

平成 30 年 8 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15632

研究課題名(和文) iPS細胞から毛様体を再生し眼疾患を治療する

研究課題名(英文) Regeneration of ciliary epithelium for ocular novel treatment.

研究代表者

鈴間 潔 (Suzuma, Kiyoshi)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80335265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：2011年に故笹井芳樹先生らのグループよりマウスES細胞から網膜を組織として3次元的に再生できることが報告された(Eiraku M, Nature 2011:472:51)。我々は再生された網膜の周辺部に形態学的に毛様体組織と類似した構造があることを発見し、故笹井先生らのグループと共同で毛様体組織を効率的に再生する方法を開発することに成功した。本研究は再生毛様体を眼内に移植することにより眼球瘻の治療法開発、同時に房水にサイトカインや細胞生存因子を分泌させるという新しいドラッグデリバリーの方法を応用した眼疾患の治療法開発を目指す。今後は動物モデルへの移植研究を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：Dr. Sasai established induce 3D retina from mice ES cells (Eiraku M, Nature 2011:472:51) & human ES cells (Nakano T, Cell Stem Cell 2012:10:771). We generated ciliary body from mice ES & iPS cells (Kinoshita H, Suzuma K, Kaneko J, Mandai M, Kitaoka T, Takahashi M: Induction of Functional 3D Ciliary Epithelium-Like Structure From Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 2016:57:153-161), and ganglion cells (Maekawa Y, Onishi A, Matsushita K, Koide N, Mandai M, Suzuma K, Kitaoka T, Kuwahara A, Ozono C, Nakano T, Eiraku M, Takahashi M: Optimized culture system to induce neurite outgrowth from retinal ganglion cells in three-dimensional retinal aggregates differentiated from mouse and human embryonic stem cells. Curr Eye Res 2016:41:558-568). These technique may be a breakthrough for novel ocular drug delivery systems.

研究分野：眼科学

キーワード：iPS細胞 毛様体

1. 研究開始当初の背景

毛様体は眼球内の硝子体腔前方に位置し、房水産生を司る臓器である。外傷や眼内増殖で毛様体が障害されると眼球の形態を保てなくなる眼球癆という状態に陥るが現在の医学では眼球癆を治療することは不可能である(シリコンオイル注入で一時的に維持することはできる)。2011年に故笹井芳樹先生らのグループよりマウスES細胞から網膜を組織として3次元的に再生できることが報告され(Eiraku M, Nature 2011:472:51)、その後ヒトES細胞でも同様に作製できることが報告された(Nakano T, Cell Stem Cell 2012:10:771)。我々は再生された網膜の周辺部に形態学的に毛様体組織と類似した構造があることを発見し、故笹井先生らのグループと共同で毛様体組織を効率的に再生する方法を開発することに成功した(未発表・特許出願中)。本研究は再生毛様体を眼内に移植することにより眼球癆の治療法開発、同時に房水にサイトカインや細胞生存因子を分泌させるという新しいドラッグデリバリーの方法を応用した眼疾患の治療法開発を目指す。

本研究は上記のようにこれまで治療することができなかった終末期の治療法を開発することが目的であるが再生治療と遺伝子治療を組み合わせた次世代の治療法開発につながる可能性がある。例えば、加齢黄斑変性などの眼内血管増殖性疾患に対して抗VEGF療法が広く行われているが眼内に投与された薬物の半減期は短く、1~数か月の繰り返し投与を余儀なくされるため患者・医療者双方の負担が大きな問題となっている。抗VEGF作用を有する蛋白を発現する遺伝子をtetシステムのように体外から発現量をコントロールするプロモーターの下流に組み込んでiPS細胞に導入し、毛様体を再生することにより薬物の発現量や時期を外部からコントロールするデバイスとして移植することができる。成功すれば医療経済的にも大きく貢献できる可能性がある。

また現在失明原因の一位である緑内障においても、現状では複数の点眼薬で治療している状況であるが、眼内に移植した毛様体から緑内障治療薬を分泌させることにより患者のコンプライアンスが改善し、就寝中にも眼圧下降効果を得ることができる。同時に神経保護因子も分泌させれば理想的な緑内障治療法になると確信している。

山中伸弥教授によるiPS細胞の発見(Takahashi K, Cell 2006:126:663)、その後のノーベル賞の受賞という快挙もまだ記憶に新しいところであるが最近、高橋政代理化学研究所チームリーダーらのグループにより、ヒトiPS細胞から網膜色素上皮細胞のシートを作製し、実際の患者へ世界初の移植治療もおこなわれた。

