

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791689

研究課題名(和文) ヒト iPS 細胞からの網膜神経節細胞の分化誘導系の確立ならびに緑内障の病態解明

研究課題名(英文) Establishment of efficient differentiation method of retinal ganglion cells from human iPS cells.

研究代表者

結城 賢弥 (YUKI KENYA)

慶應義塾大学・医学部・助教(非常勤)

研究者番号：00365347

研究成果の概要(和文)：

Rax(retina and anterior neural fold homeobox)promotor下にDsRed-neo cassetteを挿入したプラスミドを作成した。続いて相同組み換えを用いてBACクローンにリコンビナントプラスミドを導入した。同BACクローンをelectroporationを用いてmiPS細胞に導入した。(以後RxDsRed-miPSとする)。RxDsRed-miPSをOsakada (Osakada F, Ikeda H, Sasai Y, Takahashi M. Nat Protoc. 2009;4(6):811-24.)らの方法 (serum free embryoid body+Dkk-1/LeftyA/FBS/activin) を用いて網膜前駆細胞へと分化誘導をおこなった。既報どおりにday9にて、蛍光の弱いものを含めれば20ライン中、全ラインでDsRed陽性細胞を検出することができた。続いて、フローサイトメトリーにてRxDsRed陽性細胞のソートを行った。ソートによりRaxDsRed陽性細胞集団を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：

[Purpose]

To investigate the efficient way collecting Rx-positive Retinal progenitor cell by FACS.

[Method]

We used mouse iPS (miPS) cells which was inserted Nanog-GFP-IRES-Puro reporter construct. The GFP was negative when the iPS cell when it was induced differentiation. (Okita, Yamanaka et al. Nature 2007). A Bacterial artificial chromosome (BAC) clone containing the mouse *Rax* gene in its center was isolated. By using the recombination technique, we inserted a DsRed-Neo cassette into the 5' UTR of the mouse *Rax* gene. We introduced the modified BAC into miPS cells by electroporation. Mice iPS cells were dissociated to single cells, and 5×10^4 cells per 1 ml differentiation medium (see ref) were seeded into bacterial-grade dishes (10ml). miPS aggregates were generated spontaneously in a suspension culture within 1d. Medium was changed on day 3. Dkk1(100 ng/ml) LeftyA(500 ng/ml), 5%FBS and activin-A were added to the differentiation medium. (Osakada, Takahashi et al et al Nature Protocol)

[Results]

Rx-DsRED positive cells were observed in embryoid body after 9 day in the SFEB/DLFA culture. Rx-DsRed+ mouse iPS cells are selected by flow cytometry. After flow cytometry, RxDsRed positive cells were observed only in the Ds-Red section by Imager.

[Conclision]

By using flowcytometry, we obtain Rx-DsRed positive cells, which are thought to be retinal progenitor cells.

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：

科研費の分科・細目：

キーワード：

iPS細胞、緑内障、retina homeobox gene、網膜神経節細胞

1. 研究開始当初の背景

1)疾患としての緑内障の重要性

日本人の失明原因に関して、厚生省により行われた2002年の調査では1位が緑内障、2位が糖尿病網膜症となっており、緑内障が日本人の失明原因のトップとなっている。2002年に行われた多治見スタディでは日本人の40歳以上の17人に1人が緑内障に罹患しており、その90%が無治療であるということが明らかになった (Iwase A, et al. the Tajimi Study. Ophthalmology 2004)。緑内障による視野障害、視力障害は現在のところ不可逆であり、その治療法の解明は急務となっている。

2)緑内障の病態生理は未だ明らかでない。

緑内障の定義によれば、緑内障は眼圧を下降させることにより、その進行を遅らせることができる疾患と考えられる。しかし、多治見スタディの結果では原発開放隅角緑内障の90%の患者の眼圧が正常範囲内であった。臨床においても眼圧を10mmHg程度と正常下限まで十分に下降させても視野障害が進行する症例があるのも事実である。我々は緑内障の病態の本態を解明し、眼圧下降治療に抵抗して進行する緑内障に対する神経保護効果を有する新しい治療薬を必要としている。

3)ヒト網膜神経節細胞の vitro の系の確立の重要性

緑内障の病態である網膜神経節細胞死に関しては、未だ不明な点が多い。旧来の in vitro の網膜神経節細胞の培養系は主にマウスやラットの網膜の初代培養を panning により採取する方法のみである。しかし網膜が大量に必要なため、マクロファージなども同時に回収される可能性がある、手技が煩雑である等の問題点があった。また本法を施行するためにヒト網膜を入手することは不可能に近い。ヒト iPS 細胞からの効率的な網膜神経節細胞の分化誘導法を確立する事は、緑内障研究に著明な進展をもたらす事は容易に想像しえる。

2. 研究の目的

iPS細胞からの網膜神経節細胞の分化誘導法を確立する事を目的としている。

3. 研究の方法

1)Rax(retina and anterior neural fold homeobox)geneはSix3の次にeye fieldに発現する遺伝子であり、Rax陽性Pax6陽性細胞は網膜前駆細胞ということが出来る。iPS細胞と類似の性質を持つES細胞からは、Lambaらの方法で網膜前駆細胞を82±23%の割合で生じたとされる。promoter Rax-DsRedを導入、分化誘導し、FACSによ

り回収することで、網膜前駆細胞をほぼ100%回収することを可能にする。そのため、コンストラクト (Raxpromotor-DsRed) を作成する。

2) 網膜への分化誘導法としては Osakada らの方法を用いる。promoter Rax-DsRed を導入した iPS 細胞を分化誘導し、FACS で回収した後に再度培養し、より高頻度・選択的に網膜細胞を得る。

4. 研究成果

1) BAC クローンを作製した。

Rax(retina and anterior neural fold homeobox)promotor 下に DsRed-neo cassette を挿入したプラスミドを作成した。続いて相同組み換えを用いて BAC クローンにリコンビナントプラスミドを導入した。(図 1)

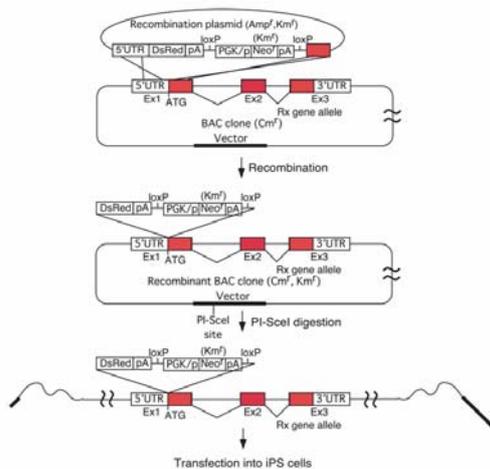


図 1

2) SFEB/DLFA 法を用いて miPS 細胞の分化誘導を行った。SFEB 法により EB 形成が見られた。(図 2a:1 日目, b:3 日目, c:5 日目, d:9 日目)

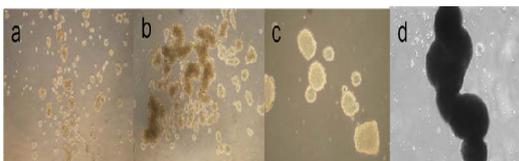
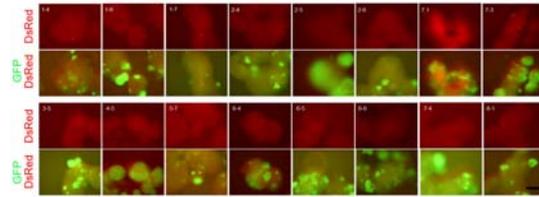
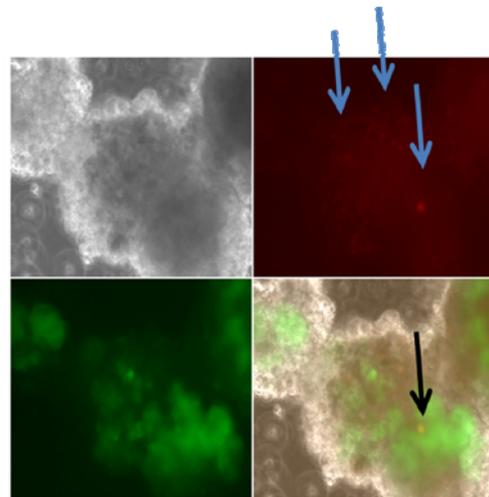


図 2

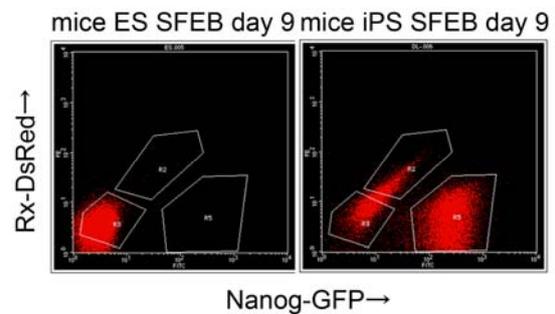
3) BAC クローンを遺伝子導入した miPS 細胞を 20 ライン作製した。Rx-DsRed 陽性細胞は、細胞数の多少はあるものの全ラインで観察することが可能であった



拡大図: Rx-DsRed 陽性細胞と Nanog-GFP 陽性細胞が観察される。



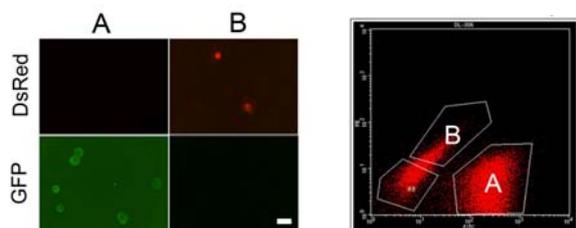
4) FACS により Rx-DsRED 陽性細胞を分離した。RxDsRed 陽性細胞を含む EB を single cell とし、FACS にてソートした。その結果、Nanog-GFP 陽性細胞群と Rx-DsRed 陽性細胞群とに分離可能であった。(図 4)



5) RxDsRed 陽性細胞群には Nanog-GFP 陽性細胞は含まれていなかった。

分画 A には Nanog-GFP 陽性細胞のみが、分画

BにはRx-DsRed陽性細胞のみが含まれており、Rx-DsRed陽性細胞な網膜前駆細胞と思われる細胞の回収が可能であった。



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 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

- ① Isolation of Retinal Progenitor Cells Derived From Mouse iPS Cells Transfected With A Promoter-Rx-DsRed
Kenya Yuki, Yoko Ozawa, Tetsu Yoshida, Kazuo Tsubota, Hideyuki Okano
The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting. Fort Lauderdale, FL, USA, 2011/5/1-5/5

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

結城 賢弥 (Yuki Kenya)

慶應義塾大学・医学部・助教 (非常勤)

研究者番号 : 00365347