

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2010～2014

課題番号：22390327

研究課題名(和文) 眼疾患に対する遺伝子導入、細胞移植、再生医療を融合した新規治療の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment for eye diseases by use of combination with gene therapy, cellular therapy and reproducing medicine.

研究代表者

東 範行(AZUMA, Noriyuki)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：10159395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子・細胞治療関連として、1マウスでGFP発現細胞を網膜内に移植し、細胞の生着を評価した。2先天視神経・硝子体形成異常の家系において、エクソーム解析で候補遺伝子を特定した。3先天無虹彩を含む眼形成異常でPax6の変異を23例見出し、遺伝子のハプロ変異型と表現型の相関を明らかにした。再生医療関連として、1小児患者由来の網膜・虹彩から、iPS細胞を作成した。2 iPS細胞で、初期眼胞の形成、一部の網膜細胞への自己分化誘導に成功した。3ヒト皮膚線維芽細胞に遺伝子を導入し、網膜視細胞様細胞を分化誘導した。4ヒトiPS細胞から機能する軸索をもつ視神経細胞(網膜神経節細胞)の自己分化誘導に成功した。

研究成果の概要(英文)：On aspect of gene therapy and cellular therapy: 1. Successful engraftment of GFP-positive cells in mouse retina in vivo, 2. Identification of candidate gene in a family of novel congenital anomaly of the optic disc and vitreous by exome analysis, 3. Identification of Pax6 mutations in 23 cases with congenital eye anomalies. On aspect of reproducing medicine: 1. Generation of iPS cells from infantile iris and retina tissue, 2. Generation of the self-induced eye primordium and retina tissue from human iPS cells, 3. Generation of photoreceptor-like cells of the retina from human skin by introduction of external genes, 4. Generation of self-induced retinal ganglion cells with functional axons from human iPS cells.

研究分野：眼科学

キーワード：再生医学 遺伝学 遺伝子・細胞治療 角膜 網膜

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞・遺伝子治療は、血液疾患で骨髄移植が行われ、神経変性疾患で幹細胞の移植が試みられている。これらは、疾患の原因を除くに近い治療法であるが、眼科領域では、研究レベルでもごくわずかしが行われていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、再生医学、細胞移植と遺伝子治療の側面から眼組織（角膜、網膜）の治療法を開発することを目的とする。

(1) 遺伝子・細胞治療としては、眼組織に起こる疾患に対処すべく、遺伝子導入あるいは骨髄由来などの代用細胞移植によって欠損蛋白を組織特異的に発現させ、移植を行わない眼組織治療法を開発する。

(2) 恒常的に機能する組織再現のためには、さらに再生医学の技術が必要である。我々は既に、小児網膜芽細胞腫の患者で摘出された眼球から、分化能を有する前駆細胞を含む細胞集団を単離後、これまでに蓄積したニワトリやマウス研究からの知見や技術を応用して、角膜や網膜に分化する細胞作成に至っており、この眼組織を再生する技術を確立する。最終的には、自己細胞から作成した組織を移植し、拒絶反応の副作用が起こらない治療法を目指す。

3. 研究の方法

・ 遺伝子治療関連

1) Cre/loxPシステムと細胞固有遺伝子のプロモータを用いて組織特異的に遺伝子を発現させるシステムの開発

2) 代謝疾患の角膜・網膜病変に対する遺伝子導入による治療

・ 細胞治療関連

1) 代謝疾患のモデルマウスの角膜にマウス正常細胞を移植する代謝疾患の細胞治療

2) マウスの網膜にマウス正常細胞を移植する疾患の細胞治療

・ 再生医療関連

1) 形態形成遺伝子の疾患への関わりと機能の研究：現在までに発見した Pax6 や Eyes absent などの多くの遺伝子変異の機能解析、Pax6 の転写調節能を解析し下流遺伝子との関わりを検討、疾患で未知の遺伝子の変異検索。

2) ヒト小児患者由来の細胞を用いた角膜および網膜神経細胞への分化誘導系：小児ヒト角膜、虹彩、網膜から多分化能をもつ幹細胞を分離し、角膜内皮、視細胞を作製する。

3) ヒト iPS 細胞を用いた網膜神経細胞への分化誘導：iPS 細胞の培養条件を調整し、外的遺伝子を導入することなく、内的遺伝

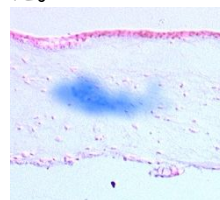
子の自己誘導で網膜神経細胞を作製する。

4. 研究成果

・ 遺伝子治療関連

1) Cre/loxPシステムと虹彩・網膜固有遺伝子のプロモータで組織特異的に遺伝子を発現させるシステムを開発した。

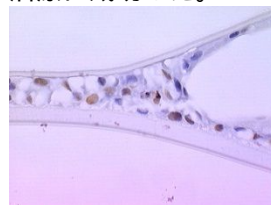
2) ムコ多糖モデルマウスで、上記システムを用いて欠損酵素を補充し、角膜混濁の治療に成功した。



角膜内での遺伝子発現

3) Cre/loxPシステムと水晶体固有遺伝子のプロモータで組織特異的に遺伝子を発現させるシステムを開発した。

4) 白内障手術家兎で、上記システムを用いて後発白内障（白内障手術後の水晶体上皮増殖）の治療に成功した。

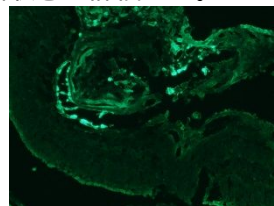


水晶体細胞のアポトーシス誘導

・ 細胞治療関連

1) ムコ多糖症モデルマウスの角膜に正常のマウス骨髄間葉細胞を移植して、欠損酵素の補充を行い、角膜混濁の治療を行った。

2) マウス実験で、GFP発現細胞を網膜内に移植し、病理標本の免疫染色によって細胞の生着状態を評価した。



マウス網膜内へのGFP発現細胞移植

・ 再生医療関連

1) 形態形成遺伝子の疾患への関わりと機能の研究で、Pax6 の転写調節能を解析し、その isoform が黄斑などの網膜の高次構造、水晶体の再生（後発白内障）に関与していることを明らかにした。

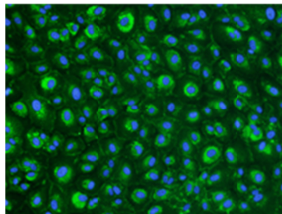
2) 先天無虹彩を含む眼形成異常における Pax6 の変異検索を行い、23例に見出した。網膜・視神経機能の詳細な検討を行い、遺伝子のハプロ変異型と表現型の重症度に

相関があることを明らかにした。In vitro ではreporter assayを行い、in vivoではin ovo electroporationを行った。これによって、片側アレルの遺伝子ナンセンス変異が網膜細胞の形成障害に關与していることを示した。

3) 網膜変性症の遺伝子変異の検索として、常染色体劣性遺伝の網膜色素変性症でEYSの、Leber 先天黒内障でRP65の新規遺伝子変異を発見した。

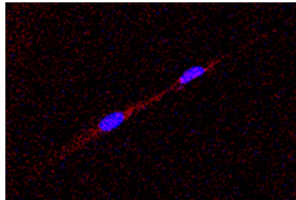
4) 先天視神経。硝子体形成異常、網膜視細胞形成異常において、エクソームによる遺伝子変異の検索を行った。視神経・硝子体形成異常の家系において、候補遺伝子を絞り込んだ。機能未知の遺伝子であり、今後ノックアウトマウスやノックインマウスを作成して検討する予定である。

5) ヒト小児患者由来の細胞を用いた角膜内皮の分化誘導系として、小児ヒト材料を用い、従来は分裂しないと考えられていた角膜内皮細胞の不死化・株化・シート化に成功した。この細胞は、細胞間接着能、Na-K ATPase 依存能動輸送による活動性水ポンプ作用があることが証明された。



不死化角膜内皮のシート

6) ヒト小児患者由来の細胞から網膜神経細胞への分化誘導系として、小児ヒト材料を用い、虹彩から多分化能をもつ幹細胞を分離し、形態形成遺伝子 CRX、RX、NEUROD の導入によって、網膜視細胞様細胞を in vitro で作成した。この細胞は繊毛構造をもち、パッチクランプ法によって光応答の活動電位発生がみられた。

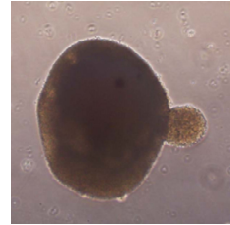


虹彩細胞から誘導した視細胞様細胞

7) ヒト皮膚線維芽細胞から網膜視細胞の分化誘導として、ヒト皮膚線維芽細胞に CRX RAX NEUROD を導入し、網膜視細胞様細胞を分化誘導した。視細胞のマーカを確認するとともに、パッチクランプ法で電気生理学的反応を検出した。

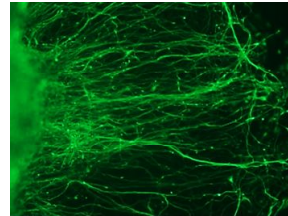
8) ヒトiPS細胞から網膜組織の分化誘導系として、ヒト皮膚由来iPS細胞から、外部遺伝子導入を行うことなく、培養条件による自己発現によって、眼胞様構造を

形成した。ここでは、Pax6やRxなどの眼形成遺伝子の発現が確認された。さらに、高濃度酸素の下で、不完全ながら神経網膜や色素上皮細胞に分化した。



ヒトiPS細胞から自己誘導した眼胞

9) ヒトiPS細胞から網膜組織の分化誘導系として、ヒト皮膚iPS細胞を浮遊培養した後、平面培養に移し、外因性遺伝子を導入することなく内因性遺伝子の誘導のみで、軸索をもつ網膜神経節細胞の自己分化誘導に成功した。作製した細胞は、すべての神経節マーカーをもち、軸索流やパッチクランプ法による電気生理学的反応が認められた。



ヒトiPS細胞から自己誘導した視神経細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計31件)

Hiraoka M, Takahashi H, Orimo H, Hiraoka M, Ogata T, Azuma N. Genetic screening of Wnt signaling factors in advanced retinopathy of prematurity. *Mol Vis*. 2010; 16:2572-2577.

Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Fukami M, Ogata T. Heterozygous OTX2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 756-764.

Yokoi T, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Azuma N. Risk factors for recurrent fibrovascular proliferation in aggressive posterior retinopathy of prematurity after early vitreous surgery. *Am J. Ophthalmol* 2010; 150: 10-15.

Wu J, Kubota J, Hirayama J, Nagai Y, Nishina S, Yokoi T, Asaoka Y, Seo J, Shimizu N, Kajiho H, Watanabe T, Azuma N, Katada T, Nishina H. p38 mitogen-activated protein kinase controls a switch between cardiomyocyte and neuronal commitment of murine embryonic stem cells by activating MEF2C-dependent BMP2 transcription. *Stem Cells Dev* 2010;19:1723-1734.

