

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10913

研究課題名(和文) 網膜移植における視細胞シートの最適化の試み

研究課題名(英文) Development of new types of ES/iPS-retina for better synaptic integration

研究代表者

万代 道子 (Mandai, Michiko)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・副プロジェクトリーダー

研究者番号：80263086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は末期網膜変性病態にES/iPS由来網膜を移植することにより視機能の回復を目指しているが、そのためには移植組織内の視細胞と宿主網膜の内層の双極細胞がシナプスを効率よく作ることが大切であるが、しばしば移植組織内に残留する双極細胞が競合的に宿主と移植片のシナプス形成を阻害していると考えられる。しかし移植片内の視細胞が順調に成熟するためには移植片内の内層細胞もまた必要と考えられ、移植後のシナプスを形成するときに移植片の内層細胞が減少するような遺伝改変を加えた移植片を作成して移植したところ、よりよいシナプス形成と視機能改善が得られる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We are developing transplantation therapy of ES/iPS-derived retinas in end-stage retinal degeneration. We have observed a possibility that remaining inner neurons including bipolar cells in the graft could sometimes interfere with the synapse formation between the host bipolar cells and graft photoreceptors. Yet, these graft inner cells are also important for graft photoreceptors to functionally mature, so we produced genetically engineered graft retina in which graft inner or bipolar cells would degenerate at around the timing of synaptogenesis. By producing such iPS/ES-retina by deleting some gene involved in bipolar cell maturation, we could obtain a promising results suggestive of better synapse formation and visual function.

研究分野：再生医療 眼科学

キーワード：網膜変性 ES/iPS由来網膜 移植 遺伝改変 シナプス形成

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は遺伝的な背景により視細胞が特異的に変性する疾患であり、現在のところ末期にまで進行した変性状態から積極的に視機能を回復されるような治療法はない。網膜変性が進行しても、視細胞以外の網膜細胞はしばらくの間残存していることから、視細胞を移植することによりある程度の視機能が回復できることが期待される。我々はこれまでにマウスの末期網膜変性モデルを用いて、もうす ES/iPS 由来網膜組織を移植すると移植組織の中の視細胞が層構造を形成しつつ成熟し、視細胞も光受容体として重要な外節構造を形成して最終的な成熟形態を示すこと、さらに移植片内の視細胞がホストの双極細胞とシナプスを形成しうることを報告した。ただ、本来移植片内の視細胞はホスト網膜の内層にある双極細胞とシナプスを形成することが光受容シグナルをホストに伝えるためには必要となるが、移植片内にも内層の細胞が残存するため、しばしば移植片内でシナプスを形成してしまい、ホストと移植片の細胞が効率よく作られないことがある。過去の報告を調べると、双極細胞の成熟に関連する *Bhlhb4* や *Islet1* のような遺伝子を欠損させると、双極細胞や網膜内層の細胞が減少することが知られている。そこで我々はこれらの遺伝子を欠損させたような ES・iPS 細胞株を用意し、そこから網膜を分化させることにより、移植後に移植片内の双極細胞を実際に減らすことができるか、そして移植後のシナプス形成が良くなるかを検討することにより、移植によるよりよい機能的生着を目指せるか、臨床応用への基礎的研究を行うことにした。

2. 研究の目的

視細胞移植により、より良い視機能回復を目指して、より条件の良い移植片の開発を裏付けるための基礎研究を行う。具体的には双極細胞の成熟に関与し、そのマウス表現形として双極細胞が減少するような遺伝子を欠失させた遺伝的な改変株を作成することにより、移植後に移植片内の内層の細胞を減らし、より効率よくホストとシナプスを形成し、またより機能的な生着が得られるような移植組織が作成できるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

マウスの ES および iPS 細胞株で、*Bhlhb4* および *Islet1* の遺伝子欠損株を作成し、網膜への分化ができるかどうかを確認する。また移植後成熟し、実際に移植片内の双極細胞が減少するかどうか

確認する。さらにホストおよび移植片のシナプスを定量的に評価できるような系を、遺伝的ラベルをシナプス末端に導入することにより試みる。また多電極アレイを用いて光に対する移植後網膜の応答能を評価できる系を立ち上げ、遺伝改変株と wt 株由来それぞれの網膜移植後での機能を評価、比較する。

4. 研究成果

まずマウス iPS 細胞で *Bhlhb4* および *Islet1* 遺伝子を欠失させたところ、いずれも従来のプロトコルで野生株同様に網膜に分化した。またこの分化網膜組織を、マウスの末期網膜変性モデルに移植したところ、変性網膜下に生着し成熟することを確認した。さらにこれらの移植片の表現形を移植後に免疫組織学的に解析したところ、双極細胞が有意に減少していることを確認した。

次にシナプス形成を定量的に評価するために遺伝的標識を試みた。*Nrl* プロモーター下に前シナプスマーカーの一つである *CtBP2* と蛍光標識が発現するようマウス iPS 細胞株の *ROSA* 位に導入し、移植片内の視細胞シナプス末端の *CtBP2* タンパクが *tdTomato* で蛍光標識されるような細胞株を作成し、移植後のシナプス末端での実際の発現を確認した。ホスト側のマウスの双極細胞についてはシナプス末端の標識が困難であったため、双極細胞が蛍光ラベルされた末期網膜変性モデルマウスを掛け合わせにより作成した (*L7-GFP/rd*)。ここに後シナプスマーカーを免疫染色することにより、*GFP* 陽性のホスト双極細胞、*tdTomato* 陽性の移植視細胞末端、後シナプス免疫染色、の3者の共存によりホストグラフと間のシナプス形成を定量評価することが可能となった。続いて今度はシナプス末端標識株でのそれぞれの遺伝子欠損株を作成した。実際にシナプスを計数したところ、特に *Bhlhb4* 欠損移植片においてシナプス形成が促進される可能性が示唆された。

また、多電極アレイを用いて移植後網膜からの光応答の記録およびその解析方法を確立した。移植後網膜を取り出し、移植部位のホスト網膜神経節細胞を電極に接するように載せることにより、 $8 \times 8$  (64) 電極上での網膜細胞からの反応 (*mERG*) と脳に直接シグナルを送るホスト神経節細胞の反応の両者を記録することが可能となった。さらにスパイクソーティングと波形パターンのクラスタリングを行い、神経節細胞の反応を ON, OFF, ON-OFF と自動分類してカウントするプログラムを作成した。野生株の網膜組織で安定的に移植部位の網膜から *mERG* および神経節細胞の反応が記録で

きた。また、薬剤実験により、ON-阻害剤である L-AP4(mGluR6 agonist)でこれらの反応は遮断され、視細胞から入力された反応を見ていることが確認された。全視野照射刺激を用いて、野生株、遺伝改変株何においても良好な光応答反応が mERG およびホスト神経節細胞より記録された。この中で、Bhlhb4 で反応性が高くなっている可能性が示唆された。

#### 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3件)

Iraha S, Tu H.-Y., Yamasaki S, Kagawa T, Goto M, Takahashi R, Watanabe T, Sugita S., Yonemura S., Sunagawa A.G., Matsuyama T, Fujii M., Kuwahara A, Kishino A., Koide N., Eiraku M., Tanihara H., Takahashi M., Mandai M. Establishment of immunodeficient retinal degeneration model mice and functional maturation of human ESC-derived retinal sheets after transplantation. Stem Cell Reports,10.1059-1074, 2018 査読あり

Mandai M., Fujii M, Hashiguchi T, Sunagawa GA, Ito S, Sun J, Kaneko J, Sho J, Yamada C, Takahashi M. iPSC-derived retina transplants improve vision in *rd1* end-stage retinal degeneration mice Stem Cell Reports. 8:69-83, 2017 査読あり

Fujii M, Sunagawa GA, Kondo M, Takahashi M, Mandai M. Evaluation of micro Electroretinograms Recorded with Multiple Electrode Array to Assess Focal Retinal Function. Sci Rep. 6:30719, 2016 査読あり

[学会発表](計5件)

1. 万代道子 網膜末期変性モデルへのiPS由来網膜組織移植後の視機能評価  
ConBio2017 (2017年度生命科学系学会合同年次大会) 神戸ポートアイランド  
2017.12.08

2. 万代道子 IPS CELL-DERIVED RETINAL CELL TRANSPLANTATION World Congress of Neurology(WCN2017/第58回日本神経学会学術大会 国立京都国際会館 2017.09.20

3. 万代道子 Regeneration therapy using IPS-derived retinal cells EURETINA  
スペイン、バルセロナ2017.09.09

4. 万代道子 藤井桃 橋口朋代 砂川玄志郎 高橋政代 iPS 由来網膜移植後の機能検証 iPS 由来網膜移植後の機能検証 第121回日本眼科学会 東京国際フォーラム  
2017.04.06

5. 伊良波 諭、万代道子、渡邊健人、香川貴洋、後藤元人、高橋利一、山崎優、藤井桃、杉田直、桑原篤、松下恵三、小出直史、谷原秀信、高橋政代「超免疫不全網膜変性疾患モデルマウスの開発」第16回日本再生医療学会総会 仙台国際センター  
2017.3.7-9

6. 万代道子 末期変性網膜(rd1)へのiPSC-retina移植後の機能検証 第9回 Retina Research Meeting JPタワー東京  
2016.12.10

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 移植用細胞集団及びその製造方法  
発明者: 万代道子、高橋政代、山崎優  
権利者: 国立研究開発法人利権研究所 大日本住友製薬株式会社  
種類: 特許  
番号: 2016-229355  
出願年月日: 2016年11月25日  
国内外の別: 国内

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]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織 (1)研究代表者

万代道子 (Mandai Michiko)  
国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・副プロジェクトリーダー

研究者番号：80263086

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )