

令和 5 年 4 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19548

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来網膜神経節細胞と人工篩状板移植による網膜視神経再生

研究課題名(英文) Retinal optic nerve regeneration by human iPS cell-derived retinal ganglion cells and artificial sieve plate transplantation

研究代表者

中澤 徹 (Nakazawa, Toru)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30361075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞に対して網膜神経節細胞の特異的マーカーであるPou4F2遺伝子へのGFP蛍光標識をCrispr/cas9の技術を利用してゲノム編集を行った。分化誘導した立体網膜組織の内層でGFP蛍光の発現を認め、凍結切片での免疫染色でも抗GFP抗体と抗BRN3抗体の共染色を認めていた。この立体網膜組織から単離したヒトiPS-RGCをExplant cultureしたマウス網膜へ播種して生着を確認したところ、播種5日目の免疫染色でマウス網膜上に神経突起を有するGFP陽性細胞を確認することが出来た。ヒトiPS-RGCをマウス硝子体へ細胞注入を施行したが、1週間後の眼底にGFP陽性細胞は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は、眼圧や環境要因に加えて遺伝要因が発症に関与する多因子疾患であり、網膜神経節細胞死により視野障害が生じる。中途失明原因の第一位であるが、眼圧下降治療以外に有効な治療がなく、眼圧下降治療に対して抵抗性を示す患者への新規治療法の開発は急務である。その一つとして失われた網膜神経節細胞を補充するヒトiPS細胞由来網膜神経節細胞(iPS-RGC)移植が挙げられる。本研究では、ヒトiPS-RGCをマウス網膜上へ播種した際に神経突起伸長を有して生着することが確認出来た。この研究結果からでは異種間の拒絶反応が生じない可能性があり、臨床応用する際にHLAを適合せずに移植出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The GFP fluorescent labeling to the Pou4F2 gene, a specific marker of retinal ganglion cells, was performed on human iPS cells by genome editing using Crispr/cas9 technology. The expression of GFP fluorescence was observed in the inner layer of the differentiated retinal organoids, and immunostaining of frozen sections showed co-staining of anti-GFP and anti-BRN3 antibodies. Human iPS-RGCs isolated from the three-dimensional retinal organoids were seeded into explant-cultured mouse retinas. The GFP-positive cells with neurites outgrowth were confirmed on the mouse retina by immunostaining on the fifth day after seeding. Human iPS-RGCs were injected into the vitreous of mice, but no GFP-positive cells were observed in the fundus of the eye after one week.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜神経節細胞移植 ヒトiPS細胞由来網膜神経節細胞

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障は、眼圧や環境要因に加えて遺伝要因が発症に関与する多因子疾患であり、網膜神経節細胞(RGC)死により視野障害が生じる。本邦の中途失明原因の第一位であるが、眼圧下降治療以外に有効な治療がない。従って、眼圧下降治療に対して抵抗性を示す患者群の病態解明は特に重要な課題である。眼圧下降のみに依存した緑内障治療の現状を打破するために、申請者は機序依存的な個別化医療に資する創薬研究を行うことを目的とし、複合的な基礎・臨床研究を行ってきた。基礎研究では、緑内障を模倣した動物モデルを作成し(Nakazawa et al., J Neurosci. 2006)、網羅解析により RGC 死の重要な経路を証明した(Yasuda et al., PLoS One. 2014)。また、最新の遺伝子改変技術を緑内障研究に積極的に導入し、アデノ随伴ウイルスと CRISPR/Cas9 を用いた RGC 特異的なゲノム編集の実験系を確立した(Sato et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018)。加えて、臨床に即した検査方法を用いて電気生理学的・画像診断で詳細に再現性高く障害評価が出来る方法を確立した(Fujita et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 2017)。臨床研究では、患者を病態別に層別化する人工知能アルゴリズムを開発し(Omodaka et al., PLoS One. 2017)、血流や代謝産物などのバイオマーカーを探索できる環境を整備した(Kiyota et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018, Sato et al., Sci Rep. 2018)。さらに、世界最大規模の GWAS を展開し、日本人に特有な 7 つの緑内障と関連する遺伝子座を発見した(Shiga et al., Hum Mol Genet. 2018)。研究連携先である東北メディカルメガバンクが保有する正常人 12 万人のゲノムデータを解析することで、日本人に特有な緑内障感受性遺伝子が発見されることが期待され、これらの成果は個別化医療を着実に現実に近づけている。しかし、緑内障患者の内訳から感受性遺伝子は影響力が弱い可能性が考えられ、また、その分子の役割や機序の解明においてマウスとヒトによる種差の影響が無視出来ない。この問題を解決する手段としてヒト iPS 細胞の応用が考えられる。申請者らのグループではヒト iPS 細胞から高純度で RGC を作製することが可能になっており(iPS-RGC)、感受性遺伝子のヒト RGC へ与える影響を *in vitro* で解析出来る。しかし、細胞培養による実験系では眼内の環境がヒト RGC へ与える影響を解析することが出来ない。そこで本研究ではそれらの要件を全て満たす評価系として、ヒト iPS-RGC をマウス眼に異種移植・生着させることにより、より生体に近い環境下で感受性遺伝子や緑内障関連神経障害がヒト iPS-RGC に及ぼす影響を解析することを目的とした。

## 2. 研究の目的

患者由来の iPS 細胞から分化誘導した網膜神経節細胞(iPS-RGC)をヌードマウスの眼内に移植し、感受性遺伝子と RGC の生存やストレスマーカーとの関連を実臨床で用いられている医療機器により評価する。本研究成果は、GWAS により同定されたリスクアレルと緑内障病態の関連性を明らかにするとともに、緑内障治療において実現されなかった「ゲノム医療」への応用が期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 患者由来 iPS-RGC の作製

GWAS により同定されたリスクアレルをホモで持つ緑内障患者から iPS 細胞を作製する。この iPS 細胞に対して、RGC 特異的な転写因子である Pou4f2 のプロモーターの下流に EGFP を搭載したコンストラクトを、CRISPR/Cas9 を用いて遺伝子導入による影響を受けにくい領域である AAVS-1 領域に導入し stable clone を作製する。この iPS 細胞から立体構造網膜を分化誘導した後に iPS-RGC を単離する。

### (2) ヒト iPS-RGC のマウス眼内への移植

作製したヒト iPS-RGC を、拒絶反応が起こりにくいヌードマウスの硝子体内に移植し、既報(Venugopalan et al., Nat Commun. 2016)に従い網膜への生着を評価する。iPS-RGC を単離後の培養日数および移植する細胞数などの条件検討をおこない、iPS-RGC がマウス網膜へ生着する条件を最適化する。

### (3) 眼圧変動における移植後ヒト iPS-RGC の脆弱性評価

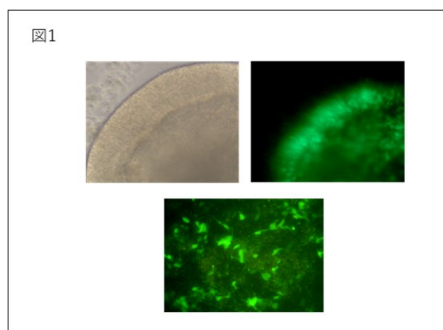
ヒト iPS-RGC 移植後のマウスを長期間飼育し、RGC 変性の過程を経時的に観察する。走査レーザー検眼鏡(SLO)を用いて *in vivo* イメージング(Fujita et al., Sci Rep. 2015)による蛍光

陽性ヒト iPS-RGC の生存数評価の他、OCT, ERG, VEP, オプトトリーによる画像診断、電気生理的評価および行動学的評価をおこなう。加えて、申請者らが開発した、鋭敏に RGC 障害を検出可能なストレス応答性レポーターを用いて、移植した iPS-RGC の障害と眼圧の関係を組織学的に解析する (Fujita et al., Sci Rep. 2015)。さらに、高眼圧に対する反応性を評価するため、マイクロビーズを前房内に投与し眼圧上昇を誘導したモデルを作製し、上記と同様の評価項目で実験を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) 蛍光標識した iPS-RGC の作製

マウス眼内へヒト iPS-RGC を移植した際にその生存や神経突起伸長を確認するために、網膜神経節細胞の特異的マーカーである Pou4F2 遺伝子への GFP 蛍光標識を Crispr/cas9 の技術を利用してゲノム編集を行った。遺伝子ノックインベクター及び gRNA を Lipofectamine® 2000 を用いて iPS 細胞に遺伝子導入し、導入した iPS 細胞からコロニーをピックアップした。iPS 細胞及び GFP 遺伝子内のプライマーを用いてノックインされた iPS 細胞を同定した。ヘテロ接合体のノックイン株から立体網膜組織へ分化誘導し、蛍光発現を確認した。さらに凍結切片を作製し、抗 Pou4F2 抗体及び抗 GFP 抗体で免疫染色を施行したところ、局在の一致を認めており、網膜神経節細胞が蛍光標識された iPS 細胞であることを確認した。この立体網膜組織から auto MACS pro を用いて網膜神経節細胞を単離した。既報で報告された維持培地で約 3 週間培養することが可能であった (図 1)。

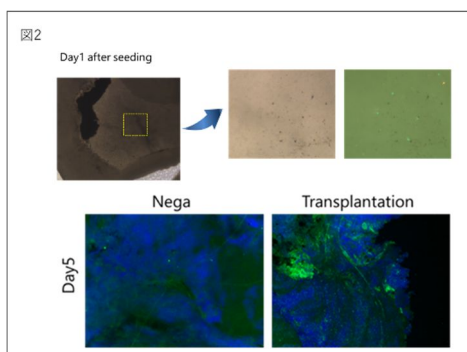


(図 1)  
Pou4F2-GFP iPS 細胞の作製と立体網膜組織での蛍光発現の確認

(左上) 分化誘導 50 日目の立体網膜組織  
(右上) 分化誘導 50 日目の立体網膜組織の GFP 蛍光  
(下) 立体網膜組織から単離した iPS-RGC