現在再生医療に対する関心は高く、国内外問わずトピックスの分野である。特に世界初の

iPS由来網膜色素上皮移植が行われたこともあり、今後ますます様々な分化誘導された組織の移植が実現していくことになると思われる。創薬の面でも、iPS細胞はよい研究対象となる。我々の研究も、その最先端の研究の一つであり、現在治療困難な疾患に対するアプローチとして病因の解明、それから将来の臨床への応用といった意味でも非常に有意義であると確信している。

再生医療に関する世間の注目は日を追うごとに強くなっており、連日ニュースとなって難病患者の期待を集めている。世界中の多くの研究者が、自らの分野で将来の臨床応用を見据えた研究を行っている状況であるが、まだほとんどの研究が実用化には至らず、基礎研究の段階である。我々の今研究も同様に基礎研究の段階であるが、効果的な治療法がない疾患への希望をもたらすものと確信している。ただ、最先端研究でもあるが、倫理的な側面もあり、最善の注意を払い行う必要がある。また、特にヒト細胞からの分化誘導は長期にわたることが予想され、さらにその検証を行うには時間がより必要になるが、今後の研究に対しても有意義なものになると思われる。

以下のことを期間内に明らかにする。

(1) マウスES, iPS細胞での検討

マウスES、iPS細胞から眼杯へ分化させることで、まず神経外胚葉から眼領域への誘導をおこし、そこから眼領域の中でも網膜や周辺網膜(毛様体、虹彩)といった組織への分化を確認する。

(2) 再生毛様体組織の機能評価

毛様体上皮を組織培養し、毛様体に特徴的な機能(特に房水産生)を確認する。

(3) 再生毛様体の移植

眼疾患モデルへ再生毛様体を移植し機能評価を行う。

本研究の第1の特色は眼球癆という治療法のない終末期の救済を目指している点である。網膜機能が残存していても毛様体機能不全のために失明に至る例は少なからずある。第2の特色は毛様体が持っている生理的な房水産生作用をドラッグデリバリーに応用し、さらに導入遺伝子発現システムにより体外から発現量をコントロールするという点である。再生医療と遺伝子治療を組み合わせた次世代の治療法と言える。第3の特色は我々がこの研究遂行の上で非常に有利な立場にある点である。研究代表者は、網膜細胞・動物モデルを用いた最先端の技術を修得しており世界的にも認められている。細胞内シグナル関係では東京大学糖尿病代謝内科植木浩二郎准教授とも共同研究の予定である。iPS細胞では高橋政代先生(理化学研究所)、血管再生では植村明嘉先生(名古屋市立大学)と協力関係を築いている。このような状況より分子機構の解明から、臨床応用可能な段階まで速やかに研究が展開されることが約束されている。

現在再生医療への関心は高まっているが毛様体に着目しているのは我々のみよである。毛様体は眼球を維持するために必要不可欠な臓器であり、房水は眼内を循環する脳脊髄液に相当する組織液で、酸素や栄養分の供給も行っている。特に若年者に多いのは、重症の外傷で網膜機能が残存しているにもかかわらず毛様体機能不全のために失明に至る例である。一時的にシリコンオイルで眼球の形態を保つことは現在の医学でも可能であるため、毛様体を再生し移植する準備をする時間的猶予もあるため実臨床での活用も非常に期待できる。

眼球癆という終末期の治療方法開発に挑戦しているのも現在我々のみのよである。眼科手術や薬物治療の進歩により眼疾患の治療予後は近年目覚ましく改善したが失明に至る例は少なからず存在する。治療方法のない状況において最期の希望の灯をとることができるともかもしれない。

2. 研究の目的

毛様体は眼球内で房水という脳脊髄液に相当する分泌液を産生する臓器であり、重度の外傷や増殖性疾患で毛様体が障害され房水産生不全に陥るとその眼は失明に至る。iPS細胞から毛様体を再生し、それを眼内に移植することにより視機能を維持し、失明から救うことができる。さらに毛様体が持っている生理的な房水産生作用をドラッグデリバリーに応用する。導入遺伝子発現システムにより眼内で細胞生存因子や抗血管内皮増殖因子(VEGF)蛋白を産生させ、体外から発現量をコントロールすることにより眼球癆だけでなく他の眼疾患に対しても画期的な治療法となる。再生医療と遺伝子治療を組み合わせた次世代の治療法と言える。

