

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670740

研究課題名(和文) 視細胞前駆細胞株をもちいた杆体細胞錐体細胞分化機構の解明

研究課題名(英文) Differentiation of retinal progenitors by chemokine

研究代表者

廣津 千恵子 (Hirotzu, Chieko)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：90647174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はiPS細胞から網膜前駆細胞を樹立した。これら細胞株でCD73陽性細胞はCXCR4を強く発現した。網膜前駆細胞株10クローンのうち8クローンではSDF1との培養でロドプシン、CRX、RX1、NRLのmRNA発現が濃度依存性に増強する。この作用がCXCR4を介したSDF1によるものである事は特異的な阻害剤AMD3100の添加実験によりCD73蛋白とロドプシン蛋白の発現抑制から示された。SDF1はロドプシンプロモーターの遺伝子転写を活性化する事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We previously reported establishment of cloned retinal progenitors which had ability to further differentiate into photoreceptor like cells by transfecting mouse induced pluripotent stem (iPS) cells with pax6 gene which regulated early events in eye development. We used the cloned cell lines for analyzing differentiation requirement of retinal progenitors. Flow cytometric analysis revealed that the retinal progenitor cell clones started to express CD73+, a marker of photoreceptor precursors, and reached their expression maximum at day 4 to day 5. At that time, some of the CD73 positive cells became to express CXCR4 on the cell surface. Real time RT-PCR and Immunocytochemistry disclosed that the retinal progenitor cell clones differentiated into rhodopsin positive photoreceptors, and the differentiation was reinforced by the addition of exogenous SDF1. These results suggest that retinal progenitor cell differentiation was at least in part regulated by the SDF1/CXCR4.

研究分野：再生医学

キーワード：iPS細胞 網膜 視細胞 ロドプシン

## 1. 研究開始当初の背景

網膜は光情報受容の主体である神経網膜と網膜色素上皮から構成されている。近年、理化学研究所の高橋らはヒト iPS 細胞から視細胞などを含む神経網膜や網膜色素上皮細胞などの眼の構成細胞を分化誘導できることを報告した。網膜疾患での失明の主要な原因は視細胞変性であり、一方最近増加している緑内障では網膜神経節細胞の変性が問題となる。最終的に神経節細胞や視細胞に分化できる神経網膜前駆細胞株の確立とそれを用いた網膜構成細胞の分化の調節機構の解明が待ち望まれている。網膜を構成する主要な細胞は、網膜神経節細胞、双極細胞と視細胞であり、視細胞は明暗を感知する杆体視細胞と、色覚を担う錐体視細胞とに大別される。これまでに神経網膜の発生に関与する多くの転写因子が同定された。Maf 群転写因子 Nr1 (neural retina leucine zipper) 及び核内受容体 Nr2e3 (nuclear receptor subfamily 2, group E, member 3) は杆体視細胞に特異的に発現し、杆体視細胞に特異的な遺伝子発現を活性化、S 錐体に特異的な遺伝子発現を抑制する。しかし発生あるいは再生の過程で、網膜前駆細胞から神経節細胞や双極細胞、さらに視細胞前駆細胞から杆体視細胞と錐体視細胞とに別れて分化する段階に関わる分子やその受容体、その後の細胞内シグナル伝達の詳細は十分に明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

我々はマウス ES 細胞並びに iPS 細胞に眼発生に関わる重要な転写因子の一つである pax6 を遺伝子導入した後、限界希釈法を用いることで nestin, musashi1, six3, 網膜前駆細胞の分化に関わる転写因子 chx10 を同時に発現する網膜神経前駆細胞株を複数樹立する事に成功した。iPS 細胞から樹立した網膜前駆細胞は視細胞前駆細胞マーカーである CD73 を非刺激状態で 50%程度、ロドプシン蛋白を中等量発現する。この細胞は様々な成長因子やケモカインに反応して更に分化して green-opsin, blue-opsin, red-opsin を発現する。一方、ES 細胞から樹立した細胞株は優先的に網膜神経節細胞に分化する。これらの細胞を精製純化して、次世代シーケンサーを駆

使した Bioinformatic な解析を行い網膜神経節細胞や視細胞の分化機構を分子レベルで明らかにし、さらに進めて眼発生の分子機構の理解につなげる。

## 3. 研究の方法

我々がマウス iPS 細胞から作成した株化 pax6 導入細胞の一部 (4 株) は視細胞前駆細胞の分化段階に対応する細胞株で in vitro でも in vivo でも杆体視細胞と錐体視細胞に分化するがその分化機構の詳細は明らかではない。まず、これらの視細胞前駆細胞株をケモカイン等で刺激してそれぞれの視細胞への分化を誘導する。この細胞は 90%程度の純度には容易に分化誘導できるが、これに抗 CD73 抗体とセルソーターを用いれば 95%以上の精製が可能である。同様にマウス ES 細胞から樹立した網膜神経節細胞前駆細胞株 (3 株) から成熟網膜神経節細胞を高純度に精製し回収する。高純度な網膜の構成細胞を、具体的には網膜神経節細胞、杆体視細胞と錐体視細胞を用いて網羅的なトランスクリプトーム解析を、次世代シーケンサーを用いて行う。

迅速に大規模な量の配列解析能力をもつ次世代シーケンサーは、近年多くの生物学研究領域で目覚ましい進展を見せており、これを用いて次世代の網膜細胞分化メカニズムの解析を行う。

まず全 RNA から特有のキットを用いて cDNA ライブラリを合成した後で Illumina HiSeq2000 を用いて全配列を解析する。マッピングとデータ解析を行い、これを GiNeS (次世代シーケンシング対応ゲノム解析クラウドサービス) を用いてデータベース化した後に必要な情報のみを取捨選択し解析を行う。

## 4. 研究成果

我々は iPS 細胞から網膜前駆細胞を数十株樹立したが、そのうちの mRNA と細胞表面抗原で調べた限り全く差異の無い 10 株について詳細に解析した。網膜前駆細胞を分化誘導培地で培養前後の視細胞前駆細胞マーカーである CD73 と SDF1 受容体である CXCR4 との二重染色を行った。細胞株で発現強度に差は認められるものの、CD73 陽性細胞は CXCR4 を強く発現する事が分かる。網膜前駆細胞株 10 クローンのうち 8 クローンでは SDF1 との培養でロドプシン、CRX、RX1、NRL の mRNA 発現が濃度依存性に増強する。この作用が CXCR4 を介した SDF1 によるものである事は特異的な阻害剤 AMD3100 の添加実験により CD73 蛋白とロドプシン蛋白の発現抑制から示された。興味深い事に、SDF1 は CRX の mRNA 発現を増強するのみならず、転写因子である CRX の核内移行を誘導した。

SDF1 はロドプシンプロモーターの遺伝子転写を CRX の活性化、核内移行を介して増強する事が明らかになった。

一方で10クローン中2クロンのiPS由来網膜前駆細胞ではSDF1刺激はロドプシンmRNA発現を抑制してロドプシン陽性細胞を分化誘導しない。逆にMオプシンmRNA発現は増強する。これらの成績は網膜前駆細胞のレベルで既に錐体視細胞と杆体視細胞は初期分化を既に終えている事を示唆している。

#### 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28件)

1. Shimizu J, Hiroshi Oka, Yoshihisa Yamano, Kazuo Yudoh, Suzuki N. Cardiac involvement in relapsing polychondritis in Japan. Rheumatology 2016; 55:583-584. 査読あり.
2. Shimizu J, Oka H, Yamano Y, Yudoh K, Suzuki N. Cutaneous Manifestations of Patients with Relapsing Polychondritis: an association with extracutaneous complications. Clinical Rheumatology 2016;35:781-783. 査読あり.
3. 鈴木 登. 関節症から全身性疾患を診る 再発性多発軟骨炎. リウマチ科 2016;55:203-208. 査読なし.
4. Kobayashi M, Chiba A, Izawa H, Yanagida E, Okamoto M, Shimodaira S, Yonemitsu Y, Shibamoto Y, Suzuki N. Nagaya M, The DC-vaccine study group at the Japan Society of Innovative Cell Therapy (J-SICT). The feasibility and clinical effects of dendritic cell-based immunotherapy targeting synthesized peptides for recurrent ovarian cancer. Journal of ovarian research. 2016 in press. 査読あり.
5. 清水 潤、久保田孝雄、鈴木 登. ヒトアレルギー・免疫疾患におけるTh17細胞異常と腸内細菌叢 Dysbiosis. アレルギーの臨床 2016年 印刷中. 査読なし.
6. Shimizu J, Takai K, Takada E, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Possible association of proinflammatory cytokines including IL1 $\beta$  and TNF $\alpha$  with enhanced Th17 cell differentiation in patients with Behcet's disease. Clinical Rheumatology 2016 印刷中. 査読あり.
7. Suzuki N., Shimizu J, Hirotsu C., Takada E, Arimitsu N, Ueda Y, Fujiwara N, Suzuki T, Takai K. Generation of Retinal Progenitor Cell Sheets which Differentiate into Rhodopsin Positive Photoreceptors from Mouse iPS Cell Derived Retinal Progenitor Cell Clones. International Journal of Ophthalmology and Clinical Research 2015;2:1-5. 査読あり.
8. Iinuma M, Umehara T, Arimitsu N, Shimizu J, Misawa H, Takai K, Fujiwara N, Fujii A, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Hirotsu C. Beppu M, Suzuki N. Induction of neural cells with spinal motoneuron phenotype from human iPS cells and the transplantation to totally transected spinal cords in mice. Inflammation and Regeneration 2015;35:154-163. 査読あり.

9. Fujiwara N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Cellular and molecular mechanisms of the restoration of human APP transgenic mouse cognitive dysfunction after transplant of human iPS cell-derived neural cells. *Experimental Neurology* 2015;271:423-431. 査読あり.
10. 鈴木 登. 新たな難病対策に向けて-診断基準、重症度分類、再発性多発軟骨炎. *リウマチ科* 2015; 54: 60-66. 査読なし.
11. 鈴木 登. 再発性多発軟骨炎の最新の知見. *皮膚病診療* 2015; 37:828-834. 査読なし.
12. 鈴木登. 新たな難病対策に向けて-診断基準、重傷度分類 再発性多発軟骨炎. *リウマチ科* 2015;54:60-66. 査読なし.
13. 鈴木登. 再発性多発軟骨炎の最新の知見. *皮膚病診療* 2015;37:828-834. 査読なし.
14. 鈴木 登. 再発性多発軟骨炎. 2015年別冊 新領域別症候群シリーズ 免疫症候群 (第2版) I-その他の免疫疾患を含めて- 2015;631-636. 査読なし.
15. Ueno H, Hattori T, Kumagai Y, Suzuki N, Ueno S, Takagi H. Alterations in the Corneal Nerve and Stem/Progenitor Cells in Diabetes: Preventive Effects of Insulin-Like Growth Factor-1 Treatment. *International Journal of Endocrinology* 2014;2014:312401. 査読あり.
16. Oka H, Yamano Y, Shimizu J, Yudoh K, Suzuki N. A large-scale survey of patients with relapsing polychondritis in Japan. *Inflammation and Regeneration* 2014;34:149-156. 査読あり.
17. 鈴木 登, 鈴木 知子. 免疫介在性脳炎再発性多発軟骨炎. *日本臨床* 2014 別冊神経症候群II. 2014;717-722. 査読なし.
18. Suzuki N, Shimizu J, Oka H, Yamano Y, Yudoh K. Neurological Involvement of Relapsing polychondritis in Japan: An Epidemiological Study. *Inflammation and Regeneration* 2014;34:206-208. 査読あり.
19. Misawa H, Saito A, Shimizu J, Iinuma M, Shiratsuchi T, Fujiwara N, Takai K, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. Pax7 Gene Induction Rapidly Regulates Myocyte Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells. *St. Marianna Medical Journal*. 2014;5:59-67. 査読あり.
20. Yoshioka T, Kurokawa MS, Sato T, Nagai K, Iizuka N, Arito M, Takakuwa Y, Nakano H, Ooka S, Suematsu N, Okamoto K, Yudoh K, Nakamura H, Suzuki N, Ozaki S, Kato T. Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells as a candidate biomarker for Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32:S9-19. 査読あり.
21. Maruyama T, Shimizu J, Suzuki N. T cell protein tyrosine phosphatase (TCPTP) regulates phosphorylation of Txk, a tyrosine kinase of the Tec family. *Inflammation and Regeneration* 2014;34: 240-246. 査読あり.

22. Sato T, Yamano Y, Tomaru U, Shimizu Y, Ando H, Okazaki T, Nagafuchi H, Shimizu J, Ozaki S, Miyazawa T, Yudoh K, Oka H, Suzuki N. Serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis. *Modern Rheumatology* 2014; 24:129-136. 査読あり.
23. Kono T, Arimitsu N, Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Umehara T, Saito A, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Hashimoto T, Tanaka Y, Suzuki N. Human iPS Cell Derived Neurons with Cortical Motor Neuron Phenotype are Relevant for Functional Recovery of Hemiplegic Mice with Injured Motor Cortex. *St. Marianna Medical Journal* 2013;4: 31-40. 査読あり.
24. Umehara T, Arimitsu N, Iinuma M, Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Saito A, Kono T, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. Transplantation of Motor Neurons Derived from Human iPS Cells into Total Transection Model of Spinal Cord Injury in Mice. *St. Marianna Medical Journal* 2013;4: 21-30. 査読あり.
25. Saito A, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Arimitsu N, Umehara T, Kono T, Misawa H, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. IGFII/Akt Signaling Regulates Myocyte Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells. *St. Marianna Medical Journal* 2013;4: 41-48. 査読あり.
26. Fujiwara N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Saito A, Kono T, Umehara T, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Restoration of spatial memory dysfunction of human APP transgenic mice by transplantation of neurons derived from human iPS cells. *Neuroscience Letters*. 2013; 557:129-134. 査読あり.
27. Shimizu J, Kaneko F, Suzuki N. Skewed Helper T-Cell Responses to IL-12 Family Cytokines Produced by Antigen-Presenting Cells and the Genetic Background in Behcet's Disease. *Genet Res Int* 2013;2013:363859. 査読あり.
28. Kobayashi M, Sakabe T, Abe F, Tanii M, Takahashi H, Chiba A, Yanagida E, Shibamoto Y, Ogasawara M, Tsujitani S, Koido S, Nagai K, Shimodaira S, Okamoto M, Yonemitsu Y, Suzuki N, Nagaya M, The DC-vaccine study group at the Japan Society of Innovative Cell Therapy (J-SICT). Dendritic cell-based immunotherapy targeting synthesized peptides for advanced biliary tract cancer. *J Gastrointest Surg* 2013;17: 1609-1617. 査読あり.
- [学会発表] (計 10 件)
1. 藤原成芳, 鈴木千佳, 高井憲治, 廣津千恵子, 有光なぎさ, 高田えりか, 清水潤, 鈴木登. ヒト iPS 由来神経細胞移植による認知機能改善と改善

- メカニズムについての検討. 第 15 回  
日本再生医療学会総会 大阪国際会議  
場 (大阪府大阪市) 2016. 3. 17-19.
2. Fujiwara N, Takai K, Takada E,  
Hirotsu C, Arimitsu N, Shimizu J,  
Suzuki N. Human iPS derived  
neural stem/precursor improved  
spatial memory learning of  
dementia model  
mice .International Society for  
Stem Cell Research 2015 Annual  
Meeting Stockholm, Sweden  
2015. 6. 24-27.
  3. 藤原成芳, 高井憲治, 鈴木千佳, 廣  
津千恵子, 高田えりか, 有光なぎさ,  
白土崇輝, 清水潤, 鈴木登. ヒト  
iPS 細胞から誘導した神経細胞移植  
による認知機能の改善とそのメカニ  
ズムについての検討. 第 111 回日本  
精神神経学会学術総会 大阪国際会議  
場 (大阪府大阪市) 2015. 6. 4-6.
  4. Fujiwara N, Takai K, Takada E,  
Hirotsu C, Arimitsu N, Shimizu J,  
Suzuki N. Restoration of spatial  
memory dysfunction of human APP  
transgenic mice by  
transplantation of neuronal  
precursors derived from hiPS  
cells. International Society for  
Stem Cell Research 12<sup>th</sup> Annual  
Meeting Vancouver, Canada  
2014. 6. 18-21.
  5. Fujiwara N, Takai K, Takada E,  
Hirotsu C, Arimitsu N, Saito A,  
Shimizu J, Suzuki N.  
Differentiation of cholinergic  
neurons from hiPS cells and  
restoration of cognitive function  
by their transplantation in mice

with dementia. International  
Society for Stem Cell Research  
11<sup>th</sup> Annual Meeting, Boston, MA,  
USA 2013. 6. 12-15.

他

〔図書〕 (計 4 件)

1. Kurokawa MS, Suzuki N. Behcet' s  
Disease. Current Research in  
Immunology, 2016 in press.
2. Suzuki N, Shimizu J. Chapter 2:  
The Immunopathology of Behcet' s  
Disease. In: Ishigatsubo Y, eds.  
Behcet' s Disease - From Genetics  
to Therapies. Tokyo, Japan:  
Shpringer Japan, 2016 in press.

他

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 廣津 千恵子  
(Hirotsu, Chieko)

聖マリアンナ医科大学・医学部・  
研究技術員

研究者番号 : 90647174

(2) 連携研究者 鈴木 登  
(Suzuki, Noboru)

聖マリアンナ医科大学・医学部・  
教授

研究者番号 : 40235982