

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1日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究B

研究期間：2010～2011

課題番号：22791678

研究課題名（和文） 線維柱帯分化マーカーの同定とそれに基づくヒト iPS 細胞から
線維柱帯細胞の創出研究課題名（英文） The evaluation of the marker genes during the development of
trabecular meshwork cells and the induction of trabecular meshwork
cells from human iPS cells

研究代表者

上野 盛夫 (UENO MORIO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40426531

研究成果の概要（和文）：

原発開放隅角緑内障では線維柱帯細胞が減少していることより、線維柱帯細胞の細胞移植により房水流出主ルートの機能・構造再生することは原発開放隅角緑内障の根本的な治療となると考えられる。線維柱帯移植治療の細胞ソースとなることを最終目標に、線維柱帯細胞の *in vivo* での発生課程を分子マーカーレベルで解明し、その知見をもとに *in vitro* でヒト iPS 細胞からヒト線維柱帯細胞の分化誘導を行った。

研究成果の概要（英文）：

Transplantation of trabecular meshwork cells to the damaged trabecular meshwork tissues in patients of primary open angle glaucoma because one of causes of primary open angle glaucoma is the decrement of trabecular meshwork cells. In this study, we performed the development of the induction system of human trabecular meshwork cells from human induced pluripotent stem cells to mimic the *in vivo* development of trabecular meshwork tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：眼科学

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

1. 研究開始当初の背景

線維柱帯細胞の発生的起源については鳥類においては古くから神経堤細胞由来とされているが、哺乳類の線維柱帯細胞の発生学的起源についてはいまだ明らかではなかった。P0-promoter の下流で Cre recombinase を発現することで神経堤由来細胞を EGFP の発現により標識できる遺伝子改変マウスを用いて中脳領域の神経堤細胞の隅角組織への寄与が明らかにされていた。しかし

P0-promoter は早期の神経堤細胞を標識することはできないため線維柱帯細胞の分化過程の解明に用いる材料としては不十分であった。研究者はごく早期のマウス神経堤細胞に特異的に発現する遺伝子を同定し、これを抗原として抗体を作成したところ、見出した遺伝子が線維柱帯前駆細胞と考えられる中脳領域の神経堤細胞にごく早期に発現していることが明らかにしていた。さらにこの遺伝子の活性を GFP の活性に置き換えたノック

クインマウス ES 細胞を作成していた。このマウス ES 細胞を ES 細胞から中脳神経堤細胞を分化誘導する系で培養すると、中脳神経堤細胞が出現することが予想される時期に GFP を発現することが確認できていた。つまり研究開始当初に線維柱帯前駆細胞である中脳神経堤細胞特異的に GFP を発現するマウス ES 細胞を得ていた。

2. 研究の目的

眼圧は房水の産生とその流出抵抗により規定されている、房水の眼外への排出は主ルートとして隅角線維柱帯-シュレム管経路が、副ルートとしてぶどう膜-強膜路が司っており、ヒトではこの主ルートでの房水流出が全体の房水流出の 80%以上を占めている。主ルートの線維柱帯は前房とシュレム管を隔てている特殊な構造をした組織で、コラーゲンを中心とした細胞外マトリックスがビーム状の層状構造を構成し、その周囲は基底膜構成蛋白を境にして線維柱帯細胞が覆っている。前房水の線維柱帯での正常な通過は正常眼圧の維持に必須である。緑内障における眼圧上昇の成因は未だ明らかではないが、原発開放隅角緑内障では正常眼に比して線維柱帯間隙が狭小化し、線維柱帯細胞に被覆されていない露出したビーム構造が高頻度に観察される。このことは線維柱帯細胞の病的な減少が線維柱帯間隙の狭小化や癒合を促し、残された線維柱帯細胞が活性化して異常な細胞外マトリックスを産生し、線維柱帯間隙のさらなる狭小化を惹起し、房水流出抵抗の増加をきたす可能性が示唆している。現在、エビデンスとして視神経障害を抑制できる緑内障治療法は眼圧下降療法のみである。眼圧下降療法には房水産生抑制によるもの、およびぶどう膜-強膜路に代表される房水流出系の賦活化によるものが一般的であるが、最大の房水流出抵抗を有する線維柱帯経路を賦活化する治療法ははまだ臨床応用されていない。Rho キナーゼ阻害剤による線維柱帯経路の賦活化が臨床応用に近づいているが、薬物による賦活化は永続的なものではなく、薬物の反復投与が必要となる。一方、線維柱帯細胞の細胞移植により房水流出主ルートの機能・構造再生することは原発開放隅角緑内障の根本的な治療となる。その細胞移植材料としては当然ヒト線維柱帯細胞を用いる。しかしわが国の臓器移植法ではドナー眼組織を角膜移植および強膜移植以外に用いることは不可能である。その有力な解決策として、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から線維柱帯細胞を分化誘導して線維柱帯移植治療の細胞ソースとして用いることである。真に臨床応用可能な線維柱帯細胞をヒト iPS 細胞から分化誘導するには、その誘導方法が個体発生の過程を再現していることが前提である。そこで本研究課題ではまず個

体発生の解析が可能なマウス由来の胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いて線維柱帯細胞の分化誘導法を開発すした。iPS 細胞と ES 細胞はどちらも多能性幹細胞に属し、その性質はほぼ同等とされている。

本研究の目的は、①in vivo における線維柱帯細胞の分化過程を詳細に検討し線維柱帯細胞分化マーカーを同定することと、②それらのマーカーを指標に in vitro でヒト iPS 細胞から線維柱帯細胞を分化誘導して将来的な線維柱帯細胞移植へつなげることである。

3. 研究の方法

(1) 神経堤細胞由来組織を不可逆的に蛍光標識する遺伝子改変マウスを用いた線維柱帯細胞およびその前駆細胞に発現している分子マーカーの同定

研究開始当初に得ていた線維柱帯前駆細胞である中脳神経堤細胞特異的に GFP を発現するマウス ES 細胞を用いてキメラマウスを作成した。このマウスにより中脳神経堤細胞から線維柱帯細胞への分化過程を詳細に追跡することが可能となった。まずこの遺伝子改変マウスが、神経堤細胞由来組織を選択的に標識することを確認した。さらに胎生 8.5 日に中脳神経堤細胞が誘導され、遊走した中脳神経堤細胞が胎生 12.5 日には眼周囲に集積し、出生後 11~14 日目には GFP を発現した線維柱帯細胞が出現する過程を確認した。次にこの遺伝子改変マウスの胎生 8.5 日目から出生後 12 日目まで 72 時間ごとのステージの胚または新生仔を用いる。中脳領域から眼にかけての組織をトリプシン処理で細胞レベルに分離した後に flowcytometry を用いて GFP 陽性分画を集積することにより線維柱帯細胞へ分化途上の細胞を得た。さらに野生型マウス成体より線維柱帯細胞を摘出した。線維柱帯はシート状に摘出可能なため他の細胞成分の混入は無かった。それぞれの細胞より型どおりに RNA 抽出、cDNA 作成を行い、DNA マイクロアレイを用いて中脳神経堤細胞から線維柱帯細胞にいたるまでの分化過程における遺伝子発現プロファイルを得た。既知の遺伝子発現データベースと比較し線維柱帯細胞またはその前駆細胞に特異的に発現している分子マーカーを同定した。

(2) in vivo での分子マーカーの発現をもとにした in vitro でのマウス ES 細胞から線維柱帯細胞へ分化誘導法の樹立

線維柱帯前駆細胞と考えられる中脳領域の神経堤細胞にごく早期に発現している転写因子の活性を GFP の活性に置き換えたノックイン ES 細胞を用いて研究を行った。この細胞は in vitro で神経堤細胞へ分化誘導すると GFP を発現することが確認されており、またこの GFP の発現が、真に in vivo での中脳神経堤細胞でのこの転写因子の活性と一致したことはこのノックイン ES 細胞から作成した

キメラマウスの胎生 8.5 日胚で中脳神経堤細胞が特異的に GFP 発現をすることで確認できた。つまりノックイン ES 細胞は線維柱帯前駆細胞である中脳神経堤細胞特異的に GFP を発現していた。

研究者らが開発した ES 細胞から中脳神経堤細胞の分化誘導系と、無血清かつフィーダー細胞に依存しない分化誘導系の ES 細胞に対する活性がほぼ同等であることを利用し、無血清かつフィーダー細胞に依存しない分化誘導系を用いて *in vitro* でマウス ES 細胞から中脳神経堤細胞の分化誘導研究を行った。マウス ES 細胞は *in vivo* では胚盤胞内の内部細胞塊 (胎生 3.5 日目) に相当すると考えると、中脳神経堤細胞が誘導されるのは胎生 8.5 日目であるので、ES 細胞を申請者の開発した分化誘導条件を一部改変した条件で 5 日間培養すると GFP 陽性の中脳神経堤細胞が誘導されてくると考えた。具体的にはまずヒト羊膜マトリックスを培養基質として、マウス ES 細胞を特殊な無血清培地中で 5 日間培養すると中脳領域の神経前駆細胞が選択的に分化誘導される。この中脳領域の神経前駆細胞に神経発生中期には神経背側化因子として作用する骨形成因子 (Bone Morphogenetic Protein: BMP) を 0.5nM の濃度で作用させると中脳領域神経前駆細胞は中脳領域神経堤細胞に分化した。

次に flowcytometry を用いて GFP 陽性細胞の検出およびソーティングを行いマウス ES 細胞由来中脳神経堤細胞を得た。(1) で得た遺伝子発現情報をもとに分子マーカーを選び、マウス ES 細胞由来中脳神経堤細胞をそれらの分子マーカーが発現するように線維柱帯細胞へ最終分化させる条件をスクリーニングした。

4. 研究成果

研究代表者は研究開始当初までに線維柱帯前駆細胞と考えられる中脳領域の神経堤細胞にごく早期に発現している転写因子の活性を GFP の活性に置き換えたノックイン ES 細胞を作成していた。まずこのノックイン ES 細胞からキメラマウスを作成することに成功した。作成したキメラマウスの胎生 8.5 日座で中脳神経堤細胞特異的に GFP の発現を認め、ノックイン ES 細胞が線維柱帯前駆細胞である中脳神経堤細胞を特異的にマーキング出来ていることを確認できた。また、個体内のほぼ全ての中脳神経堤由来組織に GFP を発現するノックインマウスの作成にも成功した。このノックインマウスを用いた線維柱帯細胞およびその前駆細胞に発現している分子マーカーの同定に関しては、個体発生の段階毎の線維柱帯前駆細胞を収集し RNA 抽出・cDNA 作成を行った。

また ES 細胞から線維柱帯細胞への分化誘

導系の最適化を行ったまづ、マウス ES 細胞から中脳領域神経堤細胞への分化誘導系の効率化を行った。次いで線維柱帯細胞移植治療の細胞ソースとなることを最終目標に、*in vitro* でヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) からヒト線維柱帯細胞の分化誘導研究を実施した。ヒト iPS 細胞の維持培養法としては分化誘導開始前の他家動物由来物質の持ち込みを最小限にするためにマウス胎仔由来線維芽細胞をフィーダー細胞として用いる従来の方法ではなく、ヒト絨毛膜細胞由来マトリックスを培養基質として、無血清培地を用いた維持培養法を用いた。分化誘導としてはヒト羊膜マトリックスを培養基質として、ヒト iPS 細胞を特殊な無血清培地中で 15 日間培養して中脳領域の神経前駆細胞が選択的に分化誘導した後に、中脳領域の神経前駆細胞に骨形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Protein) を作用させて中脳領域神経堤細胞を分化誘導した。ここで得たヒト iPS 細胞由来中脳神経堤細胞のヒト線維柱帯細胞へ最終分化を試みた。さらに最終分化したヒト iPS 細胞由来細胞の構成成分の明らかな無血清培地を用いた維持培養も実施した。ヒト iPS 細胞由来中脳神経堤細胞からヒト線維柱帯細胞へ最終分化には 100 日以上での分化誘導培養が必要であり、分化誘導された細胞の最終的な特性解析には至っていない。また最終分化した細胞群は無血清培地中で増殖可能であった。

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 4 件)

1. Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, Aramaki T, Nishiyama A, Muguruma K, Nakano T, Suga H, Ueno M, Ishizaki T, Suemori H, Narumiya S, Niwa H, Sasai Y. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010; 7(2): 225-39.
2. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Hirata K, Torii R, Hamuro J, Kinoshita S. Enhancement of corneal endothelium wound healing by Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor eye drops. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95(7): 1006-9
3. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Hamuro J, Kinoshita S. The new therapeutic concept of using a rho kinase inhibitor for the treatment of corneal endothelial dysfunction. *Cornea*. 2011: S54-9

4. Nakano M, Ikeda Y, Tokuda Y, Fuwa M, Omi N, Ueno M, Imai K, Adachi H, Kageyama M, Mori K, Kinoshita S, Tashiro K. Common variants in CDKN2B-AS1 associated with optic-nerve vulnerability of glaucoma identified by genome-wide association studies in Japanese. PLoS One. 2012; 7(3):e33389.

〔学会発表〕（計 1 1 件）

1. Ueno M, Nakai Y, Matsumura M, Takahashi M, Sasai Y, Kinoshita S. Induction of ocular tissues from human pluripotent stem cells on the amniotic membrane matrix. 2010 annual meeting of the ARVO, 2010.5.4. Fort Lauderdale.
2. Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Imai K, Yagi T, Omi N, Tokuda Y, Fuwa M, Tashiro K, Kinoshita S. Association between general systemic disease and the marker SNPs for primary open angle glaucoma. 2010 annual meeting of the ARVO, 2010.5.3. Fort Lauderdale.
3. Mori K, Tanaka H, Koizumi H, Ueno M, Ikeda Y, Imai K, Kinoshita S. Choroidal thickness evaluation accompanied by intraocular pressure change using enhanced depth imaging optical coherence tomography. 2010 annual meeting of the ARVO, 2010.5.4. Fort Lauderdale.
4. Takahashi H, Koizumi N, Okumura N, Ueno M, Sakamoto Y, Hamuro J, Kinoshita S. The efficacy of a ROCK inhibitor containing corneal storage medium for corneal endothelial cells. 2010 annual meeting of the ARVO, 2010.5.4. Fort Lauderdale.
5. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Hirata K, Hamuro J, Kinoshita S. The effect of a ROCK inhibitor on corneal endothelial cell migration in an vitro wound-healing model. 2010 annual meeting of the ARVO, 2010.5.4. Fort Lauderdale.
6. Koizumi N, Okumura N, Takahashi H, Ueno M, Sakamoto Y, Hirata K, Hamuro J, Kinoshita S. Cell injection therapy using cultivated corneal endothelial cells combined with a ROCK inhibitor in a rabbit model. 2010 annual meeting of the ARVO, 2010.5.5. Fort Lauderdale.
7. Imai K, Mori K, Ueno M, Ikeda Y, Kawasaki S, Yagi T, Omi N, Fuwa M, Tashiro K, Kinoshita S. The Rs16958477 SNP in the promoter region of the LOXL1 gene is associated with the LOXL1 gene expression level. 2010 annual meeting of

- the ARVO, 2010.5.5. Fort Lauderdale.
8. Yamamoto M, Okumura N, Takahashi H, Ueno M, Sakamoto Y, Liles M, Young RD, Quantock AJ, Kinoshita S, Koizumi N. The effect of a ROCK inhibitor on corneal wound and the transformation of keratocytes. BSMB autumn meeting 2010, 2010.9.6. Norwich.
9. Ueno M. Neural induction from embryonic stem cells. Cornea to cortex research meeting, 2010.10.20. Cardiff
10. Ueno M, Nakai Y, Matsumura M, Sasai Y, Kinoshita S. Induction of ocular tissues from human-induced pluripotent stem cells on the amniotic membrane matrix. 2011 annual meeting of the ARVO, 2011.5.3. Fort Lauderdale.
11. Nakai Y, Ueno M, Matsumura M, Sasai Y, Kinoshita S. Induction of corneal epithelial cells from human embryonic stem cells on the amniotic membrane matrix. 2011 annual meeting of the ARVO, 2011.5.1. Fort Lauderdale.

〔図書〕（計 2 件）

1. 上野盛夫, 池田陽子, 分光堂, 眼のサイエンス眼疾患の謎, 2010, 278
2. 上野盛夫, 池田陽子, 中山書店, 専門医のための眼科臨床クオリファイ緑内障診療ガイド, 2010, 273

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 盛夫 (UENO MORIO)
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：4 0 4 2 6 5 3 1

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし