

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15640

研究課題名(和文)再生医療技術を用いた視神経移植の研究

研究課題名(英文)Transplantation of retinal ganglion cells generated from iPS and ES cells

研究代表者

東 範行(Azuma, Noriyuki)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・感覚器・形態外科部・医長

研究者番号：10159395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトおよびマウスのiPS細胞、ES細胞から、網膜神経節細胞を作製した。網膜神経節細胞は構造的にも機能的にも成熟していた。その単離培養にも成功した。この網膜神経節細胞を、視神経を傷害したマウスに移植した。ドナー細胞は網膜内に生着するとともに、視神経入口部に向かって軸索を伸ばし、一部は視神経内に侵入した。網膜神経節細胞の軸索の複雑な経路探索について、誘導物質Sem3AやSlit1の評価を行った。各化合物をビーズに浸透させて局所で徐放したところ、軸索は化合物に応じて屈曲し経路を変更した。小型動物実験においては、網膜神経節細胞を移植し、その軸索を視神経内に誘導し経路をコントロールする可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We generated self-induced retinal ganglion cells (RGCs) with functional axons from human and murine iPS and ES cells. Axons extended radially from the margin of the clump. Induced RGCs expressed specific markers by quantitative PCR and immunohistochemistry. The long, prominent axons contained neurofilaments and tau, and manifested anterograde axonal transport and sodium-dependent action potentials. The ability to generate RGCs with functional axons uniformly and at a high rate may contribute to treatment of various optic nerve diseases that threaten vision. We transplanted the RGCs into the murine retina after damaging the optic nerve. The RGCs were successfully engrafted and radiated their axons into the damaged optic nerve. Pathfinding of axons were in vitro evaluated by slow release of Sem3A and Slit1 from beads inserted in the colony of RGCs. Axons were bended in accordance with guidance of chemical agents. These finding suggests a possibility of transplantation of RGCs.

研究分野：眼科学

キーワード：視神経 網膜神経節細胞 iPS細胞 ES細胞 再生医学

### 1. 研究開始当初の背景

視神経は(網膜神経節細胞の軸索)にはさまざまな疾患があり、重篤な視力障害を起こすが、治療法はない。これまでに視神経の再生医療に関する研究はほとんど行われてこなかった。iPS細胞やES細胞を用いた網膜の再生医療研究は、視細胞や色素細胞などの外層を分化させることはできるが、軸索をもつ網膜神経節細胞の作製にはどこも成功していない。我々は初めて、ヒトやマウスiPS細胞、ES細胞から、機能をもつ長い軸索を有する網膜神経節細胞を自己分化誘導させることに成功した。これは移植可能な初めての網膜視神経細胞である。

### 2. 研究の目的

本研究では、我々が初めて作製したヒトあるいはマウスのiPS細胞、ES細胞由来の機能をもつ長い軸索を有する網膜神経節細胞を用いて視神経障害モデル動物への移植実験を行い、視神経の再生医療の可能性を探求することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) ドナーとなるiPS細胞或いはES細胞由来の網膜神経節細胞の調整

既に移植のドナーとなる網膜神経節細胞はヒト或いはマウス由来のiPS細胞或いはES細胞から作製されている。マウスES細胞はGFPマウス由来なのでGFP標識ができるが、他は蛍光色素等による細胞膜生体染色を用いる。また、網膜神経節細胞は胚葉体コロニーの外縁で分化するので、純粋なドナー組織を得るために、その単離技術を、機械的あるいは抗体を用いた分離によって開発する。

#### 2) レシピエントとなる視神経障害モデル動物の作製

障害された視神経の構造および機能復元を目的とする

ので、レシピエントはさまざまなマウスあるいはラットの視神経障害モデルへ移植を用いる。具体的には、遺伝性高眼圧緑内障モデル(DBA/2Jマウス)、さまざまな遺伝子のノックアウト・変異導入マウス、薬剤誘発障害モデル(NMDA、グルタミン酸など)、虚血性視神経症モデル、視神経挫滅モデル、自己免疫性視神経炎モデル、脱髄モデル(Shivererマウス)などである。また、ヒトiPS細胞或いはES細胞由来の網膜神経節細胞の移植では、免疫不全マウスを用いる。

#### 3) 移植実験

細胞懸濁液の硝子体内注射或いは毛様体から硝子体内へコロニーの移植を行う。予備実験では後者が生着・分化共に良好である。ドナーの網膜内生着を促すためにプラスミン等による網膜硝子体界面分離、内境界膜の菲薄化を検討した。

#### 4) 病理組織学的検討

ドナーのレシピエント網膜内での生着、自己分化、双極細胞とのシナプス形成、視神経内へのaxon伸長、中枢外側膝状体とのシナプス形成について、免疫染色、電子顕微鏡を含

めて病理組織学的に検討する。

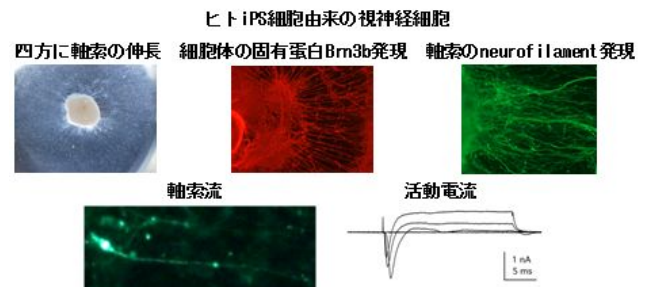
#### 5) 軸索の経路探索のin vitro実験

経路誘導物質Sem3AやSlit1の評価を行った。各々の化合物をビーズ等に浸透させて、コロニーの近傍や内に置いて局所で徐放し、軸索の伸長形態によって検討した。

### 4. 研究成果

#### 1) ドナーとなるiPS細胞或いはES細胞由来の網膜神経節細胞の調整

ヒトおよびマウスのiPS細胞或いはES細胞から網膜神経節細胞を安定して作製することに成功した。作製した細胞は特異マーカーをすべて発現し、超微細構造から構造的に、軸索流や電気生理学的な機能的にも成熟していた。作製効率は90%以上で、50日以上生存することができる。これによって、初めて機能する長い軸索をもつ視神経細胞の研究を行えるようになった。さらに、免疫選択によって、網膜神経節細胞を単離培養することにも成功した。



#### 2) レシピエントとなる視神経障害モデル動物の作製

今回のレシピエントは、視神経挫滅モデルと薬剤誘発障害モデル(NMDA、グルタミン酸など)を用いた。ヒト細胞の移植では、免疫不全マウスを用いた。

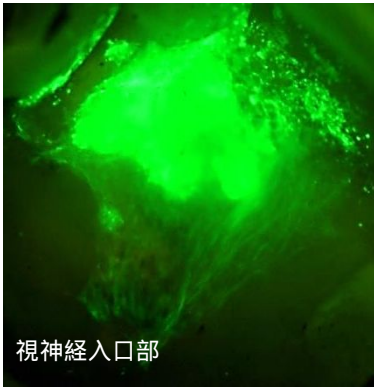
#### 3) 移植実験

細胞懸濁液の硝子体内注射或いは毛様体から硝子体内へ網膜神経節細胞の移植を行った。ことに、免疫選択によって単離培養した網膜神経節細胞の移植では、ドナー細胞は網膜内に生着するとともに、視神経入口部に向かって軸索を伸ばし、一部は視神経内に侵入した。

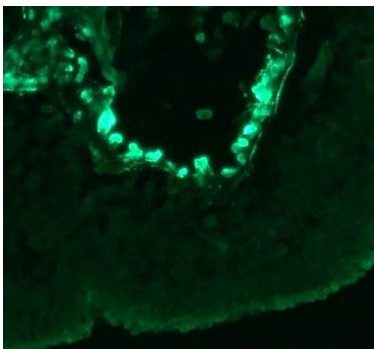
#### 4) 病理組織学的検討

病理組織学的によって、ドナー細胞が網膜内に生着するとともに、視神経入口部に向かって軸索を伸ばし、一部は視神経内に侵入していることが確認された。

## ドナー細胞の軸索の視神経入口部への伸長



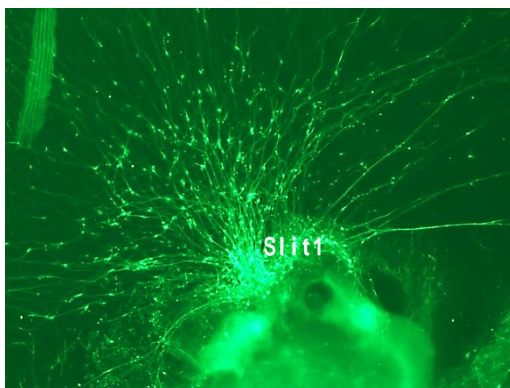
## ドナー細胞の網膜内生着と軸索の伸長



### 5) 軸索の経路探索の in vitro 実験

経路誘導物質 Sem3A や Slit1 の評価を行った。各々の化合物をビーズ等に浸透させて、コロニーの近傍や内に置いて局所で徐放したところ、軸索は化合物に応じて屈曲し経路を変更した。この方法で化合物を徐放させれば、網膜神経節細胞の移植で軸索を視神経内や視交叉へ誘導することが可能となる。

### コロニー内に挿入したビーズからの Slit1 徐放による軸索の屈曲



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計15件)

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  
Nagamoto T, Oshika T, Fujikado T, Ishibashi T, Sato M, Kondo M, Kurosaka D, Azuma N. Clinical characteristics of congenital and developmental cataract undergoing surgical treatment. *Jpn J Ophthalmol*. 2015 May;59(3):148-56. doi: 10.1007/s10384-015-0370-8. Epub 2015 Jan 23.

Nagamoto T, Oshika T, Fujikado T, Ishibashi T, Sato M, Kondo M, Kurosaka D, Azuma N. A survey of the surgical treatment of congenital and developmental cataracts in Japan. *Jpn J Ophthalmol*. 2015 Jul;59(4):203-8. doi: 10.1007/s10384-015-0385-1. Epub 2015 May 15.

Katagiri S, Yokoi T, Nishina S, Azuma N. Structure and morphology of radial retinal folds with familial exudative vitreoretinopathy. *Ophthalmology*. 2015 Oct 15. pii:

S0161-6420(15)00984-7. doi: 10.1016/j.ophtha.2015.09.010. [Epub ahead of print] 123 (3) 666-8,2016  
Yokoi T, Nakayama Y, Nishina S, Azuma N. Abnormal traction of the vitreous detected by swept-source optical coherence tomography is related to the maculopathy associated with optic disc pits. doi: 10.1007/s00417-015-3114-z. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 254(4):675-82.,2016

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;3:15052.

doi:10.1038/hgv.2015.52  
Yokoi T, Nakayama Y, Nishina S, Azuma N. The role of vitreoretinal traction in the pathogenesis of maculopathy associated with optic disc pits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2016 ;254:1859-1860. doi:10.1007/s00417-016-3380-4

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;57:3348-3359. doi:10.1167/iovs.16-19166.

Nakayama Y, Katagiri S, Yokoi T, Ui M, Nishina S, Azuma N. Successful scleral buckling of late-onset visual decrease in eye with retinal folds. *Doc Ophthalmol*. 2016; 133:145-149.  
doi:10.1007/s10633-016-9559-5  
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. *Curr Eye Res* 2017;42(1):145-154  
doi:10.3109/02713683.2016.1143015.  
Katagiri S, Yokoi T, Mikami M, Nishina S, Azuma N. Outer retinal deformity detected by optical coherence tomography in eyes with foveal hypoplasia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2016; 254:2197-2201.  
doi:10.1007/s00417-016-3385-z  
Yaguchi Y, Katagiri S, Fukushima Y, Yokoi T, Nishina S, Kondo M, Azuma N. Electroretinographic effects of retinal dragging and retinal folds in eyes with familial exudative vitreoretinopathy. *Sci Rep*. 2016;6:30523.  
doi:10.1038/srep30523.  
Katagiri S, Tanaka S, Yokoi T, Hayashi T, Matsuzaka E, Ueda K, Yoshida-Uemura T, Arakawa A, Nishina S, Kadosono K, Azuma N. Clinical features of a toddler with bilateral bullous retinoschisis with a novel RS1 mutation. *American Journal of Ophthalmology Case Reports*, 5:76-80,2017  
doi:10.1016/j.ajoc.2016.12.009  
Okamoto-Uchida Y, Yu R, Miyamura N, Arima N, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Yoshida S, Hosoya T, Nawa M, Kasama T, Asaoka Y, Alois RW, Elling U, Penninger JM, Nishina S, Azuma N, Nishina H. The mevalonate pathway regulates primitive streak formation via protein farnesylation. *Sci Rep* 2016;6:37697.  
doi:10.1038/srep37697.  
Yoshida-Uemura T, Katagiri S, Yokoi T, Nishina S, Azuma N. Different foveal schisis patterns in each retinal layer in eyes with hereditary juvenile retinoschisis evaluated by en-face optical coherence tomography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017,

255(4):719-723. doi:  
10.1007/s00417-016-3552-2.

[学会発表] (計 19 件)

東 範行 : サブスペシャリティーサンデー「視機能・小児眼科・眼腫瘍」. 第 119 回日本眼科学会総会 ロイトン札幌 2015.4.16~19  
東 範行 : iPS 細胞と ES 細胞からの網膜神経節細胞の作製. 第 17 回 Japan Macula Club. 蒲郡クラシックホテル(愛知) 2015.8.22~23  
東 範行 : シンポジウム 眼科臨床の最先端-失明者ゼロを目指して. 未熟児網膜症. 第 69 回日本臨床眼科学会 名古屋国際会議場(愛知) 2015.10.22~25  
仁科幸子、八木橋めぐみ、萬束恭子、鹿田千尋、赤池祥子、越後貫滋子、上村朋世、横井匡、東 範行. 先天眼疾患における黄斑異常と両眼視機能. 第 71 回日本弱視斜視学会総会・第 40 回日本小児眼科学会総会合同学会, ポートピアホテル(兵庫), 2015.7.3~4  
上村朋世、八木橋めぐみ、横井匡、仁科幸子、東 範行. 急性網膜壊死が疑われた眼サルコイドーシスの一例. 第 71 回日本弱視斜視学会総会・第 40 回日本小児眼科学会総会合同学会, ポートピアホテル(兵庫), 2015.7.3~4  
上村朋世、横井匡、仁科幸子、東 範行. 両眼の収縮性乳頭周囲ぶどう腫の 1 例. 第 69 回日本臨床眼科学会, 名古屋国際会議場(愛知) 2015.10.22~25  
小澤紘子、山根みお、上村朋世、八木橋めぐみ、片桐聡、横井匡、中山百合、仁科幸子、東 範行. 小児の発達緑内障の治療成績に関する検討. 第 69 回日本臨床眼科学会, 名古屋国際会議場(愛知) 2015.10.22~25  
Katagiri S, Yokoi T, Nishina S, Azuma N. Distinguished papers symposium 1.:Detailed structure and morphology from retinal dragging to radial retinal folds associated with familial exudative vitreoretinopathy. 第 54 回日本網膜硝子体学会, 東京国際フォーラム(東京), 2015.12.4~6  
東 範行 : ヒト iPS 細胞から網膜神経節細胞の作製. 千寿製薬研究所セミナー 第 71 回日本弱視斜視学会総会・第 40 回日本小児眼科学会総会合同学会, ポートピアホテル(兵庫), 2015.7.3~4  
東 範行 : iPS 細胞による視神経の研究. 第 36 回西中国眼疾患フォーラム.ANA クラウンプラザホテル宇部(山口) 2015.11.26  
吉田朋世、仁科幸子、横井匡、鹿田千尋、萬束恭子、赤池祥子、越後貫滋子、東 範行. 乳児内斜視早期手術後の両眼視機能.

第 72 回日本弱視斜視学会総会・第 41 回日本小児眼科学会総会合同学会, パシフィコ横浜, 2016.6,24-25 口頭  
細野克博、仁科幸子、宮道大督、横井匡、彦谷明子、佐藤美保、簗島伸生、深見真紀、東範行、堀田喜裕. 次世代シーケンサーを用いたレーバー先天盲の 1 家系 3 症例の遺伝子変異解析. 第 72 回日本弱視斜視学会総会・第 41 回日本小児眼科学会総会合同学会, パシフィコ横浜, 2016.6,24-25 口頭  
萬束恭子、松岡真未、新保由紀子、赤池祥子、越後貫滋子、片桐聡、吉田朋世、横井匡、仁科幸子、東範行. 斜視を伴う小児に対する Spot Vision Screener の使用経験. 第 57 回日本視能矯正学会, 大阪国際会議場, 2016.10,15-16 口頭  
富田匡彦、横井匡、吉田朋世、高橋真理、片桐聡、仁科幸子、東範行. 網脈絡膜コロボーマの Swept-Source 光干渉断層計像. 第 70 回日本臨床眼科学会, 京都国際会議場, 2016.11,3-6 口頭  
高橋真理、富田匡彦、吉田朋世、片桐聡、横井匡、仁科幸子、東範行. 家族性滲出性硝子体網膜症の黄斑上膜に硝子体手術を行った 4 例. 第 70 回日本臨床眼科学会, 京都国際会議場, 2016.11,3-6  
Yoshida T, Katagiri S, Yokoi T, Nishina S, Azuma N. Swept-Source OCT Images of Morning Glory Disc Anomaly and Allied Diseases. Distinguished Papers Symposium, 第 55 回日本網膜硝子体学会, ベルサール渋谷ガーデン (東京), 2016.12,2-4  
宮道大督、仁科幸子、細野克博、横井匡、倉田健太郎、彦谷明子、簗島伸生、佐藤美保、深見真紀、堀田喜裕、東範行. *RPGRIP1* 遺伝子異常による Leber 先天盲の 1 家系 3 症例の臨床像. 第 55 回日本網膜硝子体学会, ベルサール渋谷ガーデン (東京), 2016.12,2-4  
東範行: 講演: 小児眼底疾患の構造と機能の検査による病態の理解 第 120 回日本眼科学会総会 モーニングセミナー 仙台国際センター 2016,4,7-10  
東範行: 特別講演: iPS 細胞・ES 細胞からの視神経細胞の誕生と臨床応用 第 57 回日本視能矯正学会 大阪国際会議場 2016,10,15-16

#### [産学財産権]

出願状況(計 2 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: 特願2014-230157  
出願年月日: 2014.11.12  
国内外の別: 国内

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: PCT/JP2015/072463  
出願年月日: 2015.8.7  
国内外の別: 国外

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

東 範行 (AZUMA, Noriuki)  
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

横井 匡 (YOKOI, Tadashi)  
国立成育医療研究センター 眼科・視覚科学研究室・医員  
研究者番号: 80514025