3. 研究の方法

(1) マウス ES, iPS 細胞での検討

まずマウス ES、iPS 細胞から眼領域への誘導をおこし、そこから眼領域の中でも網膜や周辺網膜(毛様体、虹彩)といった組織への分化を確認する。

(2) 再生毛様体組織の機能評価

毛様体上皮組織を作製して、機能評価を行い、シグナル伝達の確認、阻害実験などを行う。効率よく再生毛様体を作成できる方法も検討する。

(3) 再生毛様体の移植

再生毛様体を動物眼に移植して機能することを確認する。

以下ではわかりやすく年度ごとに分けているが必要に応じて同時進行で研究を遂行する。

毛様体は主に正常な眼内圧の維持のため房水を産生する機能を持つが、毛様体筋やチン小帯により水晶体の位置や形状調節もおこなう。毛様体は実質と2層構造の上皮からな

り、上皮細胞は毛様体無色素上皮細胞と毛様体色素上皮細胞に分けられる。房水は毛様体実質から毛様体色素上皮細胞、さらに毛様体無色素上皮細胞から後房へと産生される。このように毛様体は、毛様体実質中の血液から毛様体上皮細胞(色素上皮と無色素上皮)を経由し、房水を産生していることになるが、実質と上皮は由来が異なる。実質は神経堤由来であるが、毛様体上皮はどちらも神経外胚葉由来である。さらに毛様体色素上皮と毛様体無色素上皮は対になっており、細胞間には物質の輸送にも関係するギャップジャンクションが存在する。

そこで我々は今回の研究において、まず網膜と同じ神経外胚葉由来である毛様体上皮の作製を目指し、そこから対になった毛様体色素上皮と毛様体無色素上皮の組織を作製することを目標とする。

平成 27 年度 マウス ES, iPS 細胞での検討 (鈴間、村上、宇治)

まずマウス ES、iPS 細胞から眼領域への誘導をおこし、そこから眼領域の中でも網膜や周辺網膜(毛様体、虹彩)といった組織への分化を確認する。

(1) マウス ES、iPS 細胞から眼杯へ分化させることで、まず神経外胚葉から眼領域への誘導をおこし、そこから眼領域の中でも網膜や周辺網膜(毛様体、虹彩)といった組織への分化を確認する。

(2) In vitro の系で、未分化な ES、iPS 細胞の維持、さらに浮遊培養にて眼領域への分化誘導を行う。細胞は Rx knock-in GFP ES line や *Nrlp*-eGFP transgenic iPS line を用いることで、眼領域、とりわけ網膜やその周辺組織への分化を蛍光色素にて確認できる。組織は免疫染色や PCR でも確認する。

(3) 毛様体上皮の分化誘導も適宜培養条件を検討しながら、効率的に行えるよう模索する。さらに誘導に必要なシグナルの検討ならびに阻害実験を行い、どのように修飾されるかを検討する。

(4) 異なるタイプの strain のマウスの ES、iPS 細胞でも同じ検討を行う。このことにより遺伝的背景がどの程度影響するかを検討できる。

平成 28 年度 毛様体組織の機能評価(鈴間、赤木、村上)毛様体上皮組織を作製して、機能評価を行い、シグナル伝達の確認、阻害実験などを行う。効率よく再生毛様体を作成できる方法も検討する。

(1) 免疫染色、PCR などで毛様体の房水産生に関するイオンチャンネルや膜トランスポーターの発現を確認する。

(2) 毛様体上皮を組織培養し水の輸送を確認する。マイクロインジェクションの手法を用いることにより細胞内の低分子の移動も観察する。

(3) トランスウェルを用いることにより分泌側でアスコルビン酸などの房水特有の成分が増加していることを確認する。

(4) tet システムに可溶性 VEGF レセプター 1 などのレセプターキメラを発現するベクターを組み込んで ES, iPS 細胞に導入し、再生毛様体を作成する。

平成 29 年度 再生毛様体の移植 (鈴間、赤木、宇治) 再生毛様体を動物眼に移植して機能することを確認する。

(1) 再生毛様体をマウスの眼内に注入することにより生着するかどうかを組織学的に検討する。

(2) ウサギを用いて再生毛様体の作成、眼内への移植を行う。

(3) サルを用いて再生毛様体の作成、眼内への移植を行う。

研究が当初計画どおりに進まない時の対応: 毛様体からの増殖因子や細胞生存因子の産生がうまくいかない場合は発現ベクターの膜移行シグナルや分泌シグナルの配列を変更する。Ang1 やアディポネクチンのように多量体を作るとうまく機能することもある。動物実験は計画通りにいかないことも多いが、動物種やモデルを適宜変更すると成功することも多い。

4. 研究成果

マウス ES, iPS 細胞から眼領域への誘導をおこし、そこから眼領域の中でも網膜や周辺網膜 (毛様体、虹彩) といった組織への分化を確認することができている。特に再生網膜の周辺部に毛様体様の組織が発生することが明らかとなり、効率的な再生ができるようになった。さら GSK-3beta の阻害剤を用いるとさらに毛様体の領域が拡大した。tankyrase 阻害剤で GSK-3beta 阻害剤の効果をリバースできたことから、beta-catenin の経路を介して毛様体の再生が促進されていることも証明した。再生された毛様体の機能を確認するために水の輸送を色素希釈法にて行った。

また研究中に iPS 細胞からの神経節細胞の再生に成功した。具体的には、**マウス・ヒト幹細胞由来の分化 3 次元網膜様組織を用いて、RGC 軸索伸長モデルを確立した (Curr Eye Res 2015)**。この手法は、3 次元網膜様組織を網膜器官培養の如く接着培養して RGC の軸索伸長を誘導する方法であり、培地添加物および接

着面被覆を調整することで、他種の細胞の浸潤や軸索の退縮を抑制して軸索のみの伸長を、あるいはグリア様の細胞と運動した RGC 神経突起の伸長を、各々観察することが可能になった。また、シングルセルへの分離や FACS・MACS 等による選別といった、細胞障害性の高い工程を要さないため、簡便で効率的な解析方法になることを期待している 3 次元網膜様組織では、幹細胞から形成した胚様体から網膜前駆細胞で構成される眼胞様構造体が発芽し、同部で神経網膜を構成する細胞群が分化する (Cell stem cell 2012) が、眼胞様以外の部位からも神経系細胞への分化・神経突起の伸長は観察される。これらの網膜由来とは言い難い細胞・突起を除外する為、眼胞様構造体のみを切離する方法を選択している。

さらに、培養条件によって、接着面に神経突起以外の細胞の浸潤を抑制したり、あるいはグリア様の細胞の広がりとともに RGC の神経突起が伸長し萎縮を抑制することが可能になった。前者では神経突起の観察が容易になり、また他の細胞との直接接触による影響を排除することができるため、薬理活性などの検討に有利であると考えられる。後者では、グリア細胞の神経突起伸長への影響を検討できる可能性がある。網膜由来のグリア細胞であるミュラー細胞は、RGC の生存および神経突起伸長に重要な役割を果たしており (Brain Res 1986)、ミュラー細胞を介した神経保護治療も模索されている。また網膜前駆細胞からのミュラー細胞の分化は発生後期 (Trends Neurosci 2002) だが、この分化と RGC の生存や軸索伸長に対する関係は未だ明らかでない。

加えて、マウス幹細胞由来の分化 3 次元網膜様組織を用いた RGC 軸索伸長に関しては、申請者らの他に報告はない。実験動物の網膜器官培養では一度 RGC の軸索を視神経乳頭部で切離する為、軸索傷害による影響やロスが懸念される。網膜発生過程に近似した分化を示す 3 次元網膜様組織を用いることで、発生過程での神経突起伸長を詳細に解析することが期待できる。

RGC 神経突起伸長に関する、あらゆる解析に応用できるよう培養条件の更なる最適化を行い、ヒト・マウス発生期の神経突起伸長への神経保護因子やガイドライン因子、細胞外基質、グリア細胞の影響とその作用機序を検討することは、網膜神経節細胞の再生及び神経保護治療に関する新たな知見につながる可能性があり、この研究の意義は非常に大きいと確信する。

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 2 件)

Kinoshita H, Suzuma K, Kaneko J, Mandai M,

Kitaoka T, Takahashi M: Induction of Functional 3D Ciliary Epithelium-Like Structure From Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 2016;57:153-161.

Maekawa Y, Onishi A, Matsushita K, Koide N, Mandai M, Suzuma K, Kitaoka T, Kuwahara A, Ozone C, Nakano T, Eiraku M, Takahashi M: Optimized culture system to induce neurite outgrowth from retinal ganglion cells in three-dimensional retinal aggregates differentiated from mouse and human embryonic stem cells. Curr Eye Res 2016;41:558-568.

〔産業財産権〕

出願状況(計 なし件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴間 潔(SUZUMA Kiyoshi)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 80335265

(2) 研究分担者

赤木 忠道(AKAGI Tadamichi)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 30580112

村上 智昭(MURAKAMI Tomoaki)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 50549095

宇治 彰人(UJI Akihito)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 60534302

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

北岡 隆(KITAOKA Takashi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授

藤川 亜月茶(FUJIKAWA Azusa)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・講師

築城 英子(TSUIKI Eiko Tsuiki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・講師

松本 牧子(MATSUMOTO Makiko Matsumoto)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

木下 博文(KINOSHITA Hirofumi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

前川 有紀(MAEKAWA Yuki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

劉 美智(RYU Michi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・大学院生

高見 由美子(TAKAMI Yumiko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・実験助手

浜崎 幸子(HAMAGUCHI Sachiko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・実験助手

高橋 政代(TAKAHASHI Masayo)
理化学研究所・チームリーダー