

研究種目：若手 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791287

研究課題名 (和文) 誘導多能性幹細胞から神経網膜細胞への分化誘導

研究課題名 (英文) Differentiation of retinal cells from induced pluripotent stem cells.

研究代表者

平見 恭彦 (HIRAMI YASUHIKO)

財団法人 先端医療振興財団 先端医療センター 眼科 副医長

研究者番号：00462721

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：眼発生・再生医学

1. 研究計画の概要

眼科的疾患 (主に網膜変性疾患) に対する細胞移植・再生治療の開発の一環として移植細胞の供給源の開発を行う。すなわちマウスにおいてレトロウイルスによる遺伝子導入により体細胞から未分化増殖能・分化多能性を持つように誘導された人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, 以下 iPS 細胞と略) から網膜を構成する細胞、特に網膜変性疾患において移植細胞の供給が必要となる網膜視細胞への分化誘導の研究、および分化誘導で得られた細胞が眼内への細胞移植後に視機能の維持・再生に有効かどうかの検証実験を行う。

2. 研究の進捗状況

人工多能性幹 (iPS) 細胞を用いて網膜細胞の分化誘導を試みるという目的に対して、ES 細胞からの網膜細胞の分化誘導に用いた方法を応用して分化誘導を行った。マウス iPS 細胞からの分化誘導は、未分化 iPS 細胞をフィーダー細胞と分離して無血清培地中で浮遊培養を 9 日間行い、その間、培地に Wnt および Nodal シグナルの阻害薬を加えた。その後接着培養を行い、約 15 日目に神経網膜の前駆細胞のマーカである Rx と Pax6 陽性の細胞および網膜色素上皮の前駆細胞のマーカである Mitf と Pax6 陽性の細胞を免疫細胞染色および RT-PCR で確認した。さらに分化開始後約 30 日目にタイトジャンクションのマーカである ZO-1 で染色される多角形状の細胞を確認し、約 45 日目には網膜色素上皮のマーカである RPE65 陽性の細胞を確認した。分化開始 30 日目には視細胞の前駆細胞のマーカである Crx 陽性の細胞も確認

し、その後から培地にレチノイン酸およびタウリンを添加することにより、視細胞のマーカであるリカバリンとロドプシン陽性の細胞を確認した。同様にヒト iPS 細胞からの分化誘導は、未分化 iPS 細胞をフィーダー細胞と分離して無血清培地中で浮遊培養を 20 日間行い、その間、培地に Wnt および Nodal シグナルの阻害薬を加えた。その後接着培養を行い、約 40 日目に神経網膜の前駆細胞のマーカである Rx と Pax6 陽性の細胞および網膜色素上皮の前駆細胞のマーカである Mitf と Pax6 陽性の細胞を確認した。さらに分化開始後約 60 日目に色素を有する多角形の網膜色素上皮様の細胞を確認した。分化開始 90 日目には視細胞の前駆細胞のマーカである Crx 陽性の細胞も確認し、その後から培地にレチノイン酸およびタウリンを添加することにより、120 日目には視細胞のマーカであるリカバリンとロドプシン陽性の細胞を確認した。一方で複数の未分化 iPS 細胞株から同じ方法を用いて分化誘導を行った結果から、iPS 細胞株によって分化誘導の効率が異なることも確認した。使用した未分化 iPS 細胞株はレトロウイルスによって 3 遺伝子 (OCT3/4, SOX2, KLF4) あるいは 4 遺伝子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) を導入して作製されたものであったが、導入された遺伝子の違いによる分化誘導の効率の差は見られなかった。以上の結果から、マウスおよびヒト iPS 細胞から網膜視細胞および色素上皮細胞が分化誘導されたと考えられ、網膜細胞移植の細胞源として iPS 細胞を利用できる可能性が示された。iPS 細胞からの網膜細胞の分化誘導については分化誘導の効率の改善も課題であるが、細胞株ごとの分化効率にも差

があるため、患者の自己細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けては同一患者から作製した細胞株間での差異も検討する必要があることが示唆された。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

マウスおよびヒト iPS 細胞から網膜視細胞および網膜色素上皮細胞への分化誘導が可能なことは示された。動物への移植実験についても網膜色素上皮細胞を用いての検討が進行中である。

4. 今後の研究の推進方策

iPS 細胞由来の網膜色素上皮細胞についてはモデル動物への移植実験により有効性、安全性の確認が今後必要である。視細胞については分化効率を上げる、あるいは純化して濃縮するなどの条件検討が必要と考えられる。

5. 代表的な研究成果

(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 1 件)

①Hirami Y, Osakada F, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, Ikeda H, Yoshimura N, Takahashi M. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. Neuroscience Letters 458 126-131 2009 査読有

[学会発表] (計 4 件)

①平見恭彦、ヒト人工多能性幹細胞由来網膜色素上皮細胞および視細胞の分化誘導. 第113回 日本眼科学会総会、2009.4.16-19 東京

②平見恭彦、ヒト人工多能性幹細胞由来網膜色素上皮細胞および視細胞の分化誘導. 第8回 日本再生医療学会総会、2009.3.5-6 東京

③平見恭彦、Generation of retinal progenitor cells from mouse induced pluripotent stem cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2008 Annual Meeting, 2008.4.27-5.1 フォートローダーデール 米国

④平見恭彦、誘導多能性幹細胞からの網膜視細胞への分化誘導. 第112回 日本眼科学会総会、2008.4.17-20 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]