- Ito M, Yokoi T, Sugita S, Shinohara N, Nishina S, [Azuma N](#). Endogenous Candida chorioretinitis in a healthy infant. *Jpn J Ophthalmol* 2010;54:629-631.
- Fujinami K, Yokoi T, Hiraoka M, Nishina S, [Azuma N](#). Neovascularization in child following laser pinter-induced macular injury. *Jpn J Ophthalmol* 2010;54:631-633.
- Shoji K, Ito N, Ito Y, Inoue N, Adachi S, Fujimaru T, Nakamura T, Nishina S, [Azuma N](#), Saitoh A. Is a 6-week course of ganciclovir therapy effective for chorioretinitis in infants with congenital cytomegalovirus infection? *J Pediatr* 2010;157:331-333
- Tanaka M, Nishina S, Ogonuki S, Akaike S, [Azuma N](#). Nishida's procedure combined with medial rectus recession for large-angle esotropia in Duane syndrome. *Jpn J Ophthalmol*. 2011 55(3):264-267.
- Yamasaki T, Kawasaki H, Arakawa S, Shimizu K, Shimizu S, Reiner O, Okano H, Nishina S, [Azuma N](#), Penninger JM, Katada T, Nishina H. Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*. 2011; 31(46):16872-16883.
- Sawada M, Sato M, Hikoya A, Wang C-X, Minoshima S, [Azuma N](#), Hotta Y. A case of aniridia with unioocular Peters anomaly. *J AAPOS* 2011; 15:104-106.
- 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.
- 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.
- Hosono K, Ishigami C, Takahashi M, Park DH, Hirami Y, Nakanishi H, Ueno S, Yokoi T, Hikoya A, Fujita T, Zhao Y, Nishina S, Shin JP, Kim IT, Yamamoto S, [Azuma N](#), Terasaki H, Sato M, Kondo M, Minoshima M, Hotta Y. Two Novel Mutations in the *EYS* Gene Are Possible Major Causes of Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa in the Japanese Population. *PLoS One*. 2012;7(2):e31036. Epub 2012 Feb 17.
- Nishina S, Suzuki Y, Yokoi T, Kobayashi Y, Noda E, [Azuma N](#). Clinical features of congenital retinal folds. *Am J Ophthalmol* 2012;153(1):81-87.
- Kobayashi Y, Yokoi T, Yokoi T, Hiraoka H, Nishina S, [Azuma N](#). Fluorescein staining of the vitreous during vitrectomy for retinopathy of prematurity. *Retina* 2011; 31:1717-1719 .
- Nishina S, Kurosaka D, Nishida Y, Kondo H, Kobayashi Y, [Azuma N](#). Survey of microphthalmia in Japan. *Jpn J Ophthalmol*. 2012; 56:198-202.
- Nishina S, Kosaki R, Yagihashi T, [Azuma N](#), Okamoto N, Hatsukawa Y, Kurosawa K, Yamane T, Mizuno S, Tsuzuki K, Kosaki K. Ophthalmic features of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. *Am J Med Genet A*. 2012; 158A(3):514-518.
- Shigeyasu C, Yamada M, Mizuno Y, Yokoi T, Nishina S, [Azuma N](#). Clinical features of anterior segment dysgenesis associated with congenital corneal opacities. *Cornea*. 2012; 31:293-298.
- Nishina S, Tanaka M, Yokoi T, Kobayashi Y, [Azuma N](#). Stereopsis after early surgery for bilateral congenital cataracts. Update on Strabismology, Proceeding of the XIth meeting of the International Strabismological Association in Istanbul, Turkey, 282-286, 2012.
- Yokoi T, Toriyama N, Yamane T, Nakayama Y, Nishina S, [Azuma N](#). Development of a premacular vitreous pocket. *JAMA Ophthalmol*. 2013, 131(8): 1095-1096.
- ①Nakayama Y, Yokoi T, Nishina S, Okuyama M, [Azuma N](#). Electroretinography and spectral-domain optical coherence tomography detection of retinal damage in shaken baby syndrome. *J AAPOS*. 2013, 17(4): 411-413.
- ②[Azuma N](#), Ito M, Yokoi T, Nakayama Y, Nishina S. Visual outcomes after early vitreous surgery for aggressive posterior retinopathy of prematurity. *JAMA Ophthalmol*. 2013,;131(10):1309-1313.
- ③Seko 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*. 2014; 19:198-208.
- ④Tanaka M, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Noda E, Ito M, [Azuma N](#). Three Cases of rhegmatogenous retinal detachment associated with regressed retinoblastoma after conservative tumor therapy. *Retin Cases Brief Rep*. 2014; 8:223-226.
- ⑤Yamane T, Yokoi T, Nakayama Y, Nishina S, [Azuma N](#). Surgical outcomes of progressive tractional retinal detachment associated with familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 2014; 158:1049-1055
- ⑥Tanaka 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.
- ⑦Higuchi A, Ling QD, Ko YA, Chang Y,