##### (2) マウス網膜への iPS-RGC 播種

ヌードマウス眼内へヒト iPS-RGC を移植する前に免疫反応により拒絶反応が生じるかどうかをマウスの網膜を摘出し、Explant culture を行いその上に iPS-RGC を播種することによって生着が得られるかどうかをまず確認することにした。8 週齢の C57BL/6 マウスを頸椎脱臼によって安楽死させ、眼球を摘出した。眼球から角膜、水晶体を除去し、HBSS に浸漬させた。残った硝子体および網膜色素上皮を神経組織から慎重に取り除き、網膜組織を平らにするために十字の形に切り込みを入れた後、網膜を PDL でコーティングした 6well plate に網膜神経節細胞層が上になるように静置した。静置した網膜にゆっくりと神経網膜培養液 (Neurobasal-A Medium、B27 supplement and Penicillin-Streptomycin-Fungizone) を添加した。37 °C、5%CO2 インキュベーターで培養し、培地は 1 日おきに交換した。次にヒト iPS 細胞由来立体網膜組織を 50 日目まで維持培養し、auto MACS pro を用いて iPS-RGC を単離した。単離した iPS-RGC を神経網膜培養液で懸濁し、Explant culture で培養したマウス網膜上へ播種した。播種翌日にはマウス網膜上に GFP 陽性の細胞を認めた。播種 5 日後にマウス網膜を 4% PFA で固定し、抗 GFP 抗体及び DAPI で免疫染色を施行した。マウスの網膜上で神経突起伸長を有する GFP 陽性細胞を認め、マウスの網膜上でヒト iPS-RGC が拒絶反応を受けず神経突起を伸長することが確認された。



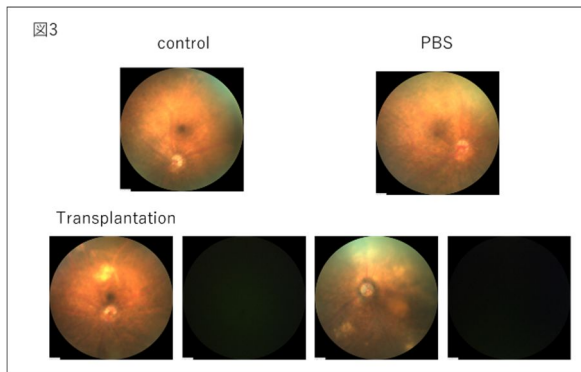
(図 2)  
Explant culture したマウス網膜へのヒト iPS-RGC 播種

(上段) 播種 1 日目の蛍光観察

(下段) 播種 5 日目のマウス網膜の免疫染色

### (3) マウス眼内への iPS-RGC 移植

Explant culture したマウス網膜へのヒト iPS-RGC の播種で明らかな拒絶反応を認めなかったため、神経細胞の移植に関してはヌードマウスではなく通常のマウスでも生着する可能性が考えられたため、8 週齢の C57BL/6 マウス眼内へヒト iPS-RGC を移植した。マウスは塩酸ケタミン及び塩酸キシラジンで麻酔を行い、50 日目まで維持培養したヒト iPS 細胞由来立体網膜組織から auto MACS pro を用いて iPS-RGC を単離した。神経網膜培養液 50ul で懸濁し、ハミルトンシリンジで 2ul 分を吸引しマウス硝子体内へ細胞移植を施行した。1 週間後に移植したマウスの眼を散瞳し Micron4 で眼底撮影を施行した。コントロール眼、PBS 注入眼と比較して移植眼では眼底に白色状の沈着を認めたが、明らかな GFP 陽性細胞は確認出来なかった。



(図4)  
ヒト iPS-RGC を移植したマウス眼底

(左上) コントロール  
(右上) PBS 注入眼  
(下段) ヒト iPS-RGC 移植眼

本研究結果からマウス網膜においてヒト iPS-RGC は拒絶反応を受けない可能性が示唆された。マウス眼への硝子体移植では明らかな網膜への生着を認めず、移植したヒト iPS-RGC が硝子体にトラップされた可能性や移植した細胞濃度の問題が考えられ、移植方法の再考が必要と考えられる。また蛍光発現だけでは分かりにくい可能性もあるため、免疫染色での確認も必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	小林 航  (Kobayashi Wataru)  (20646442)	東北大学・大学病院・助教    (11301)	
研究分担者	佐藤 孝太  (Sato Kota)  (50732327)	東北大学・医学系研究科・助教    (11301)	
研究分担者	Sharma Parmanand  (Parmanan Sharma)  (80451623)	東北大学・大学病院・准教授    (11301)	

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