

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H01063

研究課題名(和文) ヒト眼の形態形成における組織間の協調メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of tissue interaction in human eye development.

研究代表者

西田 幸二 (Nishida, Kohji)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40244610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒト器官形成時における各組織のクロストークメカニズムを眼を対象として解明する事を目的とした。具体的にはSEAM自体がどのようなメカニズムによって発生してくるかを検討した。

iPS細胞におけるENUによる変異誘導を行い多くの変異株を得たうえで、それぞれに対してSEAM誘導を行い、異常を起こす92株の同定をおこなった。これらの異常は表現型により3つほどのパターンに分類され、我々はそれらのうち、2層の発生が不良で異常になるものについて、全ゲノムシーケンスを行い、複数の遺伝子に変異を認め、その一つの遺伝子についてCRISPRによるノックアウト体を解析するとともにmRNAseqを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本検討に於いてはヒトの器官形成における初めてのミュータジェネシススクリーニング系を確立したと考えている。従来に於いて、ヒトを用いた、眼のような複雑な発生過程を持つ器官全体の発生を検討することはできなかった。本検討に於いては再生医療技術を応用することで、極めて基礎的な研究にその成果を還元できることを示したものである。また、作製したライブラリーを順次解析することで人の眼の発生の機構をこれからも明らかにしていくことが期待できる

研究成果の概要(英文)：We had tried to elucidate the crosstalk mechanism of each tissue during human organogenesis. Specifically, we examined the mechanism by which SEAM itself is generated. In SEAM, cells and tissue primordia with different developmental genealogy are arranged concentrically.

Mutation induction by ENU (N nitrosourea) in iPS cells was performed last year to obtain many mutant strains, and then SEAM induction was performed on each of them, and 92 strains causing the abnormality were identified. These abnormalities are classified into about 5 patterns according to the phenotype, and we perform a whole-genome sequence for those that are abnormal due to poor occurrence of 2 layers and those that cause abnormalities in the shape of 3 layers. This was compared with the genomic annotations up to now, and the analysis was started in order from the one that seems to be the causative gene mutation, and the knockout form by CRISPR was analyzed for one gene and mRNAseq was performed.

研究分野：発生学、眼科学

キーワード：オルガノイド 再生医療技術 順遺伝学 眼発生異常 PAX6

1. 研究開始当初の背景

(1) 前眼部の発達と眼の異形成

眼は、神経外胚葉、表層外胚葉、神経堤から発達する器官である。眼の発生・分化過程は複雑で、網膜、角膜、水晶体などのいくつかの異なる組織が同時に発生してくる。その中で、網膜の発生・

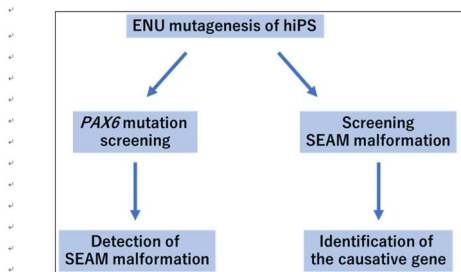


Figure 2: Strategy of this study of developing the random mutagenesis and screening methods. (Left side) We tried to detect *PAX6* mutations in ENU mutant lines. If we find them, and the line shows the same SEAM formation as derived from Aniridia patients with *PAX6* mutations, then we can convince this mutagenesis system works. (Right side) ENU mutant lines were actually induced into SEAM, and we tried to detect lines showing SEAM formation abnormalities. Among them, we performed full genome Next Generation Sequence of a line and tried to identify the causative gene for SEAM formation abnormality.

文化過程はかなり、明らかにされている¹⁻⁵、しかし、前眼部の分化と器官発生における協調を伴った発生・分化過程はまだ不明である⁶。一方、ヒトに於いては多くの眼形成異常があり、目の奇形として報告されてきた。それらの多くは上記のような発達過程の異常によって引き起こされると考えられるが、その表現型は分化・発生の異常の結果のみを示し、発達中の実際の病理・メカニズムは不明である。本検討では、SEAMと呼ばれる iPS 細胞のヒト眼のオルガノイド構造を用いて、眼の分化メカニズムと眼の発生異常の病態を明らかにするために、新しい ENU を介したスクリーニング法の開発を試みた。

文化過程はかなり、明らかにされている¹⁻⁵、しかし、前眼部の分化と器官発生における協調を伴った発生・分化過程はまだ不明である⁶。

一方、ヒトに於いては多くの眼形成異常があり、目の奇形として報告されてきた。それらの多くは上記のような発達過程の異常によって引き起こされると考えられるが、その表現型は分化・発生の異常の結果のみを示し、発達中の実際の病理・メカニズムは不明である。

本検討では、SEAM と呼ばれる iPS 細胞のヒト眼のオルガノイド構造を用いて、眼の分化メカニズムと眼の発生異常の病態を明らかにするために、新しい ENU を介したスクリーニング法の開発を試みた。

(2) SEAM (self-formed ectodermal autonomous multi-zone)

ENU (N-EthylNitrosourea)⁷ は、DNA の塩基置換を引き起こす可能性のある化学変異原物質である。

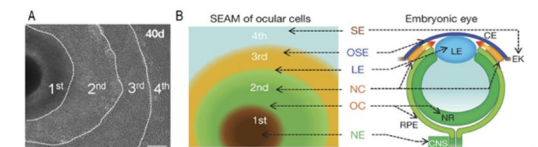


Figure 1: SEAM. (A) A typical SEAM structure from human iPS cells after 40 days of culture. (B) The SEAM of human iPS cells induced different kinds of cells of ectodermal lineage, mimicking anterior and posterior eye development *in vivo*. CNS, central nervous system; NE, neuroectoderm; OC, optic cup; NR, neuroretina; NC, neural crest; LE, lens; OSE, ocular surface ectoderm; SE, surface ectoderm; CE, corneal epithelium; EK, epidermal keratinocyte.

リングをヒトで初めて行った。

2. 研究の目的

本検討では、ENU 変異ヒト iPS 細胞株を樹立し、眼球マスター遺伝子 *PAX6* に ENU 変異が存在するかどうかを確認することにより、変異誘発システムが機能することを証明しようとした。さらに、SEAM 形成異常の原因となる遺伝子の特定を試みた。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞の ENU 変異誘発

Figure 2 に、ランダム突然変異誘発とスクリーニング法を開発するための戦略を示す。まず、ヒト iPS 細胞における高効率の突然変異誘発法を確立した。現在まで他の生物種に対して行われてきた突然変異誘発プロトコルを参照して、最初に突然変異誘発に適切な ENU 用量を検討した^{13,14}。ENU 用量を増やすと、細胞生存率が低下し、ヒト iPS 細胞を維持できなくなった。一方で、低用量では、突然変異誘発の有効性が低い可能性があったため、^{15, 16} 細胞生存率よりわず

ENU (N-EthylNitrosourea)⁷ は、DNA の塩基置換を引き起こす可能性のある化学変異原物質である。

1)¹¹。ヒトの眼のオルガノイド培養誘導を発達させることにより、*in vitro* でのヒトの眼の原基の発達を再現する。SEAM の特徴の一つは 2D 培養システムであるため、多くのオルガノイド培養で使用されている 3D 培養よりもはるかに単純であり、スクリーニングがはるかに簡単に行えることである。

SEAM においては、中枢神経系から末梢神経系、CNS、網膜、角膜上皮、皮膚上皮まで、それぞれ 4 つの異なる同心円状のゾーンで構成される¹²。構造の異常、同心円状のゾーンは、眼の発達の異常を指している可能性がある。この仮説の下で、我々は眼器官発達の ENU 突然変異誘発スクリー

かに低い用量 130 μ M を選択した。(Figure 3) 次に、ヒト iPS 細胞をこの用量に 2 回曝露し、合計 92 の ENU 変異株を単離することができた。

4. 研究成果

(1) PAX6 変異スクリーニング

ヒト iPS 細胞における突然変異誘発の有効性を確認するために、PAX6 遺伝子の突然変異の存在を検討した。PAX6 は眼のマスター遺伝子として知られており、PAX6 変異が眼の重度の奇形である Aniridia^{17, 18} を引き起こす。また、PAX6 変異を持つアニリディア患者由来の iPS 細胞を使用して SEAM 形成の異常をきたすことは別実験で確認している。ここで、iPS 変異誘導ラインに PAX6 変異が見つかり、そのラインが SEAM 形成異常を示している場合、この変異誘発システムが機能している結論付けることができると考えた。PAX6 には 14 個のエクソンがあり、患者で頻繁に報告されるエクソン 5~8 を分析した¹⁹⁻²³。92 個の ENU 変異ヒト iPS 細胞株すべてからゲノム DNA を抽出し、PCR によってエクソン 5~8 を増幅し、シーケンス解析を行った。残念ながら、92 個の ENU 変異 iPS 細胞株すべてで、エクソン 5~8 に変異は見られず、変異誘発の有効性を確認することはできなかった。

(2) SEAM 奇形のスクリーニング

次に、確立された変異誘発 iPS 細胞株から SEAM を誘導し、SEAM 形成の異常を検討した。合計 92 系統中、201B7 野生型系統では見られない表現型を示す 28 系統が検出された。これらは外見上、以下のように SEAM の形で 3 つのカテゴリーに分類された。第 2 層の異常、15 株

- ・ 1, 2 同一レイヤー、10 株
- ・ 第 3 層、3 株

SEAM の異常は、2 回の独立した誘導において確認され(両方の誘導で同じ異常を示した場合陽性とした) SEAM の創設者である専門家によって評価された。

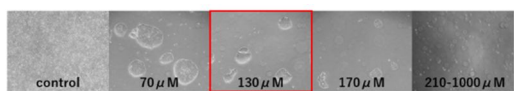


Figure 3: Examination of ENU dose

その中で、まず網膜の発達に異常があると思われる 2a1 という 2 層目の異常に注目しました (Figure 4) このラインは完全な第 2 層を形成

できず、RT-PCR 分析で PAX6 の発現レベルを低下させていた (data not shown)。

(3) 2a1 クローンの次世代シーケンス

次に、2a1 クローンゲノムのフルゲノム次世代シーケンス (NGS) を実行した。NGS 分析では、この系統に特異的なエクソンの 8 つの突然変異を含む、150 の ENU 突然変異が検出された。我々はそれらの中で、遺伝子 GENEX にナンセンス突然変異に注目した。この遺伝子は転写因子であるため、網膜の発達に関与している可能性があるが、機能はまったく知られていなかった。

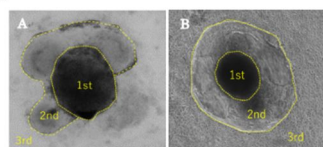


Figure 4: ENU mutant lines that formed the SEAM formation abnormality. Abnormality in 2nd layer line(2a1) (A). 201B7 wild-type line(B).

しかしながら、続けて行われたサンガーシーケンシングにおいては、NGS によって予測されたナンセンス変異は存在しなかったが、別の部位にミスセンス変異があるようにおもわれた。ただし、GENEX の最初の構造には反復性の高い構造が含まれているため、結果でも変異の存在を結論

付けることはできなかった。

(4) GENEXKO ヒト iPS 細胞株の作製

変異株での NGS による分析では、GENEX でナンセンス変異が予測されたため、CRISPR/Cas9 を使用して GENEXKO ヒト iPS 細胞株の生成を試みた。GENEX 変異が導入された 2 系統が得られた。GENEX ヘテロ K0no1 は 193 ヌクレオチドを欠損しており、GENEX ヘテロ K0no2 は 9 ヌクレオチドを欠損していた。これは、K0no2 がインフレームの欠損であり、何らかの機能 (獲得も含む) を示唆する。この二つに SEAM に誘導を行ったところ、K0 no1 は 201B7 野生型系統と同様の形成を示し、有意な異常を認めなかった。一方、K0 no2 は、2a1 クローンに由来する SEAM と同様の形成異常を示した。

(5) SEAM 形成異常における変異の同定

GENEX の 5' UTR 周辺の配列について、ノックアウト実験は、GENEX における病原性突然変異の存在の問題を提起した。

予測された GENEX ミスセンス変異をさらに確認するために、2a1 クローンのゲノムおよび相補 DNA を再配列を試みた。まず、以前の研究で、データベース内の GENEX の 5' UTR 付近の遺伝子配

列が予測された遺伝子配列と異なることが確認できていた。そこで、この部分の塩基配列を完全に決定するため RNA から 5'RACE を実行して、最初のメチオニンの位置と 5'UTR 周辺の配列情報を確認した。

2127 bp 5' RACE PCR 産物をサブクローニングして配列決定した後、GENEX のオープンリーディングフレームを照合し全塩基配列を決定した。

(6) 22a1 クローンのサンガーシーケンシング

次に、SEAM 形成段階の 2a1 クローンの cDNA をサブクローン化し、サンガー法で配列決定した。変異体は変異のヘテロ接合体でなければならないので、複数のコロニーをピックアップして配列を決定した。しかし、cDNA 上には予想される変異を認めなかった。

結果を確認するために、2a1 クローンからゲノム DNA を抽出し、上記と同じ方法でサンガーシーケンシングを実行しましたが、予想された変異は認めなかった。

(7) PAX6 変異スクリーニング

ENU 変異誘発システムの妥当性を調べるために、PAX6 変異スクリーニングを行ったが、残念ながら、92 の ENU 変異 iPS 細胞株すべてで変異は発見できなかった。しかし、この事実は変異誘発システムの有効性を否定するものではないと考えている。PAX6 遺伝子に変異が見つからなかった理由は、1つは ENU 変異型ヒト iPS 細胞株の数が少なかったこと、もう1つは 14 個すべてのエクソンをスクリーニングできなかったことが考えられる。ライブラリーの平均 ENU 誘発突然変異頻度は、ゼブラフィッシュの逆遺伝学的スクリーニングで見られたものと同様に、345,000bp あたり 1 突然変異であることが我々の検討ではわかっており、PAX6 遺伝子の 4 つのエクソン、62,008 bp をカバーする 4 つの異なるアンプリコンの完全なライブラリーをスクリーニングするのみでは当然変異が見つかる可能性は低いといえる。したがって、より多くの ENU 変異ヒト iPS 細胞株を検討すれば PAX6 変異株を発見できると考えられる。

(8) クローンでの変異検出

この研究では、GENEX は第 2 層ラインの SEAM 異常の原因遺伝子ではないと結論付けた。NGS による予測される変異がない理由は、遺伝子 GENEX 自体が非常にリピートが豊富な遺伝子であるため、NGS 分析時にフラグメントが誤って配置されていたためであると考えている。サンガーシーケンシングで変異が確認できなかった理由も、同様であり、実際、この遺伝子のゲノム構造は RACE により、データベース上のものと異なっていた。

2a1 および RFLP から抽出された cDNA およびゲノム DNA の配列決定からは陽性の結果が得られなかったため、予測される変異はないと結論付けた。

しかし、GENEX が原因遺伝子ではない場合、前の研究で GENEXKO_{no2} 系統の SEAM 異常形成を説明することができない。これについて検討するために、現在、2a1 ライン、GENEX KO no1 ライン (表現型のないヌル変異)、GENEX KO no2 ライン (表現型のあるインフレーム変異) および 201B7 野生型系統の mRNA-seq 分析を行っている。

参考文献

- 1 Turner, D. L. & Cepko, C. L. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328, 131-136, doi:10.1038/328131a0 (1987).
- 2 Walsh, C. & Cepko, C. L. Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science* 241, 1342-1345, doi:10.1126/science.3137660 (1988).
- 3 Turner, D. L., Snyder, E. Y. & Cepko, C. L. Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* 4, 833-845, doi:10.1016/0896-6273(90)90136-4 (1990).
- 4 Fischer, A. J. & Reh, T. A. Potential of Muller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia* 43, 70-76, doi:10.1002/glia.10218 (2003).
- 5 Wu, S., Chang, K. C. & Goldberg, J. L. Retinal Cell Fate Specification. *Trends Neurosci* 41, 165-167, doi:10.1016/j.tins.2018.02.002 (2018).
- 6 Cvekl, A. & Tamm, E. R. Anterior eye development and ocular mesenchyme: new insights from mouse models and human diseases. *Bioessays* 26, 374-386, doi:10.1002/bies.20009 (2004).
- 7 Justice, M. J., Noveroske, J. K., Weber, J. S., Zheng, B. & Bradley, A. Mouse ENU mutagenesis. *Hum Mol Genet* 8, 1955-1963, doi:10.1093/hmg/8.10.1955 (1999).
- 8 Russell, W. L. et al. Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 5818-5819,

doi:10.1073/pnas.76.11.5818 (1979).

- 9 Zan, Y. et al. Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol* 21, 645-651, doi:10.1038/nbt830 (2003).
- 10 Solnica-Krezel, L., Schier, A. F. & Driever, W. Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline. *Genetics* 136, 1401-1420 (1994).
- 11 Hayashi, R. et al. Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature* 531, 376-380, doi:10.1038/nature17000 (2016).
- 12 Hayashi, R. et al. Coordinated generation of multiple ocular-like cell lineages and fabrication of functional corneal epithelial cell sheets from human iPS cells. *Nat Protoc* 12, 683-696, doi:10.1038/nprot.2017.007 (2017).
- 13 Chen, Y. et al. Genotype-based screen for ENU-induced mutations in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 24, 314-317, doi:10.1038/73557 (2000).
- 14 Seeley, M. R. & Faustman, E. M. Effects of O⁶-benzylguanine on growth and differentiation of P19 embryonic carcinoma cells treated with alkylating agents. *Teratog Carcinog Mutagen* 18, 111-122, doi:10.1002/(sici)1520-6866(1998)18:3<111::aid-tcm2>3.0.co;2-j (1998).
- 15 Nikolova, T. & Huttner, E. Adaptive and synergistic effects of a low-dose ENU pretreatment on the frequency of chromosomal aberrations induced by a challenge dose of ENU in human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Mutat Res* 357, 131-141, doi:10.1016/0027-5107(96)00094-2 (1996).
- 16 Dobo, K. L. et al. Defining EMS and ENU dose-response relationships using the Pig-a mutation assay in rats. *Mutat Res* 725, 13-21, doi:10.1016/j.mrgentox.2011.06.005 (2011).
- 17 Halder, G., Callaerts, P. & Gehring, W. J. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 267, 1788-1792, doi:10.1126/science.7892602 (1995).
- 18 Jordan, T. et al. The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nat Genet* 1, 328-332, doi:10.1038/ng0892-328 (1992).
- 19 Pedersen, H. R. et al. PAX6 Genotypic and Retinal Phenotypic Characterization in Congenital Aniridia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 61, 14, doi:10.1167/iovs.61.5.14 (2020).
- 20 Lee, P. C., Lam, H. H., Ghani, S. A., Subrayan, V. & Chua, K. H. Investigation of a PAX6 gene mutation in a Malaysian family with congenital aniridia. *Genet Mol Res* 13, 3553-3559, doi:10.4238/2014.March.24.15 (2014).
- 21 Yasuda, T. et al. PAX6 mutation as a genetic factor common to aniridia and glucose intolerance. *Diabetes* 51, 224-230, doi:10.2337/diabetes.51.1.224 (2002).
- 22 Cai, F. et al. A novel PAX6 mutation in a large Chinese family with aniridia and congenital cataract. *Mol Vis* 16, 1141-1145 (2010).
- 23 Wang, G. M. et al. Phenotypic Variation in a Four-Generation Family with Aniridia Carrying a Novel PAX6 Mutation. *J Ophthalmol* 2018, 5978293, doi:10.1155/2018/5978293 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計27件（うち査読付論文 26件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugita Sunao, Mandai Michiko, Nishida Kohji, Kurimoto Yasuo, Takahashi Masayo	4. 巻 9
2. 論文標題 HLA-Matched Allogeneic iPS Cells-Derived RPE Transplantation for Macular Degeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 2217 ~ 2217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9072217	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Lu Shi Yao, Rong Shi Song, Wu Zhenggen, Huang Chukai, Matsushita Kenji, Ng Tsz Kin, Leung Christopher K.S., Kawashima Rumi, Usui Shinichi, Tam Pancy O.S., Tsujikawa Motokazu, Young Alvin L., Zhang Mingzhi, Wiggs Janey L., Nishida Kohji, Tham Clement C., Pang Chi Pui, Chen Li Jia	4. 巻 48
2. 論文標題 Association of the CAV1 CAV2 locus with normal tension glaucoma in Chinese and Japanese	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 658 ~ 665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ceo.13744	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kobayashi Yuki, Hayashi Ryuhei, Shibata Shun, Quantock Andrew J., Nishida Kohji	4. 巻 46
2. 論文標題 Ocular surface ectoderm instigated by WNT inhibition and BMP4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101868 ~ 101868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101868	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Baba Koichi, Sasaki Kei, Morita Mio, Tanaka Tomoyo, Teranishi Yosuke, Ogasawara Takahiro, Oie Yoshinori, Kusumi Izumi, Inoie Masukazu, Hata Ken-ichiro, Quantock Andrew J., Kino-oka Masahiro, Nishida Kohji	4. 巻 10
2. 論文標題 Cell jamming, stratification and p63 expression in cultivated human corneal epithelial cell sheets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64394-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Baba Koichi, Hashida Noriyasu, Tujikawa Motokazu, Quantock Andrew J., Nishida Kohji	4. 巻 592
2. 論文標題 The generation of fluorometholone nanocrystal eye drops, their metabolism to dihydrofluorometholone and penetration into rabbit eyes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 120067 ~ 120067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpharm.2020.120067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashikawa Yoshiko, Hayashi Ryuhei, Tajima Masaru, Okubo Toru, Azuma Shohei, Kuwamura Mitsuru, Takai Naofumi, Osada Yasuyuki, Kunihiro Yayoi, Mashimo Tomoji, Nishida Kohji	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of knockout rabbits with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using CRISPR/Cas9	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66780-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oie Yoshinori, Yasukura Yuichi, Nishida Nozomi, Koh Shizuka, Kawasaki Ryo, Maeda Naoyuki, Jhanji Vishal, Nishida Kohji	4. 巻 223
2. 論文標題 Fourier Analysis on Regular and Irregular Astigmatism of Anterior and Posterior Corneal Surfaces in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 33 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajo.2020.09.045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Shigeru, Morimoto Takeshi, Tanaka Sayaka, Hotta Kikuko, Fujikado Takashi, Tsujikawa Motokazu, Nishida Kohji	4. 巻 20
2. 論文標題 Novel mutation identified in Leber congenital amaurosis - a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12886-020-01577-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima Rumi, Matsushita Kenji, Hashida Noriyasu, Kuniyoshi Kazuki, Fujikado Takashi, Nishida Kohji	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Complete Visual Recovery From Severe Outer Retinitis After Tonsillitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNO.0000000000001073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima Rumi, Matsushita Kenji, Hashida Noriyasu, Kuniyoshi Kazuki, Fujikado Takashi, Nishida Kohji	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Complete Visual Recovery From Severe Outer Retinitis After Tonsillitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNO.0000000000001073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima Rumi, Matsushita Kenji, Kawasaki Ryo, Nishida Kohji	4. 巻 21
2. 論文標題 Efficacy and safety of 5-fluorouracil in infrared monitor guided bleb revision	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12886-021-01843-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagahara Yukiko, Tsujikawa Motokazu, Koto Ryota, Uesugi Koji, Sato Shigeru, Kawasaki Satoshi, Maruyama Kazuichi, Nishida Kohji	4. 巻 190
2. 論文標題 Corneal Opacity Induced by Light in a Mouse Model of Gelatinous Drop-Like Corneal Dystrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 2330 ~ 2342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.08.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Jun, Hara Chikako, Nishida Kohji	4. 巻 4
2. 論文標題 Structural En Face OCT Angiography Image of Avulsed Retinal Vessels and Vitreal Neovascularization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ophthalmology Retina	6. 最初と最後の頁 1157 ~ 1157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oret.2020.05.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matoba Ayumi, Oie Yoshinori, Tanibuchi Honami, Winegarner Andrew, Nishida Kohji	4. 巻 19
2. 論文標題 Anterior segment optical coherence tomography and in vivo confocal microscopy in cases of mucopolysaccharidosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology Case Reports	6. 最初と最後の頁 100728 ~ 100728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2020.100728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ashworth Sean, Harrington Jodie, Hammond Greg M., Bains Kiranjit K., Koudouna Elena, Hayes Anthony J., Ralpls James R., Regini Justyn W., Young Robert D., Hayashi Ryuhei, Nishida Kohji, Hughes Clare E., Quantock Andrew J.	4. 巻 8
2. 論文標題 Chondroitin Sulfate as a Potential Modulator of the Stem Cell Niche in Cornea	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.567358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nomi Kimihito, Hayashi Ryuhei, Ishikawa Yuki, Kobayashi Yuki, Katayama Tomohiko, Quantock Andrew J., Nishida Kohji	4. 巻 34
2. 論文標題 Generation of functional conjunctival epithelium, including goblet cells, from human iPSCs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108715 ~ 108715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ando Satoru, Hashida Noriyasu, Yamashita Daisuke, Kawabata Tsuyoshi, Asao Kazunobu, Kawasaki Satoshi, Sakurai Kazushi, Yoshimori Tamotsu, Nishida Kohji	4. 巻 551
2. 論文標題 Rubicon regulates A2E-induced autophagy impairment in the retinal pigment epithelium implicated in the pathology of age-related macular degeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 148 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maruyama Kazuichi, Yoneda Kazuhito, Sugita Sunao, Yamamoto Yoshimi, Koike Masato, Peters Christoph, Uchiyama Yasuo, Nishida Kohji	4. 巻 10
2. 論文標題 CTLA-2 Alpha Is a Potent Inhibitor of Angiogenesis in Murine Ocular Tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 456 ~ 456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10030456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibata Shun, Hayashi Ryuhei, Kudo Yuji, Okubo Toru, Imaizumi Tsutomu, Katayama Tomohiko, Ishikawa Yuki, Kobayashi Yuki, Toga Junko, Taniguchi Yukimasa, Honma Yoichi, Sekiguchi Kiyotoshi, Nishida Kohji	4. 巻 14
2. 論文標題 Cell-Type-Specific Adhesiveness and Proliferation Propensity on Laminin Isoforms Enable Purification of iPSC-Derived Corneal Epithelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 663 ~ 676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.02.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goto So, Maeda Naoyuki, Noda Toru, Ohnuma Kazuhiko, Koh Shizuka, Iehisa Ikko, Nishida Kohji	4. 巻 10
2. 論文標題 Comparison of composite and segmental methods for acquiring optical axial length with swept-source optical coherence tomography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4474-4474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61391-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okubo Toru, Hayashi Ryuhei, Shibata Shun, Kudo Yuji, Ishikawa Yuki, Inoue Saki, Kobayashi Yuki, Honda Ai, Honma Yoichi, Kawasaki Satoshi, Nishida Kohji	4. 巻 295
2. 論文標題 Generation and validation of a PITX2?EGFP reporter line of human induced pluripotent stem cells enables isolation of periocular mesenchymal cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 3456 ~ 3465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.010713	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagahara Yukiko, Tsujikawa Motokazu, Takigawa Toru, Xu Peng, Kai Chifune, Kawasaki Satoshi, Nakatsukasa Mina, Inatomi Tsutomu, Kinoshita Shigeru, Nishida Kohji	4. 巻 6
2. 論文標題 A novel mutation in gelatinous drop-like corneal dystrophy and functional analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 6-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-019-0060-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Shigeru, Morimoto Takeshi, Hotta Kikuko, Fujikado Takashi, Nishida Kohji	4. 巻 40
2. 論文標題 Eleven-year follow-up of a Japanese retinitis pigmentosa patient with an HK1 gene mutation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ophthalmic Genetics	6. 最初と最後の頁 466 ~ 469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13816810.2019.1678179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujimoto Satoko, Hayashi Ryuhei, Hara Susumu, Sasamoto Yuzuru, Harrington Jodie, Tsujikawa Motokazu, Nishida Kohji	4. 巻 11
2. 論文標題 KLF4 prevents epithelial to mesenchymal transition in human corneal epithelial cells via endogenous TGF- 2 suppression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 249 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.08.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hara Susumu, Tsujikawa Motokazu, Kawasaki Satoshi, Nishida Kohji	4. 巻 188
2. 論文標題 Homeostasis of SLC4A11 protein is mediated by endoplasmic reticulum-associated degradation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 107782 ~ 107782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2019.107782	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibata Shun, Hayashi Ryuhei, Okubo Toru, Kudo Yuji, Baba Koichi, Honma Yoichi, Nishida Kohji	4. 巻 11
2. 論文標題 The secretome of adipose-derived mesenchymal stem cells attenuates epithelial mesenchymal transition in human corneal epithelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 114 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.06.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hara Susumu, Tsujikawa Motokazu, Nishida Kohji	4. 巻 514
2. 論文標題 Identification and application of p75 neurotrophin receptor-expressing human trabecular meshwork progenitor cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 580 ~ 585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.178	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 西田幸二
2. 発表標題 iPS細胞を使った再生治療臨床応用の最前線
3. 学会等名 第41回 日本炎症・再生医学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 西田幸二
2. 発表標題 角膜疾患に対する医療パラダイムチェンジ
3. 学会等名 第74回日本臨床眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 西田幸二
2. 発表標題 iPS細胞の臨床応用-現状と未来-
3. 学会等名 第50回日本臨床神経生理学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 西田幸二
2. 発表標題 iPS細胞を用いた角膜再生医療の実用化に向けて
3. 学会等名 第20回 日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 林竜平
2. 発表標題 iPS細胞を用いた眼細胞分化と再生医療への応用
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田幸二
2. 発表標題 眼の再生医療
3. 学会等名 大阪府眼科医会：健康講座（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田幸二
2. 発表標題 iPS細胞を用いた角膜移植
3. 学会等名 第23回Cornea Update Seminar Tokyo（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大家 義則, 西田 幸二
2. 発表標題 iPS細胞を用いた角膜移植
3. 学会等名 第39回日本眼薬理学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬剛至
2. 発表標題 iPS細胞を用いた角膜上皮の再生医療
3. 学会等名 第73回日本臨床眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 SHIGERU SATO, N. Hashida, T. Morimoto, K. Hotta, T. Fujikado, K. Nishida.
2 . 発表標題 Novel OPA1 gene mutations in Japanese patients with optic atrophy.
3 . 学会等名 ARVO Annual Meeting 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Yu Yoshinaga, T. Soma, R. Hayashi, S. Azuma, K. Maruyama, Y. Hashikawa. T. Katayama, N. hosen, T. Shiina, K. Ogasawara, K. Nishida.
2 . 発表標題 Effects of MHC conformity on corneal epithelial cell sheet transplantation in non-human primates.
3 . 学会等名 ARVO Annual Meeting 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Yukiko Nagahara, k. uesugi, P. Xu, S. Kawasaki, M. Tsujikawa, K. Nishida.
2 . 発表標題 The phenotype of knockout mouse of tumor-associated calcium signal transducer2 as a model of gelatinous drop-like corneal dystrophy.
3 . 学会等名 ARVO Annual Meeting 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Masayo Takahashi, S. Sugita, M. Mandai, Y. Hirami, S. Takagi, M. Yamamoto, N. Koide, H. Sakaguchi, K. Maruyama, K. Nishida, S. Yamanaka, Y. Kurimoto.
2 . 発表標題 HLA 6 loci matched allogeneic iPS cells derived retinal pigment epithelial cells (iPSC-RPE) transplantation.
3 . 学会等名 ARVO Annual Meeting 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoko Fujimoto, R. Hayashi, Y. Sasamoto, S. Hara, J. Harrington, M. Tsujikawa, K. Nishida.
2. 発表標題 KLF4 Prevents Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Human Corneal Epithelia via SMAD2/3 Nuclear Translocation Inhibition of the TGF- Signaling Pathway.
3. 学会等名 ARVO Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 西田 幸二	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 【"適応&修復"のサイエンスと臨床応用の最前線】眼の適応・修復と疾患, 別冊Bio Clinica:慢性炎症と疾患	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 多能性幹細胞由来結膜細胞の誘導方法	発明者 西田幸二, 林竜平, 能美君人	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、W02019225672	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	辻川 元一 (Tsujikawa Motokazu) (70419472)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	林 竜平 (Hayashi Ryuhei) (70535278)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------