

平成30年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25253093

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた緑内障等メカノストレス性眼疾患の病態解明と治療開発

研究課題名(英文) Elucidation of the pathophysiology and therapeutic development of mechano-stress associated eye diseases such as glaucoma using iPS cells

研究代表者

西田 幸二 (Nishida, Kohji)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40244610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,500,000円

研究成果の概要(和文)：我が国における後天性失明原因の第1位を占める慢性視神経障害疾患、緑内障とアストロサイトとの関連性を検討した。マウス初代乳頭アストロサイトの伸展刺激負荷および高眼圧モデルマウスにおいてreactiveアストロサイトを示唆する形態学的変化を観察することができた。さらにマウスES細胞から乳頭アストロサイトの効率の良い分化誘導に成功したが、分離には至らなかった。一方で全眼球再生をSEAMという方法で完成した。今後、緑内障患者のゲノムから得られた遺伝子変異をもとに疾患特異的iPS細胞からアストロサイトを作製し緑内障における発症メカニズムの解明や新規治療法の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship between chronic optic neuropathy disease, glaucoma, and astrocytes, which accounts for the first cause of acquired blindness in our country. Morphological changes suggesting reactive astrocytes could be observed in stretching stimulus loading on mouse primary optic nerve head astrocytes and laser induced ocular hypertensive model mice. Furthermore, we successfully induced efficient differentiation of optic nerve head astrocytes from mouse ES cells, but it did not lead to separation. On the other hand, whole eye regeneration was completed by the method called SEAM. In future, we aim to develop astrocytes from disease-specific iPS cells based on genetic mutations obtained from the genome of glaucoma patients, aiming to elucidate the mechanism of onset in glaucoma and development of novel therapeutic methods.

研究分野：再生医療

キーワード：緑内障 再生 SEAM ゲノム アストロサイト AQP 接着分子

1. 研究開始当初の背景

緑内障は視神経乳頭の中でも篩状板が最初に障害を受ける視神経障害疾患である。篩状板には視神経を取り囲むようにアストロサイトが多数存在している。中枢神経では神経と血管、さらにグリア細胞であるアストロサイトが neurovascular unit という単位を構成し互いに伝達し合うことで機能するという概念がある。この概念に基づいて、今までは神経の支持組織として思われていたアストロサイトが、刺激に対して神経保護因子を分泌するなど神経に対し機能的に重要な働きをしていることが報告されており、パーキンソン病やアルツハイマー病との関連が示唆されている。しかし同じく慢性視神経障害疾患である緑内障において視神経乳頭内の neurovascular unit に関しては現時点では証明されていない。一方、緑内障は眼圧というメカノストレスに対する視神経乳頭の応答ととらえることができ、その応答の一つとしてアストロサイトの反応が重要である。In vitro において、圧負荷によりアストロサイトが活性化され増殖、遊走、変形する reactive アストロサイトという状態になること、またヒトの緑内障眼においても乳頭アストロサイトの増殖が報告されており、これが緑内障視神経症発生機序である可能性が示唆されているがはっきりとした証明はいまだされていない。

2. 研究の目的

緑内障の発症にアストロサイトが関与しているのかを調べるため、まず遺伝改変が容易なマウスを用いて、伸展刺激あるいは高眼圧負荷による乳頭アストロサイトの形態学的変化を in vitro, in vivo 両方で観察する。また ES 細胞や iPS 細胞からの乳頭アストロサイトの誘導を試み、緑内障患者から関連性を見出された遺伝子変異を導入した iPS 細胞、または緑内障患者から作成される疾患特異的 iPS 細胞から誘導したアストロサイトの表現型の違いを観察することで遺伝学的背景が緑内障における発症メカニズムに関わる仕組みの解明や新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

1) マウス視神経乳頭アストロサイトの単離培養および機能解析

ヒトの乳頭アストロサイト培養法およびラットの視神経アストロサイト培養法の既報を応用し、生後1日齢の C57BL6J マウスの乳頭からアストロサイトを単離培養した。コンフルエントになった時点で免疫細胞染色およびフローサイトメトリーを行い、アストロサイトマーカーである GFAP を用いて GFAP 陽性細胞の割合を解析した。

次に機能解析として神経伝達物質である ATP 刺激による細胞内 Ca 応答を Ca imaging を用いて観察した。

さらにアストロサイトに対するメカノス

トレスとして周期、持続時間、伸展率が変更可能な伸展刺激装置およびチャンバーを開発し、伸展刺激後のアストロサイトの形態的变化と細胞内カルシウム濃度変化を観察した。

2) 高眼圧モデルマウスにおけるアストロサイトおよび接着分子の観察

C57BL6J マウスに対して麻酔下で角膜輪部および上強膜静脈にダイオードレーザーを照射し急性高眼圧モデルマウスを作製した。

レーザー照射後 3、5 日後のアストロサイトおよび網膜内接着分子 Necl (Nectin like protein) の変化について免疫組織染色法を用いて観察した。

3) マウス乳頭アストロサイト特異的マーカーの探索

ラットではアストロサイトは神経管の背側から発生すると言われている。視神経に存在する type1 アストロサイトは眼茎の神経上皮細胞が由来で E16 に発生し、その後、出生時の E21 にオリゴデンドロサイトが、出生後 2 週齢に乳頭に存在する type2 アストロサイトが発生すると報告されている。乳頭アストロサイト特異的マーカーについては、かつて示されていなかった。しかし近年、ラットにおいて AQP4 が網膜、視神経アストロサイトに発現する一方で AQP9 は網膜、視神経に加え乳頭アストロサイトにも発現していることが報告された (Naka M, 2010)。さらに AQP は神経活動に必要なイオンや水交換の役割を持ち恒常性維持に重要であると考えられている。その中で AQP9 は、水だけでなく乳酸やグリセロールなどを通すアクアグリセロポリンであり、圧負荷により発現が低下し緑内障と関連することが報告されている。

そこで我々は初代培養マウス乳頭アストロサイトにおける AQP ファミリータンパクの発現を RT-PCR および免疫細胞染色で解析した。

さらにそこで発現を認めた AQP の生体での発現および詳細な局在を免疫組織染色および wholemount で観察した。

さらに他の特異的マーカーの可能性として脳アストロサイトでの発現が報告されている接着分子 Necl についても検討した。

4) マウス ES 細胞、ヒト iPS 細胞からのアストロサイトの誘導

近年、Eiraku らはマウス ES 細胞からの 3 次元神経網膜作製法を報告した (Eiraku M, 2011)。我々はこの方法を用いてより効率的なアストロサイトへの誘導方法を検討し、乳頭アストロサイトの単離を試みた。さらに我々が報告したヒト iPS 細胞を用いた SEAM 法 (Hayashi R, 2016) を用いて作製した網膜、視神経部位でのアストロサイトの発現を観察した。

5) 緑内障原因遺伝子の探索

当院緑内障外来通院中の原発開放隅角緑内障 258 人および正常眼 200 人の血液からゲノム DNA を抽出し香港大学と共同で解析を行い、緑内障原因遺伝子について検討した。

4. 研究成果

1) マウス視神経乳頭アストロサイトの単離培養および機能解析

マウス乳頭アストロサイトの単離培養法では約 2 週間ではほぼ confluent の状態となり、免疫細胞染色では 100% で GFAP 陽性であり、gap junction を形成する Cx43 が細胞間接着部に発現していた。フローサイトメトリーでは un-gate 下の全細胞では 72.8%、gate 下では 95.1% と **高率に GFAP 陽性アストロサイトが存在していた。**

