

平成21年6月3日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700324

研究課題名 (和文) 虹彩由来網膜幹細胞を用いた網膜神経細胞の再生

研究課題名 (英文) Retinal Regeneration using iris derived retinal stem cell

研究代表者

山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)

藤田保健衛生大学・共同利用研究施設・講師

研究者番号：00267957

研究成果の概要：研究代表者の山本が特許を取得している固定液を用いてマウス虹彩組織を固定し、*in vivo*における免疫組織染色による詳細な調査を行った。その結果、神経幹/前駆細胞マーカーの1つであるNestinを発現している細胞が存在することを明らかとした。さらに、山本が発見し、特許出願・審査中の新しい網膜幹/前駆細胞マーカーであるp75NTR(CD271)を用いて、同様に虹彩組織の免疫組織染色を行ったところ、Nestin陽性の細胞はp75NTR陽性の細胞であることが判明した。次に従来から神経系幹細胞の培養方法として知られているNeurosphere法で虹彩組織細胞を培養したところ、Sphereを形成した細胞はNestinとp75NTRが陽性の細胞であった。しかし、虹彩由来細胞は、Neurosphere法では継代培養することができなかつたため、新しいマウス虹彩組織の培養条件を検討したところ、bFGFを添加することで虹彩組織に含まれる色素顆粒の脱顆粒を誘導し、かつ*in vitro*のシャーレ内でp75NTR発現細胞を培養・増殖できることが分かった。さらに、マウス虹彩組織から培養した細胞(マウス虹彩由来網膜幹/前駆細胞 Mouse Iris derived Retinal Stem Cell : M-IRSC)について、p75NTRによる細胞分離を試みた。このM-IRSCから選択分離したp75NTR(+) Cellsとp75NTR(-) Cellsについて、レチノイン酸を含む網膜細胞への分化誘導培地で培養し、比較検討したところp75NTR(+) Cellsから網膜細胞へ分化誘導することで、効率的にRhodopsinとRecoverin陽性の視細胞、Calbindin陽性の水平細胞、およびPKC陽性の双極細胞へ分化誘導できることをリアルタイムPCRによるm-RNAの発現定量実験、および細胞免疫染色で確認できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：虹彩組織細胞、網膜幹/前駆細胞、再生医療、網膜再生、p75NTR、CD271、Nestin

## 1. 研究開始当初の背景

本邦、および諸外国における既報の網膜再生研究は、海馬由来神経幹細胞や胎生期の網膜細胞、水晶体を牽引している毛様体などを利用した報告がある。しかし、これらの報告で用いられている移植源の細胞では、臨床応用するには様々な問題点がある。更にこれらの報告で用いられた細胞は、虹彩や網膜に色素を有さないアルビノのラットやマウスの細胞を用いており、ヒトの細胞とは色素を有さないという点で大きく異なっている。

ES細胞やiPS細胞を用いた様々な再生医療研究が実施されているが、本研究は成体の自己組織にごく少数存在する組織幹細胞を用いた再生医療研究である。組織幹細胞はES細胞やiPS細胞と比較して、(1)自己の細胞を用いること、(2)遺伝子導入を行わないことなどの観点から臨床応用にむけた克服すべき課題が少ない。

## 2. 研究の目的

加齢や糖尿病による網膜変性症などの網膜に障害がある患者は、世界中で約150万人以上みえるといわれている。日本での患者数は、網膜色素変性症は4000人に1人、加齢黄斑変性症は50歳以上の人口の約1%といわれている。疾患によって傷害される網膜神経細胞は異なり、一般的には緑内障では主に神経節細胞が傷害され、網膜色素変性症や加齢黄斑変性症では視細胞が傷害されるといわれている。これらの網膜疾患の患者に対して、今日の眼科手術による治療では視力を完全に回復させることは難しい。この最大の理由は、網膜は神経細胞の集合体であるため、何らかの傷害を受けると、成熟分化した網膜神経細胞が自己回復し、シグナル伝達系までの完全再生することが難しいからであると考えている。そこで、傷害を受けた神経細胞の代わりとなる新しい細胞を必要な網膜細胞層へ移植し、さらにその移植した細胞が宿主網膜に残存している網膜神経細胞とネットワークを構築し、網膜機能を再生させるという、新しい治療法としての網膜再生研究への期待が高まっている。研究代表者の山本は、この網膜再生研究を行うにあたり、自己の虹彩組織に着目し、虹彩組織中に存在する組織幹細胞の検索、組織幹細胞の分離培養、および網膜神経細胞への分化誘導の可能性について検討した。

