

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592265

研究課題名（和文） 再生に向けたヒト人工多能性幹細胞を用いた網膜変性疾患の病態解明

研究課題名（英文） An analysis of the retinal degenerative diseases using iPS cells

研究代表者

小沢 洋子 (OZAWA YOKO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90265885

研究成果の概要（和文）：

再生に向けたヒト人工多能性幹細胞(induced Pluripotent Stem cell; iPS細胞)を用いた網膜変性疾患の病態解析をするために、iPS細胞から分化誘導した網膜細胞を用いた実験を行った。山中研究室より供与された201B7細胞に加え、患者皮膚細胞に山中4因子をレトロウイルスで導入することで樹立した患者の遺伝子異常を持ったiPS細胞において、いくつかの液性因子を投与することで網膜細胞を分化誘導した。この分化誘導した培養細胞において、網膜細胞特異的のマーカーを発現している細胞の死に関して解析している。

本研究において、患者遺伝子異常を持つiPS細胞由来の網膜細胞を培養可能になることは、その遺伝子異常による病態の解析に必須であり、重要なステップであった。引き続き研究を進めることが今後の網膜変性疾患に対する新規治療法の開発に向けて重要である。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the pathogenesis of the retinal degenerative diseases using iPS cell-induced retinal cells. We generated the iPS cell which conserves patient's gene sequences. Retinal cells were induced both from control iPS cells and the patient-derived iPS cells, and analyzed the characteristics of the cells. This research was valuable to clarify the pathogenesis of the retinal degenerative disease, and further study is now required to explore a new therapeutic approach.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：網膜・視細胞・再生・iPS・神経保護

1. 研究開始当初の背景
遺伝子異常に基づく網膜色素変性症

などでは、発症時から徐々に進行して失明に至るが、進行していく視機能低下を

抑制する治療法で安定した効果を得られるものはほとんどなかった。神経幹細胞の研究が進むにつれ、網膜の分野でも再生治療への期待は大きくなってきているが、病的な既存の網膜神経細胞の機能回復による機能再生治療にせよ、幹細胞を用いた再生治療にせよ、その治療法を確立するためには治療対象となる組織である網膜の病態解明が必要である。一方、異常遺伝子が明らかになっているも、網膜神経細胞障害(死)のメカニズムは今のところ、わかっていないものが多い。網膜視細胞の死のメカニズムに関しては、マウスを用いた実験の報告が以前からあるが(Delyfer et al. *Biol Cell* 2004 総説)不明の点も多く、ヒト網膜細胞での研究は、検体を採取し難いことからこれまでほとんど不可能であった。一方、ヒト線維芽細胞から人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPS細胞)を作成する方法が発表され(Takahashi, Yamanaka *Cell* 2006)これを用いて網膜細胞を分化誘導すれば、遺伝情報を維持したままのヒト網膜細胞を誘導し培養できる可能性があった。

2. 研究の目的

網膜色素変性症の患者細胞からiPS細胞を樹立し、網膜細胞障害(死)のメカニズムを分子レベルで解析することを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子異常を持つ網膜色素変性症患者の皮膚組織を採取し、Yamanakaらの方法を用いてすべての体細胞に分化しうるiPS細胞を樹立した。これを網膜視細胞に分化誘導する方法を再現した。そして、細胞生物学的解析を行い、患者異常遺伝子を持つ網膜視細胞の死のメカニズムを解析した。

4. 研究成果

遺伝子異常を持つ網膜色素変性症患者の皮膚組織を採取し、iPS細胞を樹立した。そのうえでiPS細胞としての妥当性を、遺伝子発現、および三胚葉への分化能の解析により確認した。さらに、網膜視細胞への分化を研究室でも再現することに成功した。視細胞であることはロドプシンなどの網膜の各細胞特異的マーカーを発現しているかで解析した。その網膜視細胞の性質の詳細を細胞死のマーカーを中心に解析した。

5. 主な発表論文等

(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28件)すべて査読有

1. Blockade of vascular adhesion protein-1 attenuates choroidal neovascularization. Yoshikawa N, Noda K, Ozawa Y, Tsubota K, Mashima Y, Ishida S. *Mol Vis*. 2012;18:593-600. Epub 2012 Mar 2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3298450/?tool=pubmed>
2. The Vision Van, a Mobile Eye Clinic, Aids Relief Efforts in Tsunami-stricken Areas. Oshima CR, Yuki K, Uchida A, Dogru M, Koto T, Ozawa Y, Tsubota K *Keio J Med*. 2012 Mar;61(1):10-4. <http://www.kjm.keio.ac.jp/past/61/1/10.pdf>
3. Vision preservation during retinal inflammation by anthocyanin-rich bilberry extract: cellular and molecular mechanism. Miyake S, Takahashi N, Sasaki M, Kobayashi S, Tsubota K, Ozawa Y. *Lab Invest*. 2012 Jan; 92(1):102-9. doi: 10.1038/labinvest.2011.132.
4. **Usage** of micronutrient supplement for preventing advanced Age-related Macular Degeneration in Japan. Sasaki M, Shinoda H, Koto T, Uchida A, Tsubota K, Ozawa Y*. *Archives of Ophthalmology*. 2012.Feb; 130(2): 254-5. *Corresponding author. doi:10.1001/archophthol.2011.1368
5. Neuroprotective Effects of Lutein in the Retina. Ozawa Y*, Sasaki M, Takahashi N, Kamoshita M, Miyake S, Tsubota K. *Current Pharmaceutical Design*. 2012; 18(2): 51-6. *Corresponding author. doi: [10.2174/138161212798919101](http://dx.doi.org/10.2174/138161212798919101)
6. The formation of an angiogenic astrocyte template is regulated by the neuroretina in a HIF-1 dependent manner. Nakamura-Ishizu A, Kurihara T, Okuno Y, Ozawa Y, Kishi K, Goda N, Tsubota K, Okano H, Suda T, Kubota Y. *Dev Biol*. 2011 Dec 24. [Epub ahead of print]

- doi:10.1016/j.ydbio.2011.12.027
7. Neuroprotective response after photodynamic therapy: Role of vascular endothelial growth factor. Suzuki M, Ozawa Y*, Kubota S, Hirasawa M, Miyake S, Noda K, Tsubota K, Kadonosono K, Ishida S. *J Neuroinflammation*. 2011 Dec 16;8:176. *Corresponding author. doi:10.1186/1742-2094-8-176
 8. Neural degeneration in the retina of the streptozotocin (STZ)-induced type 1 diabetes model. Ozawa Y*, Kurihara T, Sasaki M, Ban N, Yuki K, Kubota S, Tsubota K. *Experimental Diabetes Research* 2011;2011:108328. Epub 2011 Nov 17. Review. *Corresponding author. "Focus Issue on Diabetic Retinopathy" doi:10.1155/2011/108328
 9. Roles of AMP Activated Protein Kinase in Diabetes-Induced Retinal Inflammation. Kubota S, Ozawa Y*, Kurihara T, Sasaki M, Yuki K, Miyake S, Noda K, Ishida S, Tsubota K. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Nov 25;52(12):9142-8. *Equally Contributed. *Corresponding author. doi: 10.1167/iovs.11-8041
 10. Biological role of lutein in the light-induced retinal degeneration. Sasaki M, Yuki K, Kurihara T, Miyake S, Noda K, Kobayashi S, Ishida S, Tsubota K, Ozawa Y*. *J Nutr Biochem*. 2011 Jun 8. [Epub ahead of print] *Corresponding author. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.01.006
 11. Retinal ganglion cell loss in superoxide dismutase 1 deficiency. Yuki K, Ozawa Y, Yoshida T, Kurihara T, Hirasawa M, Ozeki N, Shiba D, Noda K, Ishida S, Tsubota K. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jun 13;52(7):4143-50. Print 2011 Jun. doi: 10.1167/iovs.10-6294
 12. Transcriptional factors associated with epithelial-mesenchymal transition in choroidal neovascularization. Hirasawa M, Noda K, Noda S, Suzuki M, Ozawa Y, Shinoda H, Inoue M, Ogawa Y, Tsubota K, Ishida S. *Mol Vis*. 2011;17:1222-30. Epub 2011 May 6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3102030/?tool=pubmed>
 13. Clinical findings in a choroideremia patient who underwent vitrectomy for retinal detachment associated with macular hole. Shinoda H, Koto T, Fujiki K, Murakami A, Tsubota K, Ozawa Y. *Jpn J Ophthalmol*. 2011 Mar;55(2):169-71. Epub 2011 Mar 13. *Corresponding author. DOI: 10.1007/s10384-010-0911-0
 14. Hydrogen and N-acetyl-L-cysteine rescue oxidative stress-induced angiogenesis in a mouse corneal alkali-burn model. Kubota M, Shimmura S, Kubota S, Miyashita H, Kato N, Noda K, Ozawa Y, Usui T, Ishida S, Umezawa K, Kurihara T, Tsubota K. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jan 21;52(1):427-33. Print 2011 Jan. doi: 10.1167/iovs.10-6167
 15. Regulation of posttranscriptional modification as a possible therapeutic approach for retinal neuroprotection. Ozawa Y, Kurihara T, Tsubota K, Okano H. *J Ophthalmol*. 2011;2011:506137. Epub 2010 Nov 7. doi:10.1155/2011/506137
 16. Resveratrol prevents light-induced retinal degeneration via suppressing activator protein-1 activation. Kubota S, Kurihara T, Ebinuma M, Kubota M, Yuki K, Sasaki M, Noda K, Ozawa Y, Oike Y, Ishida S, Tsubota K. *Am J Pathol*. 2010 Oct;177(4):1725-31. Epub 2010 Aug 13. DOI: 10.2353/ajpath.2010.100098
 17. Retinal aging and sirtuins. Ozawa Y, Kubota S, Narimatsu T, Yuki K, Koto T, Sasaki M, Tsubota K. *Ophthalmic Res*. 2010;44(3):199-203. Epub 2010 Sep 9. Review. DOI: 10.1159/000316484
 18. Secondary macular hole formation with presumed evulsion of foveal hard exudates in a patient with diabetic retinopathy. Tomita Y, Noda K, Shinoda H, Ozawa Y, Tsubota K, Ishida S. *Jpn J Ophthalmol*. 2010 Jul;54(4):366-8.

- Epub 2010 Aug 11 DOI:
10.1007/s10384-010-0823-z
19. Eicosapentaenoic acid suppresses ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis. Suzuki M, Noda K, Kubota S, Hirasawa M, Ozawa Y, Tsubota K, Mizuki N, Ishida S. *Mol Vis*. 2010 Jul 17;16:1382-8.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2905642/?tool=pubmed>
 20. von Hippel-Lindau protein regulates transition from the fetal to the adult circulatory system in retina. Kurihara T, Kubota Y, Ozawa Y, Takubo K, Noda K, Simon MC, Johnson RS, Suematsu M, Tsubota K, Ishida S, Goda N, Suda T, Okano H. *Development*. 2010 May;137(9):1563-71. doi: 10.1242/dev.049015
 21. Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. Sasaki M, Ozawa Y, Kurihara T, Kubota S, Yuki K, Noda K, Kobayashi S, Ishida S, Tsubota K. *Diabetologia*. 2010 May;53(5):971-9. Epub 2010 Feb 17. DOI: 10.1007/s00125-009-1655-6
 22. Mechanism of visual sensations experienced during pars plana vitrectomy under retrobulbar anesthesia. Sugisaka E, Shinoda K, Sano RY, Ishida S, Imamura Y, Ozawa Y, Shinoda H, Suzuki K, Tsubota K, Inoue M. *Ophthalmologica*. 2010;224(2):103-8. Epub 2009 Sep 1. DOI: 10.1159/000235858
 23. Retinal phototoxicity in a novel murine model of intraocular lens implantation. Kurihara T, Omoto M, Noda K, Ebinuma M, Kubota S, Koizumi H, Yoshida S, Ozawa Y, Shimmura S, Ishida S, Tsubota K. *Mol Vis*. 2009 Dec 12;15:2751-61.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2793903/?tool=pubmed>
 24. Secondary macular hole associated with central retinal vein occlusion treated with corticosteroid injection. Hirasawa M, Noda K, Shinoda H, Ozawa Y, Tsubota K, Ishida S. *Jpn J Ophthalmol*. 2009 May;53(3):279-81. DOI:10.1007/s10384-009-0665-8
 25. Involvement of hyaluronan and its receptor CD44 with choroidal neovascularization. Mochimaru H, Takahashi E, Tsukamoto N, Miyazaki J, Yaguchi T, Koto T, Kurihara T, Noda K, Ozawa Y, Ishimoto T, Kawakami Y, Tanihara H, Saya H, Ishida S, Tsubota K. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Sep;50(9):4410-5. Epub 2009 Apr 1 DOI: 10.1167/iovs.08-3044
 26. (Pro)renin receptor-mediated signal transduction and tissue renin-angiotensin system contribute to diabetes-induced retinal inflammation. Satofuka S, Ichihara A, Nagai N, Noda K, Ozawa Y, Fukamizu A, Tsubota K, Itoh H, Oike Y, Ishida S. *Diabetes*. 2009 Jul;58(7):1625-33. Epub 2009 Apr 23. DOI: 10.2337/db08-0254
 27. Prevention of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis with resveratrol by inhibiting oxidative damage and nuclear factor kappaB activation. Kubota S, Kurihara T, Mochimaru H, Satofuka S, Noda K, Ozawa Y, Oike Y, Ishida S, Tsubota K. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Jul;50(7):3512-9. Epub 2009 Mar 11. DOI: 10.1167/iovs.08-2666
 28. Neuroprotective effect of an antioxidant, lutein, during retinal inflammation. Sasaki M, Ozawa Y, Kurihara T, Noda K, Imamura Y, Kobayashi S, Ishida S, Tsubota K. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Mar;50(3):1433-9. Epub 2008 Nov 7. DOI: 10.1167/iovs.08-2493
- [学会発表](計4件)
1. Yoshida T, Koizumi H, Yuki K, Hirabayashi Y, Suzuki K, Mitani K, Tsubota K, Shimmura S, Ozawa Y, Okano H. A gene therapy for a gene mutation in human iPS cell using helper-dependent adenoviral vector. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual*

- Meeting. Fort Lauderdale, FL, USA, 2011/5/1-5/5
2. Yoshida T, Koizumi H, Yuki K, Tsubota K, Okano H, Ozawa Y. Purification of iPS cells derived from a retinitis pigmentosa patient from feeder cells. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting. Fort Lauderdale, FL, USA, 2010/5/2-5/6
 3. Ozawa Y, Nakao K, Tsubota K, Yoshimura A, Okano H. SOCS3 is required to temporally fine-tune photoreceptor cell differentiation. OIST Retinal Workshop "The Retina: Neural Stem Cells and Photoreceptor Degeneration" Okinawa, 2009/11/9-11
 4. Yoshida T, Kume S, Harada T, Tsubota K, Ozawa Y. Expression of Epiplakin1 in the developing and adult mouse retina. OIST Retinal Workshop "The Retina: Neural Stem Cells and Photoreceptor Degeneration" Okinawa, 2009/11/9-11

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.keio-eye.net/research/rcb.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小沢 洋子 (OZAWA YOKO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90265885

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし