒト網膜の発生、ヒト網膜疾患の病態解明、創薬、診断・治療法の開発に不可欠であると期待される。iPS 細胞は、ドナーの由来組織の違いによって、得られる iPS 細胞

の性質ことに分化能が異なることが指摘されている。したがって、臨床的に有用な網膜細胞を作成するには、その潜在性を高くもつ眼組織由来の細胞から作成した iPS 細胞が必須である。

2. 研究の目的

本研究では、世界に先駆け、国立成育医療センター倫理委員会にて承認を受けた眼

手術検体からヒト網膜由来 iPS 細胞の樹立をめざす。網膜への分化過程において発現する遺伝子群の発現調節ネットワークを同定し、他の iPS 細胞や ES 細胞とも比較する。iPS 細胞から成熟した網膜細胞へと分化するプロセスを、生体外での分化誘導系として明示することを目的とする。これによって、網膜発生の基礎知識が得られるとともに、再生医学による失明予防に応用できる。

3. 研究の方法

A：ヒト網膜由来iPS細胞の樹立

こどもの眼手術検体から、ヒト眼球由来細胞、すなわち、網膜のグリア細胞を、虹彩細胞、毛様体細胞、水晶体上皮細胞、角膜上皮細胞や実質細胞の単離・調整を行い、すでに各々に数ラインの細胞が樹立されている。これらを用い、まず網膜由来細胞あるいは他の細胞から、通常の方法でiPS細胞を樹立する。導入遺伝子やウイルスベクターは、Yamanaka因子 (OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC) とレトロウイルスベクターを使用する。iPS細胞のコロニー回収を、トリプシンを用いずに、また、スクレーピング等の強い物理的操作を加えることなく、温度応答性器材を用いて行うことにより、異種細胞との分離やコロニー回収をiPS細胞に障害を与えることなく行う。

B：幹細胞発生学に基づいた細胞選別技術の確立

B-1：ヒトiPS細胞から網膜へと分化する誘導条件の網羅的検討

ヒト網膜由来iPS細胞から特定網膜細胞群へと分化する細胞系譜がどのように形成されるかを明らかにするため、網羅的DNAメチル化解析から網膜特異的DNAメチル化可変領域(Ret-DMRs)を同定した。

B-2：奇形腫形成における、網膜分化細胞群の選別

ヒト網膜由来 iPS 細胞を免疫不全マウスに移植して奇形腫を形成させ、組織化学的に分化する細胞種を検討した。併せて、核型を検討した。

(人権の保護及び法令等の遵守への対応)

1. ヒト細胞を用いることに対する倫理的配慮

こどもの眼手術検体を用いて iPS 細胞を作成する研究においては、国立成育医療研究センター倫理委員会にて承認を受けた (承認番号 156、平成 17 年 7 月承認)。

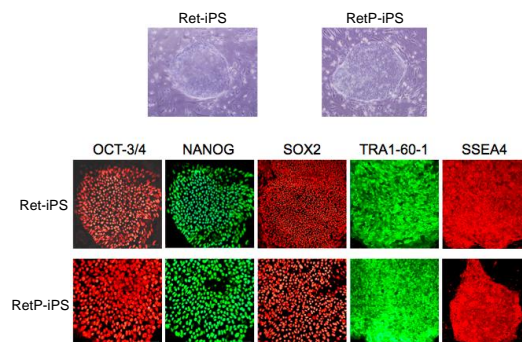
それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。

2. 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号 2003-002,2005-003)。

4. 研究成果

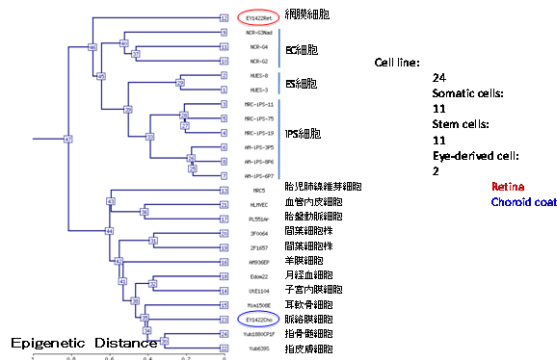
A：当施設の倫理委員会で承認を受け、患者家族の同意を得た後に、手術において得られたヒト小児患者由来の細胞を用いて、iPS細胞を作成した。由来細胞は、脈絡膜および網膜を用い、通常の平面培養を行った後に、 1×10^5 cells に山中 4 因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) を導入したレトロウイルスを感染させた。樹立効率は、脈絡膜由来細胞では 0.01% 以下であったが、網膜由来細胞では 0.13 であり、他の胎児線維芽細胞(0.03)、子宮内膜細胞(0.03)、指皮膚細胞(0.05)と比べて高かった。



ヒト網膜由来 iPS 細胞 (2 種)

B-1：網羅的 DNA メチル化解析から網膜特異的DNAメチル化可変領域(Ret-DMRs)を同定した。Ret-DMRs は新たな網膜細胞マーカーとしても有用であることが明らかになった。また、網膜細胞由来の iPS 細胞はDNAメチル化プロファイルにおいて、他の胎児線維芽細胞、子宮内膜細胞、皮膚細胞、軟骨細胞等由来の iPS 細胞と比べて、ES 細胞のような幹細胞に近い性質

を持っていた。網膜細胞は、iPS 細胞へ効率よく誘導できることが示された。



DNA メチル化を基にした階層的クラスター解析

B-2：免疫不全マウスに移植して奇形腫を形成させ、検討したところ、虹彩由来 iPS 細胞、網膜由来 iPS 細胞ともに、眼組織以外の組織から樹立された iPS 細胞によって形成された奇形腫よりも、神経網膜だけでなく網膜色素上皮が多く見られた。神経網膜とともに網膜色素上皮の再生にも用いられる可能性がある。

また、核型解析では、異常が認められなかった。

本研究では、ヒトの虹彩と網膜から iPS 細胞を作成し、メチル化解析から ES 細胞に近い分化能をもつことを明らかにした。さらに、核型に異常はなく、神経網膜とともに色素上皮への再生に用いられる可能性が示された。エピゲノムが作成目的組織にちかい虹彩・網膜由来 iPS 細胞の樹立は大きな成果である。今後は、形態形成遺伝子の導入や自発発現誘導によって、再生医療に適した完成度の高い網膜細胞の形成を目指す。

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 13 件)

Yokoi T, Seko Y, Yokoi T, Makino H, Hatou S, Yamada M, Kiyono T, Umezawa A, Nishina H, Azuma N. Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. PLoS ONE. 2012;7:e29677.

Hosono K, Ishigami C, Takahashi M, Park DH, Hiram Y, Nakanishi H, Ueno S, Yokoi T, Hikoya A, Fujita T, Zhao Y, Nishina S, Shin JP, Kim IT, Yamamoto S, Azuma N, Terasaki H, Sato M, Kondo M, Minoshima S, Hotta Y. Two novel mutations in the EYS gene are possible major causes of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Japanese population. PLoS ONE 2012; 7: e-31036.

Seko Y, Azuma N, Umezawa A. Identification of factors determining human photoreceptor cell fate. PLoS ONE 2012; in press.

Yamasaki T, Kawasaki H, Arakawa S, Shimizu K, Shimizu S, Reiner O, Okano H, Nishina S, Azuma N, Penninger JM, Katada T, Nishina H. Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. J Neurosci. 2011; 31(46):16872-16883.

Sawada M, Sato M, Hikoya A, Wang C-X, Minoshima S, Azuma N, Hotta Y. A case of aniridia with unioocular Peters anomaly. J AAPOS 2011; 15:104-106.

Nishina S, Suzuki Y, Yokoi T, Kobayashi Y, Noda E, Azuma N. Clinical features of congenital retinal folds. Am J Ophthalmol 2012 ; 153:81-87.

Nishina S, Kosaki R, Yagihashi T, Azuma N, Okamoto N, Hatsukawa Y, Kurosawa K, Yamane T, Mizuno S, Tsuzuki K, Kosaki K. Ophthalmic features of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. Am J Med Genet Part A 2012;158A:514-518.

Nishina S, Kurosaka D, Nishida Y, Kondo H, Kobayashi Y, Azuma N. Survey of microphthalmia in Japan. Jpn J Ophthalmol. 2012 Feb 23. [Epub ahead of print]

Shigeyasu C, Yamada M, Mizuno Y, Yokoi T, Nishina S, Azuma N. Clinical features of anterior segment dysgenesis associated with congenital corneal opacities. Cornea. 2012;31:293-298.

Yamasaki T, Kawasaki H, Arakawa S, Shimizu K, Shimizu S, Reiner O, Okano H, Nishina S, Azuma N, Penninger JM, Katada T, Nishina H. Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. Journal of Neuroscience 2011;

31:16872-16883.

Hiraoka M, Takahashi H, Orimo H, Hiraoka M, Ogata T, Azuma N. Genetic screening of Wnt signaling factors in advanced retinopathy of prematurity. *Mol Vis*. 2010; 16:2572-2577.

Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Fukami M, Ogata T. Heterozygous OTX2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 756-764.

Wu J, Kubota J, Hirayama J, Nagai Y, Nishina S, Yokoi T, Asaoka Y, Seo J, Shimizu N, Kajihō H, Watanabe T, Azuma N, Katada T, Nishina H. p38 mitogen-activated protein kinase controls a switch between cardiomyocyte and neuronal commitment of murine embryonic stem cells by activating MEF2C-dependent BMP2 transcription. *Stem Cells Dev* 2010;19:1723-1734.

[学会発表] (計 45 件)

Azuma N. Early Vitreous surgery for aggressive posterior retinopathy of prematurity. *Vail Vitreoretinal Meeting* 2010 3.

Kobayashi Y, Yamada K, Ohba S, Nishina S, Okuyama M, Azuma N. Ocular manifestations and prognosis of shaken baby syndrome in two Japanese children's hospitals. XXXIIth International Congress of Ophthalmology 2010. 6.

Ito M, Yokoi T, Sugita S, Shinohara N, Nishina S, Azuma N. Endogenous Candida chorioretinitis in a healthy infant. XXXIIth International Congress of Ophthalmology 2010. 6.

Yokoi T, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Azuma N. Risk factors for recurrent fibrovascular proliferation in aggressive posterior retinopathy of prematurity after early vitreous surgery. XXXIIth International Congress of Ophthalmology 2010. 6.

東 範行. 特別講演 未熟児網膜症の診断と治療. 大阪眼科集談会 2010. 3.

東 範行. 特別講演 未熟児網膜症の診断と治療. 日本医科大学眼科研究会 2010. 6.

東 範行. 特別講演 眼を作るシステムと視覚の成立. 第 66 回日本弱視斜視学会 2010. 7.

東 範行. 特別講演 未熟児網膜症の網膜剥離に対する治療. 第 13 回静岡網膜硝子体研究会 2010. 7.

東 範行. 特別講演 小児眼科のトピックス. 湘西眼科臨床フォーラム 2011 3.

東 範行. 特別講演 小児眼科のトピックス. 練馬区眼科医会講演会 2011 4.

東 範行. 特別講演 眼を作るシステムと視覚の成立. 群馬県眼科集談会 2011.5

東 範行. 特別講演 小児の眼底疾患の診かた・考えかた. 三重県小児眼科フォーラム 2011.6.

東 範行. 特別講演 小児眼底疾患のトピックス. 新宿眼科講演会 2011 7.

東 範行. 特別講演 小児の眼底疾患の診かた・考えかた. 鳥取県眼科フォーラム 2011.6.

東 範行. 特別講演 小児眼科のトピックス. 第 5 回北陸オフサルミックフォーラム 2011 10.

東 範行. 特別講演 小児の眼底疾患の診かた・考えかた. 広島県眼科集談会 2011.10.

東 範行. 特別講演 未熟児網膜症の診断と治療. あべの眼科セミナー 2011. 11.

東 範行. 特別講演 小児眼科のトピックス. 青森県眼科集談会 2011 11.

東 範行. シンポジウム 小児の病理 眼の発生と形成異常. 第 114 回日本眼科学会 2010. 4.

東 範行. シンポジウム 眼の形態形成遺伝子と再生医療 CIBA ビジョン シンポジウム第 114 回日本眼科学会 2011. 5.

東 範行. シンポジウム 網膜芽細胞腫の化学療法と放射線外照射による治療. 第 29 回眼腫瘍学会 2011. 6.

Yokoi T, Ui R, Ito, Nakayama Y, Nishina S, Azuma N. Analysis of retinal structure and function in eyes with foveal hypoplasia. Distinguished investigators' forum Distinguished investigators' forum 第 50 日本網膜硝子体学会 2011. 12.

東 範行. 講習会 小児眼底の広範な構造

と機能の検査. 第 64 回日本臨床眼科学会
2010. 11.

東 範行. 講習会 未熟児網膜症の管理.
第 64 回日本臨床眼科学会 2010. 11.

東 範行. 講習会 小児の眼底疾患の診か
た・考えかた. 東京都眼科医会講習会
2010.11.

東 範行. 講習会 小児眼底疾患のトピック
ス. 眼科アップデートセミナー 2011. 3.

東 範行. 講習会 未熟児網膜症の管理.
第 65 回日本臨床眼科学会 2011. 10.

東 範行. 講習会 小児の眼底疾患のトピッ
クス. 東京都眼科医会講習会 2011.11.

伊藤牧子, 田中三千子, 横井 匡, 小林百合,
野田英一郎, 仁科幸子, 東 範行. 小児眼底
の広範な構造と機能の検査. 第 35 回日本小
児眼科学会 2010. 6.

田中三千子, 伊藤牧子, 横井 匡, 野田英一郎,
小林百合, 仁科幸子, 東 範行. 検眼鏡的に
異常がない視力不良例に対する網膜電図検
査. 第 35 回日本小児眼科学会 2010. 6.

東 範行. 小児眼底の広範な構造と機能の検
査. Japan Macula Club 2010. 8.

仁科幸子, 西田保裕, 黒坂大次郎, 近藤寛之,
東 範行. 小眼球の全国統計. 第 64 回日本
臨床眼科学会 2010. 11.

田中三知子, 伊藤牧子, 横井匡, 小林百合,
仁科幸子, 東 範行. 小児の網膜疾患に対す
る全身麻酔下で局所と全視野の網膜電図所
見. 第 58 回日本臨床視覚電気生理学学会
2010. 10.

伊藤牧子, 田中三知子, 横井匡, 小林百合,
仁科幸子, 東 範行. 小児における全身麻酔
下での局所網膜電図検査. 第 58 回日本臨床
視覚電気生理学学会 2010. 10.

横井 匡, 伊藤牧子, 小林百合, 田中三知子,
仁科幸子, 杉田直, 望月學, 東 範行. 新型
インフルエンザによると思われる滲出性網
膜剥離の 1 例. 乳幼児被虐待症候群の眼底所
見とその予後. 第 49 日本網膜硝子体学会
2010. 12.

田中三知子, 伊藤牧子, 横井匡, 小林百合,
仁科幸子, 東 範行. 乳頭周囲ぶどう腫, 朝顔
症候群の黄斑の構造と機能. 第 49 日本網膜
硝子体学会 2010. 12.

東 範行. 先天網膜ひだに伴う裂孔原性網膜
剥離. 硝子体手術フォーラム 2011 2.

伊藤牧子, 小川学, 杉田直, 横井匡, 小林百
合, 仁科幸子, 東 範行. 乳児にみられたカン
ジダ眼内炎の 1 例. 第 36 回日本小児眼科学会
2011. 7.

小林百合, 伊藤牧子, 田中三知子, 横井匡, 仁
科幸子, 東 範行. 強膜内陥術の網膜牽引軽
減によって視力が向上した網膜ひだの 1 症例.
第 36 回日本小児眼科学会 2011. 7.

東 範行. 黄斑低形成の構造と機能. Japan
Macula Club 2011. 8.

東 範行, 不二門尚, 石橋達朗, 佐藤美保, 近
藤峰生, 大鹿哲郎, 黒坂大次郎, 永本敏之.
先天白内障の手術に関する全国調査. 第 65
回日本臨床眼科学会 2011. 10.

永本敏之, 東 範行, 不二門 尚, 石橋達朗,
佐藤美保, 近藤峰生, 大鹿哲郎, 黒坂大次郎.
全国調査結果による先天白内障に対する
IOL 挿入例と非挿入例の比較. 第 65 回日本
臨床眼科学会 2011. 10.

田中三知子, 黒坂大次郎, 不二門尚, 石橋達
朗, 佐藤美保, 近藤峰生, 大鹿哲郎, 永本敏之,
東 範行. 先天白内障における眼内レンズ二
次挿入に関する多施設アンケート調査. 第
65 回日本臨床眼科学会 2011. 10.

仁科幸子, 西田保裕, 黒坂大次郎, 近藤寛之,
東 範行. MRI による小眼球の検討. 第 65
回日本臨床眼科学会 2011. 10.

宇井理人, 伊藤牧子, 横井匡, 小林百合, 仁
科幸子, 東 範行. 家族性滲出性硝子体網膜
症に対するバックリング手術. 第 50 日本網
膜硝子体学会 2011. 12.

〔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

東 範行 (AZUMA NORIYUKI)

独) 国立成育医療研究センター・病院 眼科
医長; (研究所) 細胞医療研究室 室長

研究者番号：10159395

(2) 研究分担者

梅澤 明弘 (UMEZAWA AKIHIRO)

独) 国立成育医療研究センター (研究所)・
生殖・細胞医療研究部 部長

研究者番号：70213486

世古 裕子 (SEKO YUKO)

独) 国立成育医療研究センター (研究所)・
生殖・細胞医療研究部 共同研究員

研究者番号：60301157

(3) 連携研究者

()

研究者番号：