

平成 22 年 4 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19791266
 研究課題名（和文）：眼組織幹細胞の分化誘導と再生医療への応用
 研究課題名（英文）：Differential induction and application to regenerative medicine of ocular tissue-specific stem cells
 研究代表者
 井上 智之（INOUE TOMOYUKI）
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：50432539

研究成果の概要（和文）：

難治性眼疾患に対する再生医療の実践のため、我々はセルソースとして眼組織幹細胞を検討した。網膜再生医療において、ヒト網膜幹細胞から *Chx10*VP16・*Crx*・*Otx2* の共発現が、最も効率良く網膜視細胞へ分化誘導することを示した。本結果は *Stem Cells*(Inoue.T, et al. 2009) に報告した。角膜再生においては、細胞シート移植実験を確立するためのフィーダー細胞の開発を検討した。

研究成果の概要（英文）：

For clinical application of regenerative medicine against severe ocular diseases, we investigated the ocular tissue-specific stem cells as a cell source for the target cells. We shown that modulation of retinal transcription factor gene expression in human RSCs greatly enriches for photoreceptor progeny, and that strong enrichment was obtained with the combined transduction of *OTX2* and *CRX* together with the modulation of *CHX10*. These results were published on *Stem Cells* 2010;28:489-500. In corneal regeneration therapy, we investigated the feeder cells for the cultivated cell sheet transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	630,000	3,830,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：再生医療、眼組織、網膜、角膜

1. 研究開始当初の背景

眼科領域において遺伝性網膜変性疾患、外傷、加齢性黄斑変性症などにおける視細胞や網

膜色素上皮細胞の変性、緑内障における網膜節細胞の変性、水疱性角膜症における角膜内皮細胞らの変性・減少は各疾患群における病

態の根本原因をなしているが、それら眼組織固有細胞の減少に対する有効な治療は存在せず、新しい治療法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

目的の特異的機能細胞への分化を自在にコントロールし、用途に応じた網膜および角膜細胞の産生を可能にし、ヒト網膜再生医療および角膜再生医療への臨床応用を目的とした。

3. 研究の方法

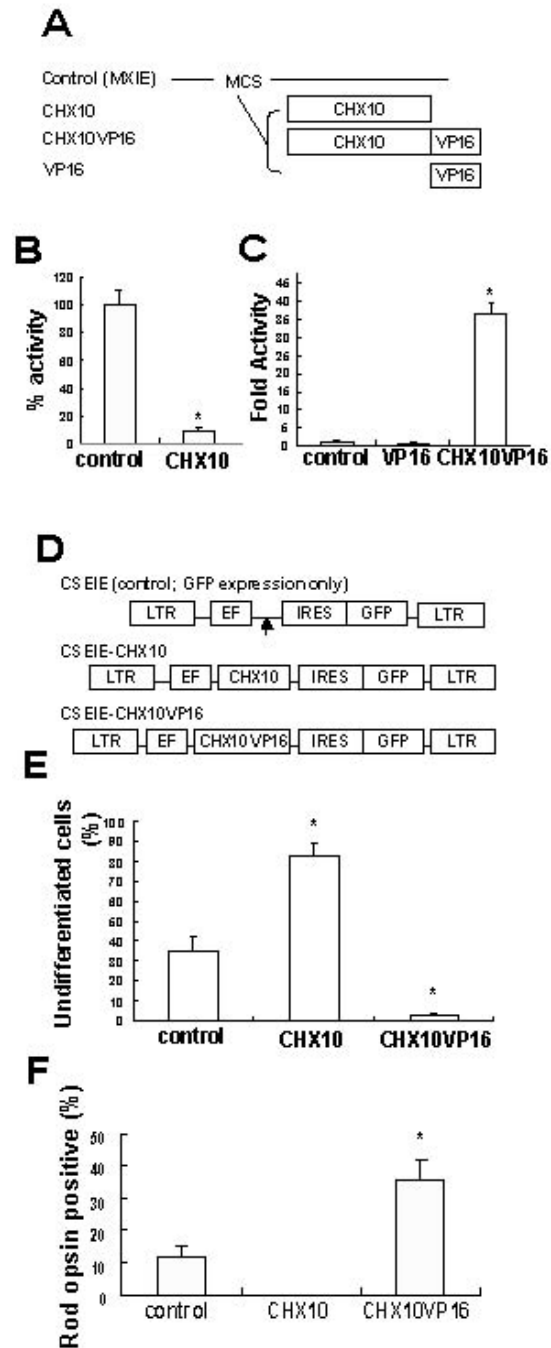
網膜再生医療に関しては、ヒト毛様体に存在するヒト網膜幹細胞の単離・性質評価を検討した。続いて、効率よい視細胞への分化のため、網膜発生における細胞分化運命に関与することが示されている転写因子群を強制発現するレンチウイルスを作成し、網膜幹細胞に各々の因子を強制発現させて *in vitro* の分化アッセイにて、視細胞分化に影響を与える活性のある因子およびその組み合わせをリアルタイム PCR や免疫染色を用いてスクリーニングした。さらに、得られた誘導条件にてヒト成体網膜幹細胞を分化誘導させた娘細胞を生体眼に移植し、生体内での分化率によって *in vivo* における役割の解明および失明モデルへの移植後の視機能の評価を電気学的（網膜電図）・行動学的（視運動試験）に検討した。角膜再生医療に関しては、角膜上皮や角膜内皮を効率よくシート状に得るためのフィーダー細胞を用いた培養系を検討した。

4. 研究成果

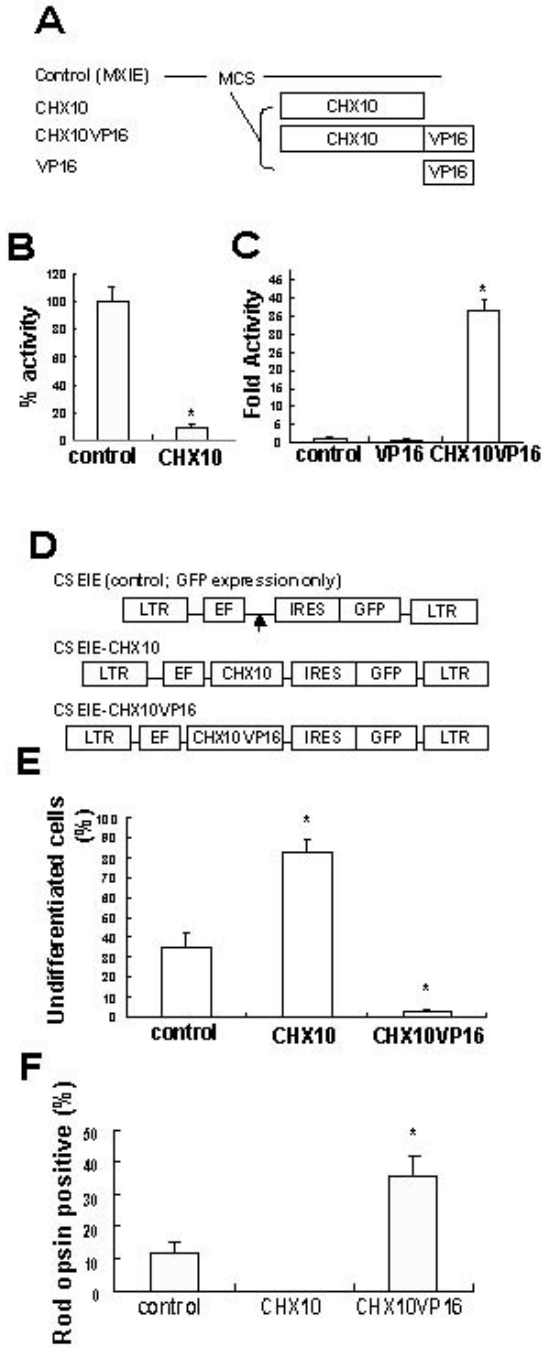
・視細胞分化に効率的に働く因子の決定
視細胞発生分化に影響を与える因子群として、まず網膜前駆細胞のマーカーである CHX10 に着目して、CHX10 のドミネガフォームである CHX10VP16 を作成した (図 1 A)。CHX10VP16 は *in vitro* にて CHX10 と逆の転写活性を示しドミネガフォームの機能を有していることが証明された (図 1 B, C)。幹細胞への導入効率を考慮して、レンチウイルスベクターに CHX10, CHX10VP16 をはじめとする因子を組み込んで、網膜幹細胞に因子強制発現させる系を使用した (図 1 D)。網膜幹細胞に CHX10, CHX10VP16 を強制発現させ、分化アッセイにて評価すると、CHX10 は未分化維持に働き、CHX10VP16 は最終分化、特に視細胞分化を促進した (図 1 E, F)。次に網膜発生分化に重要な役割を与えることが報告されている因子 (CRX, OTX2, NRL, NEUROD, RAX, NGN2, MASH1) が網膜視細胞分化に与える影響を検討した。その結果、CRX と OTX2 が視細胞分化を促進した (図 2A)。これらより CHX10VP16, OTX2, CRX の 3 因子は単独で視細胞分化を促進するが、各々の相乗効果を期待してそれらの組み合わせを検討した。その結果、CHX10VP16, OTX2, CRX の 3 因子を同時強制発現させた hRSC が最も効率的に視細胞へと分化した (図 2B, C)。網膜視細胞発生における

これら 3 因子の相互関係を検討した。CHX10VP16 を強制発現させた hRSC にて OTX2 発現量を定量したところ、有意に OTX2 発現が亢進した。逆に、OTX2 を強制発現させた hRSC には CHX10 発現量に変化は認めなかった (図 3 A, B)。これより CHX10 が OTX2 に発現調節を行う可能性が示唆された。次に、クロマチン免疫沈降法にて CHX10 が OTX2 プロ

図 1



1



2

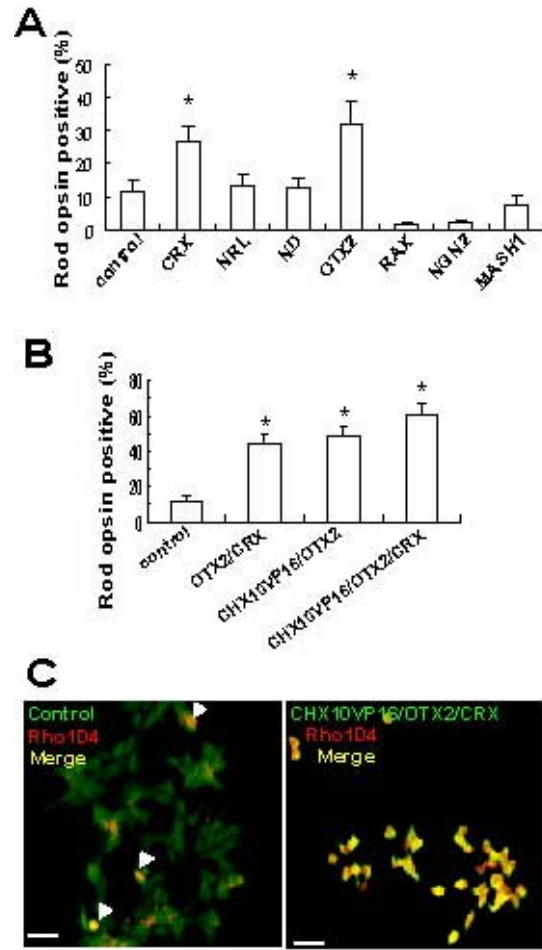


Figure 3

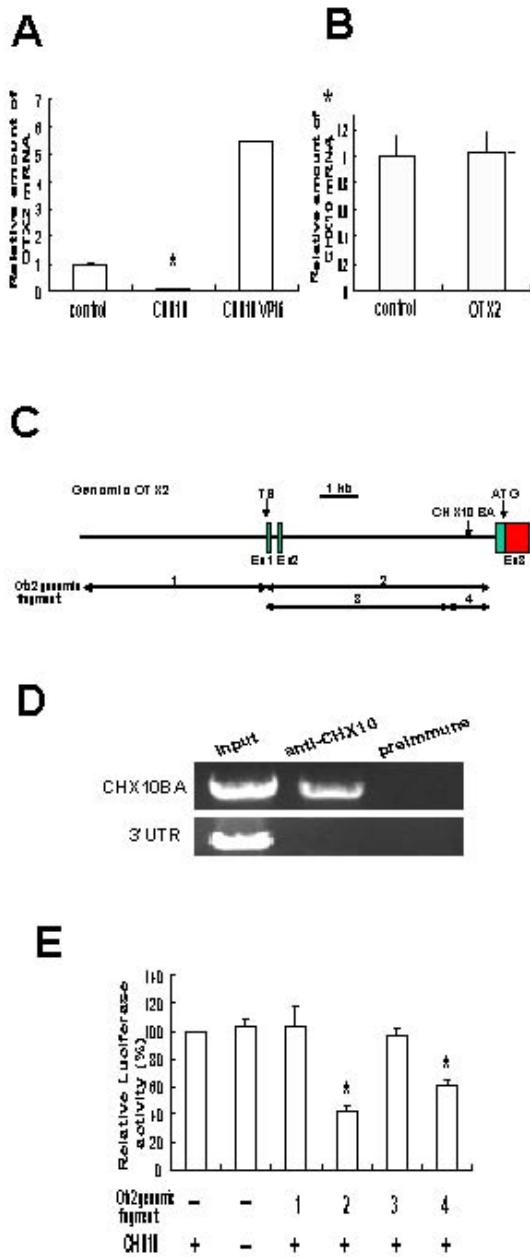
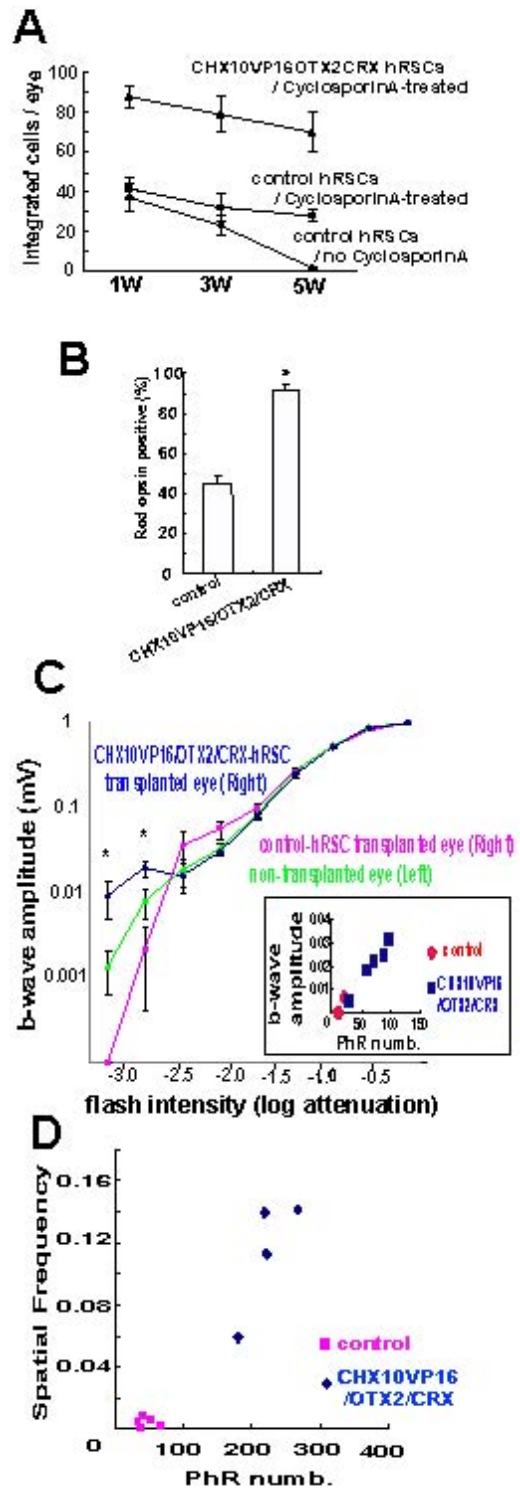


Figure 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

① **Inoue T**, Coles BLK, Dorval K, Bremner R, Bessho Y, Kageyama R, Hino S, Matsuoka M, Craft CM, McInnes RR, Temblay F, Prusky GT, van der Kooy D. Maximizing functional photoreceptor differentiation from adult human retinal stem cells.

Stem Cells 2010;28:489-500.

査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

① 高松文彦、井上智之、田野保雄；網膜幹細胞から網膜視細胞・網膜神経節細胞・網膜色素上皮細胞への分化誘導；第 112 回日本眼科学会総会、2008 年 4 月 17 日、横浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 智之 (INOUE TOMOYUKI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50432539

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：