また ATP 刺激に対して 4.4 ± 1.67 秒後に細胞内 Ca が上昇し濃度依存性に $[Ca^{2+}]$ シグナルは上昇した。この反応は **乳頭アストロサイトが互いに Cx43 で結合してシンチウムを形成し、網膜神経節細胞軸索のイオンおよび代謝恒常性を維持している**という既報を支持している可能性がある。また脳アストロサイトで報告されている反応と類似しており、我々は効率よく **乳頭アストロサイトを培養する系を確立できた。**

さらにメカノストレス伸展刺激について、まず圧 (stress) とひずみ (strain) の関係シミュレーションから伸展率、持続時間を検討した。さらにコーティングを改良することで長期伸展に耐えられることができた。その結果、4% の伸展率、1Hz の周期を 15 分間負荷したところ、アストロサイト同士の突起が離れて短く太くなった後に再び突起を伸ばすといった **リアクティブアストロサイトに類似した様子をタイムラプスで観察できた。**

さらにアストロサイトのマーカーである GFAP の mRNA の発現が伸展刺激後に上昇していることも確認できた。一方、アストロサイト同定および可視化を容易にするために EGFP-GFAP マウスを導入したが、繁殖に時間を要し本研究では解析ができなかった。

2) 高眼圧モデルマウスにおけるアストロサイトおよび接着分子の観察

我々が用いたレーザー誘発高眼圧作成法では眼圧上昇はレーザー照射 1 日後に眼圧 22.3 ± 3.75 mmHg と **有意に上昇し**、5 日後には正常状態に戻った (12.8 ± 2.95 mmHg)。

レーザー照射 3 日後、5 日後ともに GFAP の発現は上昇し **網膜内アストロサイトの増殖が確認できた。**

さらに接着分子 Nectin は双極細胞と網膜神経節細胞のシナプス部位である網膜内網状層 (IPL) においてレーザー照射 3 日後には発現が低下していたが、5 日後には発現が上昇していた。このことから **接着分子 Nectin が高眼圧負荷によって網膜内層シナプス形成に影響を与えている可能性が考えられた。**しかし上記方法は急性期高眼圧モデルで、出血

や炎症が合併しやすいことから、二次的的眼圧上昇の影響があると思われた。よって今後原発緑内障の病態に近い眼圧上昇のモデル作製を検討する必要がある。

また高眼圧モデルマウスにおける網膜機能変化を観察するためにマウスに存在する S-cone と M-cone それぞれに特異的に反応する UV-LED, Green-LED を用いた **網膜電図装置を開発した。**さらに光シグナル経路である ON 経路と OFF 経路を分離する方法を分離する方法を薬理的に証明した (Kawashima et al. Current eye research に投稿、リバイス中)。この系を用いて今後緑内障モデルマウスにおける光シグナル経路障害の詳細な解析を行うことができる。

3) マウス乳頭アストロサイト特異的マーカーの探索

マウス乳頭アストロサイト初代培養法でコンフルエントになった状態で、AQP ファミリー (1-12 (10 除く)) の発現を RT-PCR で解析したところ AQP1, 5, 9 の発現を確認した。さらに免疫細胞染色で AQP1, 5 は細胞質および核周囲に強く発現し、AQP9 は細胞膜に発現を認めていた。次に生体内での発現を検討したところ、AQP1, 5 は乳頭では GFAP との局在は認めなかったが、**AQP9 は乳頭から視神経にかけて GFAP と共同在していた。**

さらにアストロサイトと血管、神経との関係を平面的に観察するため wholamount を行ったところ AQP9 は乳頭に非常に密に GFAP と共同在して発現し、アストロサイトの足突起には存在せず細胞体および主突起に存在していた。一方、AQP4 は乳頭に発現せず、アストロサイトの主に足突起に発現し網膜血管壁および神経線維に沿って局在していた。この結果より、**網膜内においてもアストロサイトを介した neurovascular unit が形成されている可能性が示唆された。**さらに乳頭周囲網膜において、AQP4 が血管周囲に、AQP9 がアストロサイトに発現し、血管に接していることから、異なる AQP 分布が乳頭代謝機構の維持に何らかの役割を持つ可能性が示唆された。一方、脳アストロサイトに発現している接着分子 Nectin は乳頭アストロサイトには発現していなかった。

4) マウス ES 細胞、ヒト iPS 細胞からのアストロサイトの誘導

既報のマウス ES 細胞からの網膜三次元形成法を応用することで、qRT-PCR にて神経幹細胞マーカーである Sox2, Nestin、網膜神経幹細胞マーカーである Musashi, Pax6 の長期発現維持、GFAP の 2 倍以上の発現上昇に成功した。

さらに分化誘導後 25 日目に GFAP mRNA 発現は最大となり、フローサイトメトリーでは 60-70% が GFAP 陽性細胞であった。また乳頭アストロサイト特異的マーカーとしての AQP9 はフローサイトメトリーでは 30-40% が

陽性であった。これら乳頭アストロサイトマーカーである GFAP, AQP9, Pax2 は免疫細胞染色でも眼胞と思われる部位に発現を認めていた。さらに AQP9 陽性細胞の単離を試みたが、細胞内認識抗体のため生体細胞の分離が困難であった。今後、細胞外認識抗体作成やその他の乳頭アストロサイト特異的な膜タンパクの検討が必要である。

ヒト iPS 細胞から Self (SEAM)法を用いて眼組織を網羅的に階層的に分化誘導するシステムを構築し(Hayahashi R et al. Nature 2016, Nature Protocol 2017)、全眼球再生への基盤を作った。また、誘導された網膜、視神経細胞が集合する部位では現時点で GFAP, AQP9 の発現を確認したが、AQP9 の発現は確認できていなかった。今後、誘導法を工夫して乳頭アストロサイトの再生を試みる。

5) 緑内障原因遺伝子の探索

原発開放隅角緑内障患者(正常眼圧緑内障を含む)のゲノム遺伝子において、既報の SNP 変異とともに新たな SNP 変異を検出し報告した (Rong SS et al. , Scientific Reports 2016、現在さらに追加報告の準備中)。

今後、これらの解析から得られた変異をマウスおよびヒト iPS 細胞に導入し、得られたアストロサイトの表現型を評価することで疾患特異 iPS 細胞の解析を試みることで、視神経乳頭の進展刺激反応性分子機構を解明することが可能となる。さらに、この系を確立することで、我々が目的としている緑内障感受性変異の検討が可能となる。

6) ノックインマウスの作成

スクリーニングによって、SNP が検出された遺伝子に対して、SNP をノックインしたマウスを Crispr/CAS9 によって、作成した。シーケンスで、ノックインを確認し、現在、動物施設にて長期に渡り繁殖を試みている。安定した系が出来次第、実験を行う予定である。

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 18 件)

Goto S, Onishi A, Misaki K, Yonemura S, Sugita S, Ito H, Ohigashi Y, Ema M, Sakaguchi H, **Nishida K**, Takahashi M., Neural retina-specific Aldh1a1 controls dorsal choroidal vascular development via Sox9 expression in retinal pigment epithelial cells., *Elife*. 2018 Apr 3;7. pii:

e32358. doi: 10.7554/eLife.32358.

Wakabayashi T, Naito H, Suehiro JI, Lin Y, Kawaji H, Iba T, Kouno T, Ishikawa-Kato S, Furuno M, Takara K, Muramatsu F, Weizhen J, Kidoya H, Ishihara K, Hayashizaki Y, **Nishida K**, Yoder MC, Takakura N. CD157 Marks Tissue-Resident Endothelial Stem Cells with Homeostatic and Regenerative Properties. *Cell Stem Cell*. 2018;22(3):384-97.e6. doi: 10.1016/j.stem.2018.01.010.

