

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16964

研究課題名（和文）中心視力を守る新規網膜黄斑治療に向けたiPS細胞3次元培養による錐体視細胞の解析

研究課題名（英文）Analysis of cone photoreceptors which determine central vision using iPSC-derived organoids

研究代表者

戸田 枝里子 (TODA, Eriko)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・研究員

研究者番号：90722992

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、錐体視細胞の形成と維持のメカニズムを解明のために、ヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）を用い、3次元培養により網膜組織を分化誘導し、網膜錐体視細胞を選択的に取り出して解析する系を立ち上げた。まず、ヒトiPS細胞の時点でゲノム編集を行い、錐体視細胞に分化誘導すると蛍光を発するiPS細胞を作製した。これを用いて3次元培養により網膜組織を作製したうえで細胞を分散させ、蛍光標識をガイダンスとしてフローサイトメトリーを用いて錐体視細胞を回収する実験系を立ち上げた。これにより、錐体視細胞の移植治療および保護治療の開発の基盤となるデータを得ることにつながる基盤となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の高齢化社会で増加した加齢黄斑変性は、網膜の中心である黄斑部を障害し、失明原因として国内第4位、米国の第1位を占める。視力確保のためには黄斑部網膜視細胞、すなわち錐体視細胞に対する介入治療が必須であるが、マウスには黄斑がなく錐体視細胞の研究はまだあまり進んでいない。そこで、ヒト細胞を用いて錐体視細胞の形成と維持のメカニズムを解明する本研究は、将来の新規網膜黄斑部治療の開発につながる大きな意義を持つ。ヒトiPS細胞を使い、より生体に近い3次元組織培養を用いて、蛍光標識により選択的に回収した錐体視細胞を解析する本研究は、人類の中心視力確保というニーズに即した社会的意義のある研究である。

研究成果の概要（英文）：We established an experimental system to analyze cone photoreceptor cells selectively, using human iPSC cells and the organoid culture. We performed genome editing in iPSC cells to label cone photoreceptor cells with fluorescence after differentiation. Then, we cultured retinal organoids to selectively collect the cone photoreceptor cells by flow cytometry. The system would help analyze the basic data for future development of transplantation and neuroprotective therapy.

研究分野：網膜研究

キーワード：加齢黄斑変性 iPS細胞 3次元培養

1. 研究開始当初の背景

(1)本研究の学術的背景、研究課題の核心をなす学術的「問い」

加齢黄斑変性(age-related macular degeneration; AMD)は、先進国における主要な失明原因の1つであり、加齢とともに増加する、現代の高齢化社会においては、重要な社会的な問題である。網膜(眼底)の中心である黄斑部に新生血管が発生すると滲出型(図1上)、原因不明の萎縮を生じると萎縮型に分類される。いずれも、最終的に黄斑部の神経網膜を障害し、視線を向けた中心が歪んだり暗くなったりする中心視力の低下を引き起こし(図1下) 読書や運転に支障をきたす。

黄斑部の神経網膜には、光受容体である網膜視細胞のうち、感度が高く色も見分ける錐体視細胞が集中して存在し、中心視力を決める。現行のAMD治療は錐体視細胞に隣接して発生する新生血管の抑制が目的で、新生血管からの滲出性変化により障害される錐体視細胞を標的としたものは無く、後遺症が残ることが多い。萎縮型には治療が無い。黄斑・錐体視細胞に対する治療が切望されるが、マウスには黄斑が無く、研究はあまり進んでいない。すなわち、錐体視細胞の発生や生理についてはまだあまり分かっておらず、将来の新規黄斑部神経網膜の治療の開発のためには、錐体視細胞の知見をそろえることが必須である。

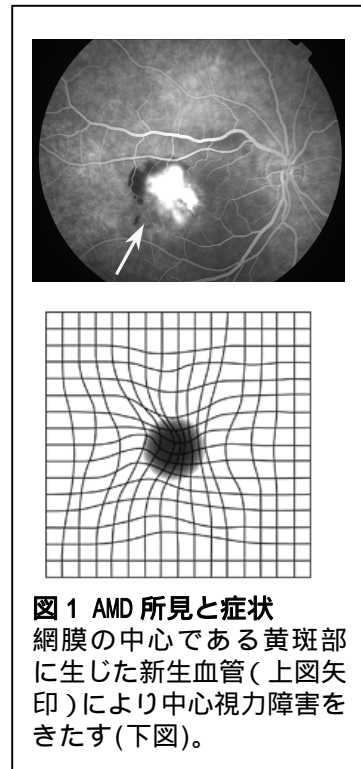


図1 AMD 所見と症状
網膜の中心である黄斑部に生じた新生血管(上図矢印)により中心視力障害をきたす(下図)。

一方、京都大学の山中らが人工多能性幹細胞(induced-pluripotent stem cell; iPS細胞)を作製し(Takahashi, Yamanaka Cell 2006)、理化学研究所の笹井らが幹細胞からの3次元網膜組織培養法を開発した(Eiraku, Sasai et al. Nature 2011)ことにより、ヒトサンプルを採取しにくい網膜を含む神経系等の臓器・組織の研究を、新しい手法で推進できるようになった。特定の細胞に分化誘導した際に蛍光を標識する遺伝子編集をiPS細胞に施す方法を用いて、標識iPS細胞を3次元網膜組織培養すれば、ヒト錐体視細胞の解析が可能となる。

なお、これまでにマウスを用いて解析された錐体視細胞の知見には、下記のものがある。

錐体・桿体視細胞は、いずれも網膜前駆細胞が最終分裂後に共通の転写因子 cone rod homeobox (CRX)を発現し始める。CRX陽性細胞のうち *Onecut1*, *Thrb*, *RXR* を発現すると錐体視細胞に分化して最終的に cone opsin を発現する(図2)。

一方、これらを発現せずに *Nrl* を発現すると桿体視細胞に分化して

rhodopsin を発現する (Emerson Cepko et al. Dev Cell 2013)(図2)。錐体視細胞は桿体視細胞と比べ、より発生早期に最終分裂を終える。桿体視細胞由来の Rod-Derived Cone Viability Factor (RdCVF)は錐体視細胞の生存因子とされる(Ait-Ali et al. Cell 2015)。

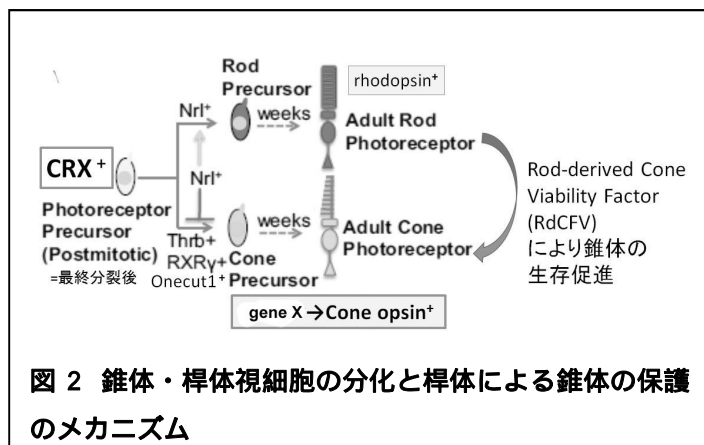
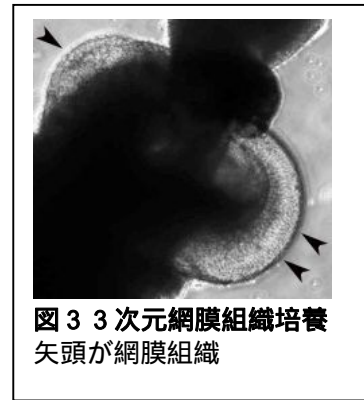


図2 錐体・桿体視細胞の分化と桿体による錐体の保護のメカニズム

(2)本研究の目的および学術的独自性と創造性

本研究は網膜黄斑部を形成する錐体視細胞の研究であり、少数の錐体視細胞はあるものの黄斑がないマウスモデルでは研究困難で、未知の部分が多い分野である。これに対し、ヒト iPS 細胞を使い、より生体に近い 3 次元組織培養(図 3)を用いて、蛍光標識により選択的に回収した錐体視細胞を解析する本研究は、学術的独自性・新規性が高い。黄斑研究は世界的にも、まだあまり行われておらず、人類の中心視力確保というニーズに即した研究につながる。さらに、このヒト iPS 細胞を用いた 3 次元組織培養の方法を発展させた研究手法が成功すれば、今後の iPS 研究のモデルケースとして、更なる発展に寄与することになり、その点でも創造性が高い。



2. 研究の目的

近年の高齢化社会で増加した加齢黄斑変性(age-related macular degeneration: AMD)は、眼球の中でも網膜の中心である黄斑部を障害し、失明原因として国内第 4 位、米国の第 1 位を占める。光受容体である網膜視細胞の中でも、網膜黄斑部には視力を決める錐体 (cone) 視細胞が集中して存在し、周辺には視野の広がりを決める桿体 (rod) 視細胞が存在する。視力確保のためには黄斑部網膜視細胞、すなわち錐体視細胞に対する介入治療が必須である。しかし、現時点では治療法はない。マウスには黄斑が無く研究が進みにくい。そこで、本研究ではヒト細胞を用いて錐体視細胞の形成と維持のメカニズムを解明し、将来の世界初の新規網膜黄斑部治療の開発につなげる。そのために、ヒト人工多能性幹細胞(induced-pluripotent stem cell; iPS 細胞)を用い、3 次元培養により網膜組織を分化誘導し、網膜錐体視細胞を選択的に取り出して解析を行う。これにより、錐体視細胞の移植治療および保護治療の開発の基盤となるデータを得る。

