

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592688

研究課題名(和文) マウス網膜変性モデルの異なる病期におけるシート網膜移植及び細胞移植の比較検討

研究課題名(英文) Evaluation of ES/iPS-retinal sheet transplantation in reference to retinal cell transplantation in mouse retinal degeneration model

研究代表者

万代 道子 (Mandai, Michiko)

独立行政法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・副プロジェクトリーダー

研究者番号：80263086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Nrl-GFP マウス由来iPS細胞及びRx-GFP ES細胞より効率よく再現性をもって自己組織化培養による網膜分化方法を確立した。これらを変性モデルマウスに移植したところ、分化17日例より若い分化段階の移植片がより効率よく視細胞の層構造を形成しホストに生着することを確認した。またこれらの層構造を形成した移植片では成熟した視細胞に特徴的な外節構造が形成されていることを電子顕微鏡的に観察した。またこれらのサンプルにおいて、免疫組織学的に、移植片内の視細胞とホスト網膜の2次ニューロンである双極細胞が、シナプスを形成している可能性も示唆された。生理学的及び行動解析による機能検証を引き続き行っている。

研究成果の概要(英文)：We developed a protocol to consistently and efficiently differentiate 3D-retina by self-organization from nrl-GFP miPS cell and rx-GFP mES cell lines. We observed that the differentiated retinal tissue of dd17 or younger can efficiently developed structured photoreceptor layer (or outer nuclear layer, ONL) after transplantation and integrate onto the inner layer of host retina. Photoreceptors in these structured ONL showed a mature photoreceptor marker and, by electron microscopic observation, developed a characteristic component of photoreceptors, outer segments. Furthermore, synaptic contact between host bipolar cells and graft photoreceptor cells were also suggested by immune-histochemistry. Functional studies by electrophysiology and behavior test are currently underway.

研究分野：医歯薬学

キーワード：網膜変性 移植治療 ES細胞 立体分化培養 網膜シート移植

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は変性網膜における視細胞移植について、生着を左右するホストの環境因子について研究してきた。近年になり、成体の網膜であっても適切名発生時期の視細胞であれば機能的に生着しうることが報告され、また、ES 細胞から自己組織化培養法を用いて構造をもった網膜組織を分化誘導できるようになり、臨床応用への突破口が開けた。そこで我々は本研究において、さらに視細胞の移植治療を臨床段階にすすめるべく、適切な移植条件について主に移植片の準備の観点から検討を行った。

2. 研究の目的

変性網膜に対する視細胞移植の適切な移植片の準備として、ES 及び iPS 細胞からの分化方法を適切化し、移植に適した分化網膜の発生段階を決定する。細胞移植とシート移植についてその結果を比較する。また、生着した移植片の移植後の分化状態、シナプス形成能を評価し、機能解析を試みる

3. 研究の方法

まず、ES 細胞複数株、および iPS 細胞からも同様に効率よく網膜組織を分化誘導する方法を検討する。同時にマウス胎児及び生後網膜を用いて、シート移植、細胞移植を行い、比較する。得られた結果を参考に、分化網膜組織からバラ細胞、またはシート状移植片を用意し、分化段階を変えて移植することにより、その生着を評価する。移植後網膜組織の分化成熟度をまずマーカー染色で評価する。必要に応じ電子顕微鏡観察を行う。また、ホストへの生着パターンを検討する。

さらにその結果から、より生着の用意条件で、ホストとのシナプス形成の可能性、及び機能についてさらに詳細に評価する。

4. 研究成果

AGN 及びマトリゲルを用いて、マウス位 iPS、ES 細胞両方からの効率良い分化方法を確立した。

マウスの胎児網膜及び生後網膜を用いて、細胞移植に比べシート移植でより移植後網膜が構造的に維持されること、またシートとして移植しても、細胞移植同様、細胞がホスト網膜に入り込んでいく現象も観察され、以後の検討はシート組織で行うこととした。

次に移植細胞の分化段階をかえて変性モデルマウスに移植を行い、最終的な移植片の成熟と形態を評価したところ、分化 17 日齢以前の分化組織の移植でより効率よく構造をもった視細胞が成熟、生着することを観察した。一方それ以上の分化段階の移植変は視細胞への成熟はみられてもしばしば層構造は形成せず、バラ細胞の移植と同じような像を呈した。またこれらの層構造を形成して成熟した視細胞においては、電子顕微鏡観察においても成熟した外節構造の形成を確認し、生体内の視細胞とほぼ遜色ないかたちで移植後に生着していると考えられた。このような形態学的な成熟は、細胞移植ではみられないものであった。

次に、一番正常網膜の状態に近い、移植片視細胞層とホスト内層が隣接して生着する「direct contact pattern」についてさらに詳細に検討した。このかたちで移植片が生着する効率はやはり分化 17 日令より若い移植片で多く、免疫組織染色後組織を透明化し立体的な解析を行ったところ、移植視細胞末端の前シナプスマーカー(ribeye)とホスト双極細胞軸索末端が共存する像がみられ、組織学的にホストグラフト間でシナプスが形成されている可能性が示唆された。また、細胞移植では半年以内に移植片が消失するという欠点があったが、シート移植においては 1 年近い観察においても

移植片生着が確認された。

さらに、機能検証として、これら移植後網膜をとりだし、多電極アレイシステムで解析を行った。移植後網膜では光応答性に網膜全体での反応(mERG)が得られた。さらにホストガングリオン細胞層からも光応答性に活動電位を拾うことができたが、これが本当にシナプス形成後のホスト細胞に由来する反応かどうかをさらに現在検証中である。

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 3 件)

1. Sun J, Mandai M, Kamao H, Hashiguchi T, Shikamura M, Kawamata S, Sugita S, Takahashi M.

Protective effects of human iPS-derived retinal pigmented epithelial cells in comparison with human mesenchymal stromal cells and human neural stem cells on the degenerating retina in rd1 mice. Stem Cells_2015 Feb 28.

Doi: 10.1002/stem.1960.

(査読：有)

2. Juthaporn Assawachananont, Michiko Mandai, Satoshi Okamoto, Chikako Yamada, Mototsugu Eiraku, Shigenobu Yonemura, Yoshiki Sasai, Masayo Takahashi.

Transplantation of Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cell-Derived 3D Retinal Sheets into Retinal Degenerative Mice. Stem Cell Reports

2(5):662-674,2014 (査読：有)

3. Homma K, Okamoto S, Mandai M, Gotoh N, Rajasimha HK, Chang YS,

Chen S, Li W, Cogliati T, Swaroop A, Takahashi M.

Developing Rods Transplanted into the Degenerating Retina of Crx-knockout Mice Exhibit Neural Activity Similar to Native Photoreceptors.

Stem Cells 31:1149-59, 2013

(査読：有)

[学会発表](計 8 件)

1. Michiko Mandai
Regeneration therapy for retinal Degeneration.
Asia-ARVO
2015.2.19 Yokohama, Japan
2. Michiko Mandai
Retinal regeneration therapy for retinal degeneration using ES/iPS derived retinal tissue.
Asia-ARVO
2015.2.18 Yokohama, Japan
3. 万代道子
iPS 細胞由来細胞/組織を用いた網膜再生医療
第 87 回日本生化学会大会 2014.10.17 京都
4. Juthaporn Assawachananont, Michiko Mandai, Satoshi Okamoto, Jun Kaneko, Chikako Yamada, Mototsugu Eiraku, Shigenobu Yonemura, Yoshiki Sasai, Masayo Takahashi.
Differentiation and transplantation of mouse ESC-and iPSC-derived retina-like sheets in retinal degeneration mouse.
ARVO2013 2013.5.5-9
Seattle, Washington. U.S.A
5. Jun Kaneko, Michiko Mandai, Masayo Takahashi.
Light-evoked Response Recordings from Degerating Mouse Retina: Effect of Valproic Acid Application on Spontaneous Activity.
ARVO2013 2013.5.5-9
Seattle, Washington. U.S.A
6. 万代道子
網膜変性マウスに対する ES/iPS 細胞由来細胞網膜の移植治療
第 66 回日本臨床眼科学会 (招聘講演)
2012.10.25 京都

7. Jun Kaneko, Michiko Mandai,
Juthaporn Assawachananont, Satoshi
Okamoto, Mototsugu Eiraku, Yoshiki
Sasai, Masayo Takahashi
Electrophysiological Evaluation of
Mouse ES and iPS Derived Retina-like
Sheet Transplantation in Retinal
Degeneration Mouse
ARVO2012 2012. 05.08
Fort Lauderdale, Fl. U.S.A

8. Juthaporn Assawachananont, Michiko
Mandai, Satoshi Okamoto, Jun
Kaneko, Mototsugu Eiraku, Yoshiki
Sasai, Masayo Takahashi
Differentiation and Transplantation of
Mouse ES and iPS Derived Retina-like
Sheets in Retinal Degeneration Mouse
(rd1)
ARVO2012 2012. 05.07
Fort Lauderdale, Fl. U.S.A

〔図書〕(計 9 件)

1. 万代道子
日本の眼科「網膜再生治療の現在と未来」
日本眼科学会 2015
2. 万代道子
実験医学「末期網膜変性モデルに対する
ES/iPS 細胞由来網膜シート移植による
再生治療」
羊土社 2015
3. 万代道子
医学のあゆみ「末期網膜変性に対する
ES/iPS 細胞由来網膜シート移植」
医歯薬出版 2015
4. 万代道子
実験医学増刊号「再生医療 2015」
羊土社 2015
5. 万代道子
再生医療用語ハンドブック「網膜再生
羊膜」
メディカルトリビューン 2015
6. 万代道子
再生医療技術の最前線「網膜の再生医療」
ジーエムシー出版 2013
7. 万代道子
再生医療 上皮感覚器「神経網膜の再生」
朝倉書店 2013
8. 万代道子
臨床眼科「ES 細胞、iPS 細胞による網膜

の再生」
医学書院 2013

9. 万代道子
日本医師会雑誌「網膜の再生医療」
日本医師会 2013

〔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
独立行政法人理化学研究所
http://www.cdb.riken.jp/jp/02_research/0202_creative23.html
網膜再生医療研究開発プロジェクト
<http://retinastem.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
万代 道子(MANDAI MICHIKO)
独立行政法人理化学研究所・多細胞システ
ム形成研究センター・副プロジェクトリー
ダー 研究者番号: 80263086

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者

高橋 政代(TAKAHASHI MASAYO)
独立行政法人理化学研究所・多細胞システ
ム形成研究センター・プロジェクトリー
ダー 研究者番号: 80252443