

## 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31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592270

研究課題名（和文） 網膜移植再生治療を目標とした網膜変性モデルを用いての移植の条件検討

研究課題名（英文） Modulation of host environment in retinal cell transplantation using retinal degeneration models.

## 研究代表者

万代 道子 (MANDAI MICHIKO)

独立行政法人理化学研究所・網膜再生医療研究チーム・研究員

研究者番号：80263086

## 研究成果の概要（和文）：

網膜変性モデルの変性過程でのホスト環境の変化と移植細胞（幼若視細胞）の移植条件を検討した。移植には細胞変性進行期終了後の、かつグリオーシス前の時期が適していた。また、適正期早期には炎症抑制剤、シナプス形成促進因子などの添加が、後期にはグリオーシス抑制剤の添加が生着を促進した。併せてES/iPS細胞からの分化視細胞を今後の移植実験用に準備した。

## 研究成果の概要（英文）：

Retinal degeneration models as were studied as a host for the acceptability of transplanted cells. Graft cells survived best when transplanted within a period of after the massive cell death and before the host gliosis progresses. In this time window, anti-inflammatory reagent and a synaptogenic factor enhanced graft cell (neonatal retinal cells) survival, and anti-gliotic reagent enhanced graft cell survival in later transplantation. We also prepared ES/iPS derived retinal cells for future practical transplantation experiments.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：眼科学・再生医学・網膜変性・網膜移植・視細胞移植

## 1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性、加齢黄斑変性などの重篤な眼科疾患において、視細胞の変性は致命的かつ非可逆的な視力予後悪化因子であり、我が国では現在のところ実用化された治療は皆無に等しい。

近年、(1)米国では胎児網膜の移植による網膜色素変性の改善が報告され、また(2)再生医療分野の進展に伴い、動物実験レベルでは幼若な視細胞、体性幹細胞、胚性幹細胞より分化誘導された幼若視細胞などの移植による生着成果も散見されるようになったが、(1)については我が国の現状を鑑みて移植材料の十分な調達が困難であり、また(2)についても実用的な機能回復が得られるほど効率のよい生着率は達成されていない。

近年になって、適正な分化段階の視細胞をマウス成体網膜下に移植することにより、野生株成体マウスに移植視細胞が機能的に生着する可能性が示された。(MacLaren, R.E. et al Nature 444:203-207 2006)。

このことは、変性網膜においても適正なタイミングや条件を検討すれば移植細胞が機能的に生着しうる可能性を示唆していると考えられる。

我々は ES 細胞から視細胞を分化させる方法をマウス、サル、ヒト細胞において確立、報告している(Ikeda et al. Pro Nat Acad Sci. 2005, Osakada F, Ikeda H, et al. Nat Biotechnol. 2008)

本研究においては ES 細胞またはそれに準ずる万能細胞 (iPS 細胞) から分化させた視細胞移植による変性網膜の機能改善を最終目標として、臨床応用可能な実用的な移植プロトコルを確立していくことをねらいとする。

## 2. 研究の目的

我々はこれまで網膜幼若細胞を用いて変性網膜での移植条件を検討し、コンドロイチナーゼや MMP-2 が移植細胞の宿主への侵入や突起伸展を促進する可能性を示し (Suzuki et al. Stem Cell, 2007, Suzuki et al. Cell transplant 2007)、また免疫学的なホストの環境修飾が移植細胞の生存率を高める可能性について報告してきた (Oishi et al. Biochem Biophys Res Commun, 2008)。しかし、実用的な機能回復を期待できるほどの移植効率はまだ実現できていなかった。

本課題を始めるにあたり、我々のところでも野生株マウス成体網膜に移植視細胞が形態的にほぼ完全な形で多数生着しうることを確認した。そこで、本課題ではマウス網膜変性モデルを用いて、変性過程におけるホスト側の環境変化及びその進行過程からみた移植細胞の生着を評価する事を目的とした。併せて、移植環境をより生着しやすく変化させるような因子を添加することにより、生着効率が上がるかどうかを検討した。

同時に ES/iPS 細胞から実用的に移植実験に使用できる視細胞分化系を試みた。

また、中、大型動物への移行実験を行った。

## 3. 研究の方法

変性モデルにおける移植条件を決定するにあたって、ホスト側の移植細胞受け入れ可能なタイムウィンドウを発症時期、進行速度の異なる複数のマウス変性モデルを用いて検討した。

移植細胞にはすでに野生株において生着良好なことが確認できている生後 4-7 日令の GFP マウス網膜を用い、タイミングを検討するにあたっては、MNU 傷害モデル及び遺伝モデル (rd マウス) を用いた。

主に変性進行期の生着（移植細胞の残存又は視細胞層の維持効果）、変性後の生着（変性網膜の再建）の2視点から実験を行った。ホストの環境因子として、進行期、変性後、のマイクログリア、ミュラーグリア、外境界膜などの状態をまず評価し、移植細胞の生着数を評価した。さらに、背景因子に左右するような抗炎症因子、シナプス形成促進因子、グリオシス抑制因子などの添加を行い、生着の向上が得られるかを評価した。

また、移植細胞の生着が良好な条件で、電気生理評価（ERG）を行った。さらに移植細胞をマウス網膜細胞から ES 細胞および iPS 細胞からの分化視細胞に移行するにあたって、視細胞マーカーである *nrl* プロモーター下に GFP を発現するウィルスベクターを作成、遺伝子導入後 GFP を用いて選別した ES 由来 *nrl* 陽性細胞が実際に移植においてマウス新生仔網膜細胞同様有用であるかどうか確認を試みた。

#### 4. 研究成果

ホスト環境については、MNU 薬剤傷害モデルでは持続的なマイクログリアの浸潤が2週間遷延する傾向があり、その後約1週間後にはグリオシス形成がみられたが、rd マウスにおいてはマイクログリア、ミュラーグリアとも視細胞の変性時期（-4週）には GFAP 発現上昇、マイクログリアの集積など活性化がみられたが、その時期をすぎると一旦沈静化傾向がみられた。その後、6週過ぎ頃より、rd モデルにおいてもグリオシスが増強する傾向がみられた。

MNU モデルにおいては進行期の後すぐにグリオシスがおこるため、通常では良好な生着は得られず、グリオシスの時期にコンドロイチナーゼ ABC(ChABC)を添加することにより、有意な生着改善を得た。Rd モデ

ルにおいても変性進行期の生着は不良で、4-6週でもっとも安定した生着が得られ、さらにグリオシスの始まる6週以降においては ChABC 添加により有意な生着改善が得られた。

次に、rd マウスの生後4週から8週の間に移植を行い、シナプス促進効果を期待できる valproic acid (VPA) や、変性網膜の炎症反応を緩和や拒絶反応を抑制する目的で、免疫系を Th2 系にシフトする glatiramer acetate (GA)やシクロスポリンなどによる生着効果をさらに検討した。GA や VPA の添加は生後4週に移植で有意に生着細胞数を増加させた。また GA は移植部位へのマイクログリアの集積も抑制した。

生着細胞を経時的に観察すると、移植後1ヶ月までに一旦網膜下の細胞数は減少するもののその後約3ヶ月はほぼ一定しており、最初の1ヶ月までにホストに何らかの形で組み込まれた細胞が中長期的に残る可能性が示唆された。また、この時点までの生着はシクロスポリン投与の有無の影響はなく、短期的には拒絶による生着阻害の影響は少ないと思われた。また仔マウスより採取した幼若視細胞を移植後、ホスト網膜をとりだして、移植細胞がホスト網膜下で成熟し、視細胞としての電気生理学的特徴を示す事を確認した。ただ、ERG にて移植細胞の機能は検出できなかった。そこで、現在、多電極アレイを用いた電気生理学的機能系の条件検討を行い、網膜3次ニューロンから効率よくシグナルを拾う方法を確立した。この系を用いた機能解析は今後の課題である。

また大型動物での実験準備としてウサギに仔ウサギの網膜細胞の移植を行い、マウスと同様、外層構造の保たれた網膜では細胞が生着すること確認した。ただ、ウサギについてはまだ効率が十分とはいえず、大型動物につ

いてはさらに検討を要する。

更に、ES/iPS 細胞由来視細胞の使用に移行する準備として、Nrl プロモーター下に GFP を発現するようデザインしたレンチウイルスベクターを ES 細胞からの分化細胞に導入し、分化細胞の同定を試みた結果、分化視細胞をウイルス導入によりある程度確認できたものの、分化効率、導入効率、特異性にいずれにおいても改善を要すると思われた。2011 年になり、網膜を ES 細胞から立体分化培養する方法が永楽らにより報告されたため、方針を変更、今年度はこの方法を導入し、ES/iPS 細胞から移植に用いる良質の細胞を実用的細胞数用意できるようになった。同様、NRL-GFP マウスから iPS 細胞株を作成し、ここから GFP 陽性の視細胞前駆細胞を分化することにも成功した。この方法により当初予定していた ES 細胞からの分化細胞に Nrl プロモーター-GFP を導入する方法より効率よく移植細胞が得られるようになった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Mandai M, Ikeda H, Jin ZB, Iseki K, Ishigami C, Takahashi M

Use of lectins to enrich mouse ES-derived retinal progenitor cells for the purpose of transplantation therapy.

Cell Transplantation 19:9-19 2010.

(査読：有)

② Homma K, Osakada F, Hiramami Y, Jin ZB, Mandai M, Takahashi M

Detection of Localized Retinal Malfunction in Retinal Degeneration Model Using a Multielectrode Array System

J Neurosci Res 87:2175-2182 2009.

(査読：有)

[学会発表] (計 14 件)

① Hiramami Y, Kurimoto Y, Konishi S, Mita O, Harada N, Kamao H, Mandai M, Kiryu J, Takahashi M

A prototype instrument for subretinal transplantation of retinal pigment epithelial cell sheets.

第 50 回日本網膜硝子体学会総会

2011.12.3 東京

② 万代道子

移植網膜の機能評価

第 65 回日本臨床眼科学会

2011.10.7 東京

③ 金子潤、万代道子、本間耕平、高橋政代  
視細胞移植と網膜機能

第 15 回視覚科学フォーラム

2011.8.29 大阪

④ Hiroyuki Kamao, Satoshi Okamoto, Michiko Mandai, Yasuhiko Hiramami, Junichi Kiryu, Masayo Takahashi

Preparation of iPS-derived RPE Sheets for Transplantation Therapy.

ARVO 2011 Annual Meeting

2011.5.4 Fort Lauderdale, FL.U.S.A

⑤ 万代道子

マウス網膜変性モデルでの視細胞移植

第 10 回日本再生医療学会総会

2011.3.2 東京

⑥ Kohei homma, Satoshi Okamoto,

Michiko Mandai, Masayo Takahashi

Neuronal activities of transplanted retinal cells in retinal degeneration models

40th Society for Neuroscience

2010.11.16 San Diego, CA, USA

⑦ 万代道子

網膜の移植による再生医療

第 42 回日本臨床分子形態学会総会

2010.9.25 静岡

⑧ 本間耕平, 万代道子, 金子兵, 高橋政代  
網膜変性マウスにおける移植網膜視細胞の神経活動

第 33 回日本神経科学大会

2010.9.2 兵庫 (神戸)

⑨ 本間耕平, 万代道子, 高橋政代  
網膜変性マウスにおける移植網膜視細胞の神経活動  
第 14 回視覚科学フォーラム研究会

2010.8.27 茨城県 (つくば)

⑩ Kohei Homma, Zi-Bing Jin, Michiko

Mandai, Masayo Takahashi

Measurement Of Neuronal Activities Of Transplanted Retinal Cells In Retinal Degeneration Models

The Association for Research in Vision and Ophthalmology

2010.5.6 Fort Lauderdale, FL, USA

⑪ 万代道子

マウス変性網膜への視細胞移植の条件検討  
第 114 回日本眼科学会

2010.4.16 愛知 (名古屋)

⑫ 万代道子

Retinal transplantation therapy for rd1 mice

Okinawa Institute of Science and Technology International Workshop

"Retina: Neural Stem Cells and Photoreceptor Degeneration"

2009.11.10 沖縄

⑬ 万代道子

網膜の再生医療  
ヒト細胞学会

2009.8.22 東京

⑭ 万代道子

マウス変性網膜への視細胞移植  
第 113 回日本眼科学会総会

2009.4.24 東京

[図書] (計 1 件)

① 万代道子, 高橋政代

多能性幹細胞を用いた加齢黄斑変性の細胞移植治療

医学のあゆみ 2011

[その他]

ホームページ

独立行政法人理化学研究所

[http://www.cdb.riken.jp/jp/02\\_research/0202\\_creative23.html](http://www.cdb.riken.jp/jp/02_research/0202_creative23.html)

網膜再生医療研究開発プロジェクト  
<http://www.retinastem.jp/xoops/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

万代 道子 (MANDAI MICHIKO)

独立行政法人理化学研究所・網膜再生医療研究チーム・研究員

研究者番号: 80263086

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高橋 政代 (TAKAHASHI MASAYO)

独立行政法人理化学研究所・網膜再生医療研究チーム・チームリーダー

研究者番号: 80252443

本間 耕平 (HOMMA KOHEI)

独立行政法人理化学研究所・網膜再生医療研究チーム・研究員

研究者番号: 80462729