3. 研究の方法

【研究計画 1】ヒト iPS 細胞を 3 次元培養し錐体視細胞を標識した

錐体および桿体視細胞に共通の転写因子 CRX を発現すると E2 crimson 蛍光を発する CRX-E2 crimson のコンストラクトを作製し、コントロールとなるヒト iPS 細胞株に Crisper/Cas9 システムを用いてノックインした。ノックインの確認のためには特異的プライマーを作製して PCR を行った。さらに、比較的幼弱な錐体視細胞に選択的に発現する遺伝子 X を発現すると別の蛍光色 GFP を発するコンストラクト(遺伝子 X-GFP)を Crisper/Cas9 システムを用いてノックインした。ダブルノックインの確認のためには、このコンストラクトに特異的なプライマーを作製して PCR により確認した。

【研究計画 2】標識したダブルノックインヒト iPS 細胞を 3 次元培養で網膜オルガノイドに分化誘導した。

ヒト iPS 細胞を 3 次元培養で網膜オルガノイドに分化誘導する方法は、Eiraku ら(Eiraku, Sasai et al. Nature 2011)の方法を改変しながら行った。具体的には、加える試薬の日程等を変更して行った。そして、分化誘導中に蛍光色素が発するかどうかを、経時的に実体蛍光顕微鏡で観察した。

最終分裂の時期にどのような特有な微小環境にあるかが、どの網膜細胞に分化するかの運命を決めることにつながるということが、マウスにおいて知られる(Livesey, Cepko Nat Rev Neurosci. 2001)。錐体視細胞は比較的早期に分裂を終えるため、CRX の最初の発現上昇早期に、遺伝子 X の発現に伴う GFP が発現する可能性が高く、その観察を行った。

【研究計画 3】3 次元培養で錐体視細胞を選択的に回収した

発現した蛍光をもとに、網膜オルガノイドの細胞を分散させ、蛍光標識をガイダンスとしてフローサイトメトリーを用いて錐体視細胞を回収した。回収した細胞が実際に錐体細胞であるかどうかは、特異的マーカーのリアルタイム PCR により確認した。

4 . 研究成果

Crisper/Cas9 システムを用いたダブルノックインの手法により、錐体視細胞になると、蛍光を発するヒト iPS 細胞を作製した。そして、その 3 次元分化誘導による網膜オルガノイドを作製した。さらに、フローサイトメトリーにより 2 つの蛍光を同時に発現する細胞を回収して、錐体視細胞のマーカー発現について、リアルタイム PCR により解析した。その結果、回収した細胞では錐体視細胞マーカーを選択的に発現していることが明らかになった。すなわち、蛍光標識をガイダンスとしてフローサイトメトリーを用いて錐体視細胞を回収する実験系を立ち上げた。これにより、錐体視細胞の移植治療および保護治療の開発の基盤となるデータを得ることにつながる基盤となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ozawa Yoko, Toda Eriko, Kawashima Hirohiko, Homma Kohei, Osada Hideto, Nagai Norihiro, Abe Yoichiro, Yasui Masato, Tsubota Kazuo	4. 巻 56
2. 論文標題 Aquaporin 4 Suppresses Neural Hyperactivity and Synaptic Fatigue and Fine-Tunes Neurotransmission to Regulate Visual Function in the Mouse Retina	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 8124 ~ 8135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-019-01661-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto Tomohiro, Kawashima Hirohiko, Osada Hideto, Toda Eriko, Homma Kohei, Nagai Norihiro, Imai Yasuyuki, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 8
2. 論文標題 Dietary Spirulina Supplementation Protects Visual Function From Photostress by Suppressing Retinal Neurodegeneration in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Translational Vision Science & Technology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.8.6.20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima Hirohiko, Ozawa Yoko, Toda Eriko, Homma Kohei, Osada Hideto, Narimatsu Toshio, Nagai Norihiro, Tsubota Kazuo	4. 巻 34
2. 論文標題 Neuroprotective and vision protective effect of preserving ATP levels by AMPK activator	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 5016 ~ 5026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201902387RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長田秀斗, 川島弘彦, 戸田枝里子, 本間耕平, 小川護, 有田誠, 坪田一男, 小沢洋子
2. 発表標題 Adiponectin receptor 1 欠損マウスにおける網膜変性の解析.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----