## 3. 研究の方法

### 3-1. マウス虹彩組織の検索

4週令のマウス眼球の虹彩組織をSUPER FIX(KURABO)で固定し、通常の方法でパラフィン標本作製した。次に上皮系幹細胞マ-

ーカーの1つであり、山本が間葉系幹細胞マーカーとしての有用性を特許(特開2006-230235、特開2007-267672)と論文で報告したlow affinity neurotrophin receptor p75(p75NTR)の発現と神経系幹/前駆細胞マーカーの1つであるNestinの発現について調査した。

なお、p75NTRはlow affinity neurotrophin receptorであり、別名としてp75 nerve growth factor receptor (p75NGFR)ともよばれ、さらに様々な細胞表面に存在するモノクローナル抗体の国際分類(CD分類)ではCD271である。なおneurotrophin familyには、Nerve growth factor (NGF)、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、Neurotrophin-3 (NT-3)、Neurotrophin-4/5 (NT-4/5)などがある。

### 3-2. 虹彩組織細胞の培養法の検討

マウス眼球から実体顕微鏡下で分離した虹彩組織(図2a)を酵素処理した後、コラーゲンコートしたディッシュにて血清含有培地で初代培養した。次に神経系幹/前駆細胞選択培養法の1つであるNeurosphere法(無血清浮遊培養法)にて培養を行い、神経系幹/前駆細胞の集合体であるSphereの培養を検討した。

さらに山本が考案した無血清接着培養法にて虹彩由来細胞を培養し、増殖した細胞をFACSで解析するため、SUPER FIXで5分固定、サポニン処理してからNestinとp75NTRの発現について調査した。

### 3-3. 網膜神経細胞への分化誘導

無血清接着培養法で培養した細胞をレチノイン酸含有分化誘導培地で7日間培養した。次にp75NTRを細胞表面マーカーとしてセルソーター(FACS Vantage SE, BD Biosciences, San Jose, CA)による細胞分離を行い、p75NTR陽性細胞と陰性細胞をそれぞれ分化誘導培地で培養した。さらに、p75NTR陽性細胞をさらに分化誘導し、網膜神経細胞マーカーを発現する細胞に分化させることができるかどうかを検討した。

## 4. 研究成果

### 4-1. マウス虹彩組織の検索

眼球の水晶体や網膜などは、非常に組織標本作製し難い組織の1つである。山本は組織標本作製し難い組織でもアーティファクトの少ない標本作製することができる固定液の開発に2000年頃から着手し、2005年に固定液の開発に成功、特許を取得(特許第3723204号“難浸透性組織迅速固定液”)し、さらにこの特許に基づく組織用迅速固定

液 (SUPER FIX, KURABO) が市販された。この固定液で固定すると、マウス眼球全体的ままでも固定することができるようになり、殆どアーティファクトの無い眼球のパラフィン標本を作製することが可能になった (図 1a)。