Umezawa A. Biomaterials for the feeder-free culture of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. Chem Rev. 111(5):3021-3035, 2011.

⑳Hankowski KE, Hamazaki T, Umezawa A, Terada N. Induced pluripotent stem cells as a next-generation biomedical interface. Lab Invest. 91(7):972-977, 2011.

㉑Fukawatase Y, Toyoda M, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Higuchi A, Takubo K, Umezawa A. Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability. Sci Rep. 4:5421, 2014.

㉒Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N. A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples. Lab Invest. 95(1):4-13, 2015.

㉓Higuchi A, Ling QD, Kumar SS, Munusamy MA, Alarfaj AA, Chang Y, Kao SH, Lin KC, Wang HC, Umezawa A. Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material. Lab Invest. 95(1):26-42, 2015

〔学会発表〕（計11件）

東 範行：小児眼底の機能と構造の総合検査，第49回 日本網膜硝子体学会総会，大阪，2010.11

Yokoi T, Ui R, Ito M, Nakayama Y, Nishina S, Azuma N: Analysis of retinal structure and function in eyes with foveal hypoplasia.第50回 日本網膜硝子体学会総会，東京，2011.12

仁科幸子，横井 匡，中山百合，東 範行，松岡健太郎，中澤温子：胎生血管系遺残に網膜芽細胞腫を発症した1例．第38回日本小児眼科学会総会，広島，2012.7

横井 匡，中山百合，仁科幸子，東 範行：小児眼底疾患におけるSwept-Source OCTの有用性．第38回日本小児眼科学会総会，名古屋，2012.7

東 範行：視神経乳頭形成異常の構造と機能，Japan Macula Club，蒲郡，2012.8

松下五佳，近藤寛之，石橋真吾，田原昭彦，緒方 勤，仁科幸子，東 範行：真性小眼球におけるMFRP遺伝子の関与．第116回日本眼科学会総会，東京，2012.4

仁科幸子，伊藤牧子，横井 匡，中山百合，山根敬浩，東 範行，松岡健太郎，中澤温子：急速に増大する嚢胞を伴った小眼球症の治療経験．第37回日本小児眼科学会総会，名古屋，2012.6

Yamane T, Ito-Ui M, Yokoi T, Nakayama Y, Nishina S, Azuma N: Surgical outcomes

of tractional retinal detachment associated with familial exudative vitreoretinopathy. 第51回網膜硝子体学会総会，甲府，2012.11

横井 匡，東 範行：SS-OCTによる小児の眼底疾患所見—Pir-macular症候群の発生機序—
Japan Macula Club 蒲郡 2013.8

東 範行：眼の発生と進化 -さまざまな動物の眼やヒトの疾患から -
Retina-glaucoma meeting 東京，2012.5.27

東 範行：硝子体術者から見た網膜光凝固：適応、成績と限界 日本臨床眼科学会神戸 2014.11

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：網膜神経節細胞の作製方法

発明者：東 範行

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願2014-230157号

出願年月日：2014年8月8日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

東 範行 (AZUMA, Noriyuki)

国立成育医療研究センター 眼科・医長 / 視覚科学研究室・室長

研究者番号：10159395

(2)研究分担者

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)・感覚機能系障害研究部 視覚機能障害研究室・室長

研究者番号：60301157

梅澤 明弘 (UMEZAWA, Akihiro)

国立成育医療研究センター 再生医療センター 副所長・再生医療センター長

研究者番号：70213486