Winegarner A, Oie Y, Kawasaki S, Nishida N, **Nishida K**., Novel PAX6 mutation reported in an aniridia patient., *Hum Genome Var.*, 2017 Dec 7;4:17053., doi: 10.1038/hgv.2017.53. eCollection 2017.

Kobayashi Y, **Hayashi R**, Quantock AJ, **Nishida K**., Generation of a TALEN-mediated, p63 knock-in in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*. 2017;25:256-65. doi: 10.1016/j.scr.2017.10.015.

Nishida K, Sotozono C, Yamagami S, Shiraishi A, Saika S, Fukushima A, Hori Y. "Progress in Corneal Research and Practice in Japan and Abroad," 22nd Annual Meeting of the Kyoto Cornea Club, November 25 and 26, 2016. *Cornea*. 2017;36 Suppl 1:S1-S2. doi: 10.1097/ICO.0000000000001342.

Hayashi R, Ishikawa Y, Katori R, Sasamoto Y, Taniwaki Y, Takayanagi H, **Tsujikawa M**, Sekiguchi K, Quantock AJ, **Nishida K**. Coordinated generation of multiple ocular-like cell lineages and fabrication of functional Corneal epithelial cell sheets from human iPS cells. *Nat Protoc*. 2017;12(4):683-96.

doi: 10.1038/nprot.2017.007.

Miki A, Kumoi M, Usui S, Endo T, Kawashima R, Morimoto T, **Matsushita K**, Fujikado T, **Nishida K**. Prevalence and Associated Factors of Segmentation Errors in the Peripapillary Retinal Nerve Fiber Layer and Macular Ganglion Cell Complex in Spectral-domain Optical Coherence Tomography Images. **J Glaucoma**. 2017;26(11):995-1000.

Miki A, Maeda N, Asai T, Ikuno Y, **Nishida K**. Measurement repeatability of the dynamic Scheimpflug analyzer. **Jpn J Ophthalmol**. 2017;61(6):433-40.

Hayashi R, Ishikawa Y, Sasamoto Y, Katori R, Nomura N, Ichikawa T, Araki S, Soma T, Kawasaki S, Sekiguchi K, Quantock AJ, **Tsujikawa M**, **Nishida K**. Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. **Nature**. 2016;531(7594):376-80.

Duncan TJ, Baba K, Oie Y, **Nishida K**. A Novel Method Using Quantum Dots for Testing the Barrier Function of Cultured Epithelial Cell Sheets. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 2015;56(4):2215-23.

Sasamoto Y, **Hayashi R**, Park SJ, Saito-Adachi M, Suzuki Y, Kawasaki S, Quantock AJ, Nakai K, **Tsujikawa M**, **Nishida K**. PAX6 Isoforms, along with Reprogramming Factors, Differentially Regulate the Induction of Cornea-specific Genes. **Sci Rep**. 2016;6:20807.

Kawashima R, **Matsushita K**, Fujimoto H, Maeda N, **Nishida K**. Air pressure-induced iridocornea contact

in a patient with primary angle closure observed with a dynamic Scheimpflug analyzer. **J Glaucoma**. 2015;24(5):e137-8.

Iwahashi C, Fujimoto M, Nomura S, Serada S, Nakai K, Ohguro N, **Nishida K**, Naka T. CTLA4-Ig suppresses development of experimental autoimmune uveitis in the induction and effector phases: Comparison with blockade of interleukin-6. **Exp Eye Res**. 2015;140:53-64.

Shi D, Funayama T, Mashima Y, Takano Y, Shimizu A, Yamamoto K, Mengkegale M, Miyazawa A, Yasuda N, Fukuchi T, Abe H, Ideta H, **Nishida K**, Nakazawa T, Richards JE, Fuse N. Association of HK2 and NCK2 with Normal Tension Glaucoma in the Japanese Population. **PLoS One**. 2013;8(1):e54115.