虹彩組織の一部で p75NTR 陽性の細胞が観察され、それらの多くは Nestin 陽性の細胞であった (図 1b-e)。

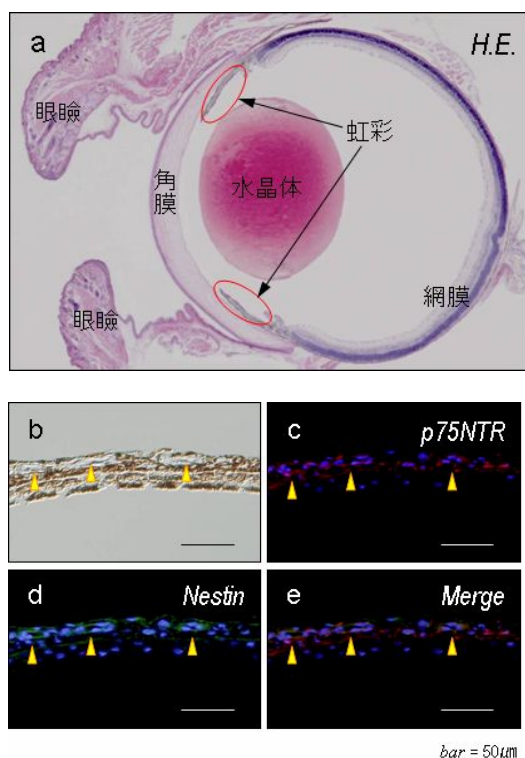


図 1 マウス眼球組織標本と虹彩の免疫蛍光抗体染色

#### 4-2. 虹彩組織細胞の培養法の検討

マウス眼球から実体顕微鏡下で分離した虹彩組織を酵素処理した後、コラーゲンコートしたディッシュにて血清含有培地で培養することができた (図 2a)。

まず神経幹細胞選択培養法の 1 つである Neurosphere 法 (無血清浮遊培養法) にて  $1 \times 10^5$  cell/ml で培養したところ、1 継代目には 300 個程度の Sphere (細胞凝集体) が観察された (図 2b) が、3 継代目には 70 個程度の Sphere しか観察されなかった (図 2c) ことから、虹彩由来細胞には神経幹細胞が存在する可能性があるが、Neurosphere 法では大量に神経系幹細胞を増やすことが難しいことがわかった。なお、酵素処理とピペッティングにより Sphere を分解して細胞を免疫蛍光染色したところ、Nestin 陽性、p75NTR 陽性の細胞であった (図 2d, e)。

次に著者が考案した無血清接着培養法にて虹彩由来細胞を培養し、増殖した細胞を FACS で解析するため、SUPER FIX で 5 分固定、サポニン処理してから Nestin と p75NTR の発現について調査した。結果として、64.7% の細胞が Nestin 陽性、p75NTR 陽性の細胞であった (図 2f) ことから、無血清接着培養法では幹細胞マーカーを発現する細胞を増殖させることができることがわかった。また、神経系幹/前駆細胞マーカーの Nestin は細胞質内タンパクであるため、セルソーターなどで分離することが難しいが、虹彩由来細胞では Nestin 陽性細胞の多くに p75NTR が細胞表面マーカーとして発現していることから、p75NTR によって神経系幹/前駆細胞を分離できることがわかった。

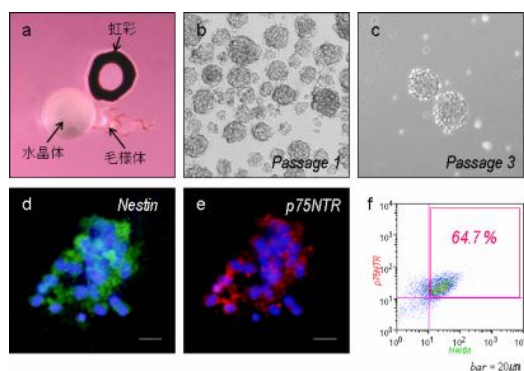


図 2 マウス虹彩由来細胞の培養と解析

#### 4-3. 網膜神経細胞への分化誘導

無血清接着培養法で培養した細胞をレチノイン酸含有分化誘導培地で 7 日間培養したところ、神経様細胞の形態に分化する細胞と分化しない細胞が観察された (図 3a)。そこで p75NTR を細胞表面マーカーとしてセルソーターによる細胞分離を行い (図 3b)、p75NTR 陽性細胞と陰性細胞をそれぞれ分化誘導培地で培養したところ、p75NTR 陽性細胞の多くは神経様細胞の形態を示す細胞に分化した (図 3c)。一方、p75NTR 陰性細胞を分化誘導すると、多くの細胞は線維芽細胞様の形態を示す細胞であった (図 3d)。

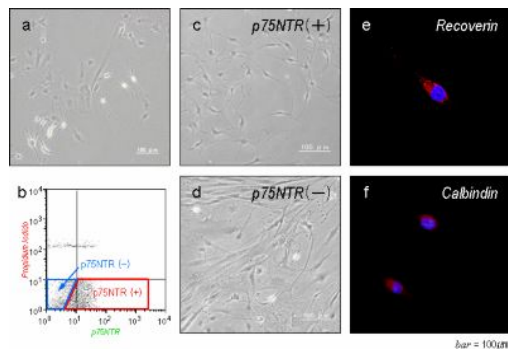


図 3 p75NTR による分離と分化誘導

そこで、p75NTR 陽性細胞をさらに分化誘導したところ、一部の細胞で網膜神経細胞マーカーの Recoverin や Calbindin を発現する細胞に分化させることができた (図 3e, f)。

#### 【結果のまとめ】

以上の結果から、虹彩組織から分離した細胞を無血清接着培養法で培養することにより、上皮系幹細胞マーカーの1つである p75NTR 陽性で神経系幹/前駆細胞マーカーの1つである Nestin を共発現する細胞を培養・増殖 (幹細胞の自己複製) することができた。さらにこの p75NTR を細胞表面マーカーとして分離した細胞を分化誘導することで、一部の網膜神経細胞に分化誘導 (網膜神経細胞への分化能) することが可能であったことから、虹彩組織には網膜幹/前駆細胞が存在することが示唆された。

