

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 18 日現在

機関番号：82404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670741

研究課題名(和文) ヒト体細胞から網膜視細胞への再生分化における杆体・錐体の運命決定と機能獲得

研究課題名(英文) Fate determination and function acquisition during induction/regeneration of photoreceptors from human somatic cells

研究代表者

世古 裕子 (SEKO, YUKO)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所 感覚機能系障害研究部・室長

研究者番号：60301157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：直接的分化誘導によってヒト網膜視細胞様細胞を作製する技術を確立した。細胞ソースをヒト眼球由来虹彩細胞からヒト皮膚線維芽細胞やヒト末梢血単核細胞へと広げ、in vivoに近い条件で培養するため、ラット網膜色素上皮細胞との共培養を行い、転写因子遺伝子ミックスをウィルスベクターを介して本来の発生過程に近い時系列で導入した結果、誘導視細胞に視細胞特異的遺伝子の発現と光応答が確認された。我々の作製した誘導視細胞は、再生医療のみならず、網膜変性過程に抑制的に働く薬剤のスクリーニング、網膜変性疾患のメカニズム研究などの目的のためにも有用なツールとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Direct reprogramming is a promising, simple, low-cost approach to generate target cells from somatic cells without using induced pluripotent stem cells. We generated photosensitive photoreceptor-like cells from human iris cells, human dermal fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by transduction of photoreceptor-related transcription factors (CRX & RAX & OTX2 & NeuroD) via retrovirus vectors and Sendai virus vectors. We found that retinal disease-related genes were efficiently detected in CRX-transduced PBMCs. To improve differentiation levels, we made differentiation conditions close to the in vivo retinal development, such as the expression order of transcription factors and cooperation with retinal pigment epithelium. These modifications facilitated the differentiation of human PBMCs into photoreceptor-like cells. Our induced photoreceptor-like cells might contribute to individualized drug screening and disease modeling of inherited retinal degeneration.

研究分野：網膜分化、眼科学

キーワード：眼発生 再生医学 網膜視細胞 直接的分化誘導

1. 研究開始当初の背景

感覚の90%を占める重要な機能である視覚におけるセンサーである網膜は、1度損傷を受けると回復は困難である。網膜変性疾患は失明原因の上位を占め、視力を司る網膜視細胞(錐体)が集中している黄斑が変性に陥ると不可逆的な視力低下にいたる。失われた視覚の再生を目指し、マウスやヒトのES細胞から網膜組織もつくられた(Eiraku M et al. Nature, 2011)。しかし誘導には数か月を要し、この神経網膜組織には、ヒトの中心視力を司る黄斑は形成されなかった。

一方最近では、普通の線維芽細胞などの細胞(体細胞と呼ばれる)に数種類の転写因子遺伝子をミックスして導入すると必要な細胞が得られるという“ダイレクト・リプログラミング”と呼ばれる技術も開発され、すでに心臓、膵臓、神経などがつくられていた。申請者の世古らは、この方法で網膜視細胞様細胞を作製した。CRX, NEUROD, RAXの3種類の転写因子遺伝子をレトロウィルスベクターを用いてヒト虹彩由来細胞に導入すると、視細胞特異的な光トランスダクションに関わる遺伝子・蛋白の発現がみられ、錐体と杆体との運命決定に関わる可能性のある転写因子も示唆された(Seko Y et al. PLoS One, 2012)。この誘導視細胞は、パッチクランプによって光応答があることも確認されたが、その光応答は視細胞型の過分極反応ではなく、脱分極反応であり、形態学的にも外節は確認できなかった。研究開始当初、いかなる細胞ソースでも、in vitro で、形態学的に外節をもち、視細胞本来の光応答を示す最終分化した視細胞に分化誘導することはできなかった。

2. 研究の目的

本研究では、“ダイレクト・リプログラミング”による網膜視細胞作製の方法を完成させ、1、ヒト網膜視細胞を構成する錐体細胞と杆体細胞とを作り分ける技術を確立し、2、形態学的に外節をもち、視細胞本来の過分極

反応を示す最終分化した視細胞まで分化誘導する、の2点を目標とした。本研究で用いた“ダイレクト・リプログラミング”の最大の利点は、遺伝子導入から約1週間という短期間で視細胞への運命決定の可否を判定できる点であり、この方法で視細胞への運命決定に不可欠な因子を絞込むことによって、iPS細胞から視細胞へのより迅速な分化誘導に応用することもできる。完全な機能をもつ視細胞をin vitro で作製できれば、再生医療のみならず、網膜変性過程に抑制的に働く薬剤のスクリーニング、網膜変性疾患のメカニズム研究などの目的のためにも、きわめて有用なツールとなることが期待された。

3. 研究の方法

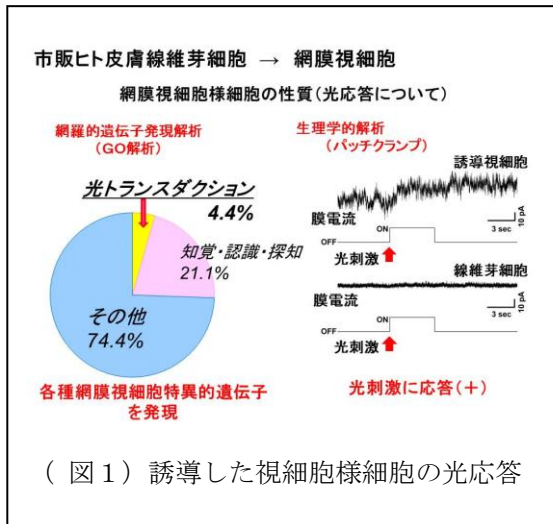
ヒト細胞を用い、網膜の個体発生に基づいた分化誘導モデルを展開し、成熟した網膜視細胞へと分化するプロセスを生体外で厳密に再現した。分化誘導の手法としては、“ダイレクト・リプログラミング”を用い、in vivo に近い条件で培養するため、網膜色素上皮細胞との共培養を行い、2、CRX, RAX, NeuroD, OTX2の4種類の転写因子を本来の発生過程に近い時系列で導入するために、レトロウィルスベクターあるいは細胞質型RNAウィルスベクターを用いて導入した。誘導したヒト網膜視細胞は、網羅的遺伝子発現、RT-PCR、免疫染色によって視細胞特異的遺伝子、タンパク質の発現の有無を調べ、本来の視細胞の表現型と比較した。機能については、パッチクランプ法によって、視細胞本来の光応答である過分極反応が検出されるか否かを電気生理学的に評価した。

4. 研究成果

① ヒト皮膚線維芽細胞から網膜視細胞への分化誘導

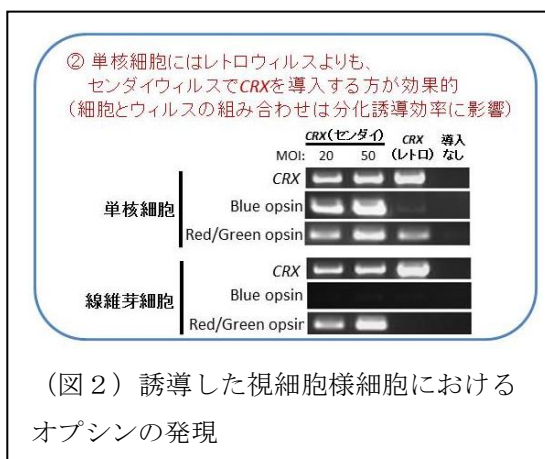
ヒト皮膚線維芽細胞から網膜視細胞を作製し、網羅的遺伝子発現、RT-PCR、免疫染色による発現解析とパッチクランプ法による電

気生理学的な機能解析を行った。得られた誘導網膜視細胞が視細胞特異的遺伝子、特に光トランスダクションに関わる遺伝子を発現し、機能的にも光応答細胞であることを証明した (図1)。



② 末梢血由来細胞から網膜視細胞への分化誘導

末梢血単核細胞では、センダイウィルスベクターを介して *CRX* 遺伝子を単独で導入するとレトロウィルスベクターを介して遺伝子導入するよりも視細胞遺伝子のうちブルーオプシンの発現誘導の効果が強く (図2)、センダイウィルスベクターを介して *CRX* 遺伝子を末梢血単核細胞へ導入すると、多くの視細胞遺伝子の発現を誘導でき、光に応答する細胞も少数だが出現することがわかった (光応答の解析は日本医大が担当)。しかし誘導された遺伝子の多くが錐体細胞系遺伝子であり、



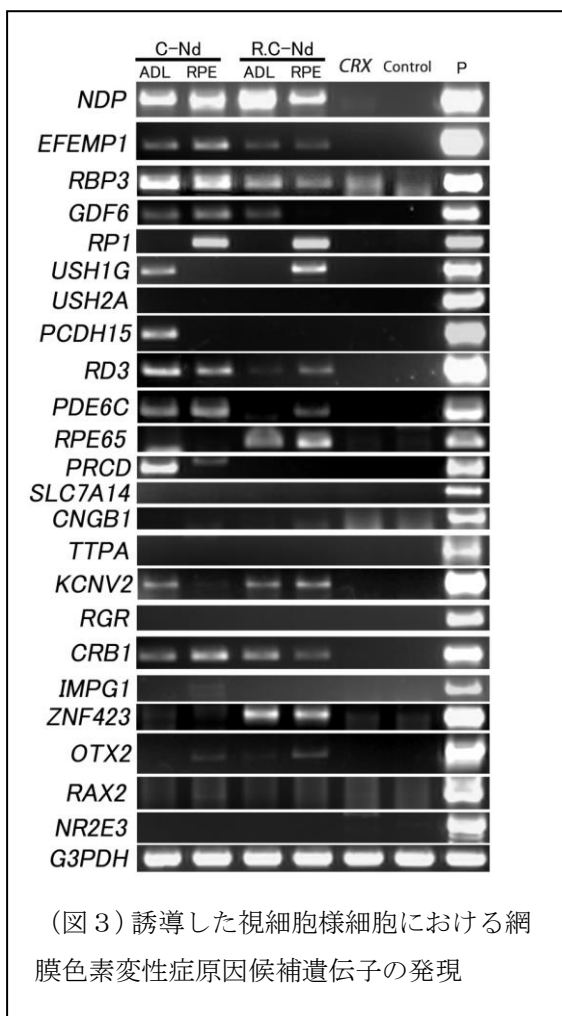
杆体細胞系ではなかった。*CRX* の他に *RAX*、*NeuroD1* の遺伝子をセンダイウィルスによって導入し、同時に分化誘導培地を改良すると、杆体細胞系の遺伝子の発現をわずかだが誘導することができた。(以下3.を参照)

③ 発生分化の時系列および周辺環境を模倣した分化誘導系を構築

a) 末梢血由来細胞から網膜視細胞

末梢血単核細胞では、分化誘導培地を改良する実験において、*CRX* の1日後に *NeuroD1* を導入、もしくは *RAX* と *CRX* を同時に導入し、その1日後に *NeuroD1* を導入した場合が最も杆体細胞のマーカー遺伝子 Rhodopsin を発現しやすくなるという結果を得た。この結果は、発生学的に予想された時系列と一致していた。さらに培地の改良で Activin、DKK1、Lefty というタンパクを培地に添加、もしくはラット初代培養網膜色素上皮細胞の培養上清を添加すると Rhodopsin を発現しやすくなるという結果も得た。誘導された末梢血単核細胞 (誘導視細胞) がどれくらい視細胞に近づいたのかを検証するため、*CRX* 遺伝子単独を導入した細胞と導入していない細胞との間で、マイクロアレイによる、網羅的遺伝子発現解析による比較を行い、差が出た遺伝子のうち網膜視細胞に特異的に発現し網膜色素変性症の原因候補遺伝子として登録されている遺伝子を抽出し、それらの遺伝子について RT-PCR によって発現の有無を確認した。*CRX* 遺伝子単独の導入によって、Blue opsin など計 27 種類、培養条件の改良によってさらに、*CRB1* など計 15 種類の視細胞遺伝子が発現するようになった (図3)。以上の結果から、末梢血単核細胞由来の誘導視細胞は、新規診断法・病態解析の解明に有用である可能性が示唆されたが、Rhodopsin など杆体細胞遺伝子の発現が、皮膚線維芽細胞由来の誘導視細胞と比較して極めてわずかであり、光応答能を持った細胞は存在した

が数は少なく、さらに光応答の様式が本来の視細胞なら過分極型であるのに対し、得られた結果は脱分極型であった。この結果は、恐らく過分極型に应答するには遺伝子発現が不十分であったためと思われる。網膜色素変性症は先に杆体細胞が細胞死を起こすという報告があるため、さらなる分化誘導方法の改良が必要である。



b) ヒト皮膚線維芽細胞から網膜視細胞
ヒト皮膚線維芽細胞では、ラット初代培養網膜色素上皮細胞の培養上清の添加あるいはラット初代培養網膜色素上皮細胞との共培養を分化誘導時に行うことによって、CRX+RAX+NeuroD1 の3因子導入の場合には網膜視細胞への誘導効率を上げる効果があったが、CRX+RAX+NeuroD1+OTX2 の4因子導入の場合にはさらに誘導効率を上げる効果はな

かった。

現時点では、皮膚線維芽細胞の網膜視細胞への誘導には、CRX+RAX+NeuroD1+OTX2 の4因子導入がベストであるという結論となった。

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 11 件)

① Seko Y, Azuma N, Yokoi T, Kami D, Ishii R, Nishina S, Toyoda M, Shimokawa H, Umezawa A. Anteroposterior Patterning of Gene Expression in the Human Infant Sclera: Chondrogenic Potential and Wnt Signaling. *Cur Eye Res* 2016 in press

② Komuta Y, Ishii T, Kaneda M, Ueda Y, Miyamoto K, Toyoda M, Umezawa A, Seko Y. In vitro transdifferentiation of human peripheral blood mononuclear cells to photoreceptor-like cells. *Biology Open*, 2016 May 11. pii: bio.016477.

③ Yokoi T, Nishina S, Fukami M, Ogata T, Hosono K, Hotta Y, Azuma N. Genotype-Phenotype Correlation of the PAX6 Gene Mutations in Aniridia. *Human Genome Variation*, 2016 Feb 11;3:15052.

④ Tanaka T, Yokoi T, Tamalu F, Watanabe S, Nishina S, Azuma N. Generation of retinal ganglion cells with functional axons from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016. [Epub ahead of print]

⑤ Okamura K, Sakaguchi H, Sakamoto-Abutani R, Nakanishi M, Nishimura K, Yamazaki-Inoue M, Ohtaka M, Periasamy VS, Alshatwi AA, Higuchi A, Hanaoka K, Nakabayashi K, Takada S, Hata

K, Toyoda M, Umezawa A. Distinctive features of single nucleotide alterations in induced pluripotent stem cells with different types of DNA repair deficiency disorders. *Sci Rep*. May 20; 6:26342. Doi: 10.1038/srep26342, 2016

⑥ Higasa K, Miyake N, Yoshimura J, Okamura K, Niihori T, Saito H, Doi K, Shimizu M, Nakabayashi K, Aoki Y, Tsurusaki Y, Morishita S, Kawaguchi T, Migita O, Nakayama K, Nakashima M, Mitsui J, Narahara M, Hayashi K, Funayama R, Yamaguchi D, Ishiura H, Ko WY, Hata K, Nagashima T, Yamada R, Matsubara Y, Umezawa A, Tsuji S, Matsumoto N, Matsuda F. Human genetic variation database, a reference database of genetic variations in the Japanese population. *J Hum Genet*. 2016 Feb 25. doi: 10.1038/jhg.2016.12.

⑦ Tanaka T, Yokoi T, Tamalu F, Watanabe S, Nishina S, Azuma N. Generation of retinal ganglion cells with functional axons from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2015 Feb 10;5:8344. doi: 10.1038/srep08344

⑧ Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Tamoto R, Kawasaki T, Umezawa A, Akutsu H. Generation of primitive neural stem cells from human fibroblasts using a defined set of factors. *Biol Open*. 2015 Oct 21;4(11):1595-607.

⑨ Seko Y, Azuma N, Ishii T, Komuta Y, Miyamoto K, Miyagawa Y, Kaneda M, Umezawa A. Derivation of human differential photoreceptor cells from adult human dermal fibroblasts by defined

combinations of *CRX*, *RAX*, *OTX2* and *NEUROD*. *Genes Cells*. 19(3):198-208. 2014

⑩ Yokoi T, Seko Y, Yokoi T, Makino H, Hatou S, Yamada M, Kiyono T, Umezawa A, Nishina H, Azuma N. Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. *PLoS One*. 2012;7(1):e29677. Epub 2012 Jan 19.

⑪ Seko Y, Azuma N, Kaneda M, Nakatani K, Miyagawa Y, Noshiro Y, Kurokawa R, Okano H, Umezawa A. Derivation of human differential photoreceptor-like cells from the iris by defined combinations of *CRX*, *RX* and *NEUROD*. *PLoS One*. 2012;7(4):e35611. Epub 2012 Apr 25.

[学会発表] (計 7 件)

① 世古裕子 網膜リプログラミング研究の進展。第15回再生医療学会総会 シンポジウム10「幹細胞・リプログラミング研究の展開」大阪 2016年3月17日

② 小牟田 縁、石井 俊行、金田 誠、上田 泰次、豊田 雅士、梅澤 明弘、世古 裕子。末梢血単核細胞から網膜視細胞様細胞への直接的分化誘導。第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会。神戸 2015年12月1日

③ 世古裕子 ヒト体細胞から網膜視細胞へのダイレクトリプログラミング。感覚器セミナー 東京 2015年12月15日

④ Seko Y, Azuma N, Kaneda M, Nakatani K, Umezawa A: Derivation of human differential photoreceptor-like cells from iris cells by defined combinations of transcription factors. *World*

Ophthalmology Congress 2014. Tokyo, April, 2014

⑤ 世古裕子 Direct reprogramming 法を用いた視細胞の再生医学 第 245 回生理学東京談話会、2014 年 7 月 4 日 東京

⑥ 世古裕子、東範行、石井俊行、小牟田縁、金田誠、梅澤明弘 ヒト培養誘導網膜視細胞の光応答について. 第 17 回視覚科学フォーラム研究会、2014 年 8 月 18 日 群馬

⑦ 世古裕子、ヒト体細胞から網膜視細胞へのダイレクト・リプログラミングによる最終分化 第 1 回 retina research meeting, 2013 年 11 月 東京

〔図書〕(計 1 件)

① 世古裕子、梅澤明弘 線維芽細胞 → 視細胞、細胞工学 別冊ハンドブック ダイレクトリプログラミング (監修: 鈴木淳史)、第 8 章 p78-86、2015年3月

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

世古 裕子 (SEKO, Yuko)

国立障害者リハビリテーションセンター (研究所)・研究所 感覚機能系障害研究部・研究室長
研究者番号: 60301157

(2) 研究分担者

東 範行 (AZUMA, Noriyuki)

独立行政法人国立成育医療研究センター・病院眼科・研究所 視覚科学研究室・室長
研究者番号: 10159395

(3) 研究分担者

梅澤 明弘 (UMEZAWA, Akihiro)

独立行政法人国立成育医療研究センター・再生医療センター・センター長
研究者番号: 70213486

(4) 連携研究者

金田 誠 (KANEDA, Makoto)

日本医科大学・医学系研究科 システム生理学・教授
研究者番号: 30214480

(5) 研究協力者

小牟田 縁 (Komuta, Yukari)