Miyagi H, Kanemoto S, Saito A, Asada R, Iwamoto H, Izumi S, Kido M, Gomi F, **Nishida K**, Kiuchi Y, Imaizumi K. Transcriptional Regulation of VEGFA by the Endoplasmic Reticulum Stress Transducer OASIS in ARPE-19 Cells. **PLoS One**. 2013;8(1):e55155.

Shi D, Takano Y, Nakazawa T, Mengkegale M, Yokokura S, **Nishida K**, Fuse N. Molecular genetic analysis of primary open-angle glaucoma, normal tension glaucoma, and developmental glaucoma for the VAV2 and VAV3 gene variants in Japanese subjects. **Biochem Biophys Res Commun**. 2013;432(3):509-12.

Sakimoto S, Kidoya H, Kamei M, Naito H, Yamakawa D, Sakaguchi H, Wakabayashi T, **Nishida K**, Takakura

N. An angiogenic role for adrenomedullin in choroidal neovascularization. **PLoS One**. 2013;8(3):e58096.

Goto S, Koh S, Toda R, Soma T, **Matsushita K**, Maeda N, **Nishida K**. Interface fluid syndrome after laser in situ keratomileusis following herpetic keratouveitis. **J Cataract Refract Surg**. 2013;39(8):1267-70.

〔学会発表〕(計 10 件)

角膜再生医療の可能性, 招待講演, **西田幸二**, 第 33 回京都・滋賀・奈良地区アイバンクシンポジウム, 2017, 国内.

眼と iPS 細胞の未来, 招待講演, **西田幸二**, 奈良県医師会館, 奈良県眼科医会 学術定例会, 奈良県医師会, 2017/6/11, 国内.

眼と iPS 細胞の未来, 招待講演, **西田幸二**, ホテル日航福岡, 第 11 回九州眼科アカデミー, 2017/7/1, 国内.

眼と iPS 細胞の未来, 招待講演, **西田幸二**, 千里ライフサイエンスセンター, 千里ライフサイエンス振興財団フォーラム, 2017/7/20, 国内.

再生医療による視覚障がい克服, 招待講演, **西田幸二**, 名古屋国際会議場, 日本臨床眼科学会, 2015/10/24, 国内.

Functional Analysis of Cultured Astrocytes from the Murine Optic Nerve Head, 口頭発表, Kawashima R, **Matsushita K**, **Nishida K**, Seattle Convention Center, ARVO, 2013/5/6, 国際.

マウス視神経乳頭アストロサイトの単離培養法の確立, 口頭発表, 河嶋瑠美, **松下賢治**, **西田幸二**, 東京国際フォーラム, 第 117 回日本眼科学会総会, 2013/04/04-07, 国内.

培養視神経乳頭アストロサイトによる乳頭シンチウム形成の検討, 口頭発表, **松下賢治**, 河嶋瑠美, **西田幸二**, 東京国際フォーラム, 第 117 回日本眼科学会総会, 2013/04/04-07, 国内.

Advances in Ocular Surface Stem Cell Research, 招待講演, **Nishida K**, Suntec City Convention Centre, シンガポール, 26th APACRS Annual Meeting, 2013/7/11, 国際.

Perspectives on stem cell therapy for ocular surface diseases, 招待講演,

Nishida K, Schepens Eye Research Institute USA, 28th Boston Biennial Cornea Conference, 2013/10/18, 国際.

〔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〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 幸二 (Nishida Kohji)
大阪大学大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 4 0 2 4 4 6 1 0

(2) 研究分担者

松下 賢治 (Matsushita Kenji)
大阪大学大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 4 0 4 3 7 4 0 5

(3) 研究分担者

辻川 元一 (Tsujikawa Motokazu)
大阪大学大学院医学系研究科・寄附講座教授
研究者番号: 7 0 4 1 9 4 7 2

(4) 研究分担者

林 竜平 (Hayashi Ryuhei)
大阪大学大学院医学系研究科・寄附講座教授
研究者番号: 7 0 5 3 5 2 7 8