#### 【今後の展望と課題】

今後、より効率的な網膜幹/前駆細胞の分離培養法の検討、網膜を構成している全ての種類の網膜神経細胞への分化能についての検討、電気生理学的に機能する網膜神経細胞への分化誘導、細胞移植条件の検討と移植細胞の網膜組織内での分化能、およびマウス網膜電位 (ERG) の測定による生理学的な視機能の改善などについて詳細な検討を続けていく。

#### 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6件)

- ① 山本直樹: 組織幹細胞による再生医療へのアプローチ - 組織幹細胞の分離と目的細胞への分化誘導. 藤田学園医学会誌, 2009. (印刷中、査読有り)
- ② Sawano M., Imai T., Oka M., Yamamoto N., Takehana M.: Function and localization of micro-tubules in the lens. *J Jap Soc Cat Res.* 20, 52-57, 2008. (査読有り)
- ③ Arai S., Yamamoto N., Katoh M. and Kojima H.: An *in vitro* evaluation method to test ocular irritation using a human corneal epithelium model. *AATEX* 13, 83-90, 2008. (査読有り)
- ④ Yamamoto N., Majima K. and Marunouchi T.: A study of the proliferating activity in lens epithelium and the identification of tissue-type stem cells. *Med Mol Morphol.* 41, 83-91, 2008. (査読有り)
- ⑤ 山本直樹, 高橋久英: 新たに育成した有色白内障マウス (BpS/cat). 藤田学園医学会誌 31, 89-93, 2007. (査読有り)

- ⑥ Nishi O., Yamamoto N., Nishi K. and Nishi Y.: Contact inhibition of migrating lens epithelial cells at the capsular bend created by a sharp-edged intraocular lens after cataract surgery. *J Cataract Refract Surg.* 33, 1065-1070, 2007. (査読有り)

##### 〔学会発表〕 (計9件)

- ① 山本直樹, 谷川篤宏, 堀口正之. マウス虹彩由来培養細胞を用いた網膜再生の可能性. 第40回日本臨床分子形態学会総会. (福岡) 2008年10月.
- ② 山本直樹. 組織幹細胞による再生医療へのアプローチ - 組織幹細胞の分離と目的細胞への分化誘導 -. 第40回藤田学園医学会総会. (愛知) 2008年10月 (藤田学園医学会奨励賞受賞).
- ③ 山本直樹, 谷川篤宏, 堀口正之. 虹彩由来網膜幹/前駆細胞からの網膜神経細胞への分化誘導. 第81回日本組織培養学会総会. (茨木) 2008年5月.
- ④ 山本直樹, 谷川篤宏, 堀口正之. ヒト虹彩由来細胞からの網膜神経細胞への分化誘導. 第112回日本眼科学会総会. (神奈川) 2008年4月 (優秀ポスター賞受賞).
- ⑤ 山本直樹, 丸野内棟, 矢田宏一郎, 谷川篤宏, 堀口正之. マウス虹彩由来培養細胞を用いた網膜神経細胞への分化誘導. 第7回日本再生医療学会総会. (愛知) 2008年3月.
- ⑥ Yamamoto N.: A study of retinal regenerative medicine by human iris tissue cells. 6<sup>th</sup> World congress on alternatives & animal use in the life Sciences. (Tokyo, JAPAN) 2007年8月 (国際学会招待講演).
- ⑦ 山本直樹, 高橋久英. 新たに育成した有色白内障マウス (BpS/cat). 第41回日本実験動物技術者協会総会. (愛知) 2007年7月.
- ⑧ 山本直樹. 水晶体と白内障 基礎研究と臨床研究の Collaboration. 第46回日本白内障学会総会. (愛媛) 2007年6月 (第19回学術奨励賞受賞記念講演).
- ⑨ 山本直樹, 丸野内棟, 谷川篤宏, 堀尾直市, 堀口正之. マウス・ヒト虹彩組織由来細胞を用いた網膜幹/前駆細胞の作出. 第111回日本眼科学会総会. (大阪) 2007年4月.

##### 〔図書〕 (計2件)

- ① 山本直樹. 子どもに多い目の病気. 感染予防の必要性の有無と指導の実際. 心とからだの健康 10月号. pp14-19. 健学社 (東京) 2008年.
- ② 山本直樹. 物が見えるメカニズム・目の構造と目の疲れ. からだの不思議 11月号. pp2-5. 健学社 (東京) 2007年.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)

藤田保健衛生大学・共同利用研究施設・講師

研究者番号：00267957

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし