

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25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791702

研究課題名（和文） 遺伝子導入によるヒトiPS細胞から視細胞への分化誘導促進

研究課題名（英文） Acceleration of photoreceptor induction from human iPSCs with gene transfer.

研究代表者

岡本 理志 (OKAMOTO SATOSHI)

独立行政法人理化学研究所・網膜再生医療研究開発プロジェクト・リサーチアソシエイト

研究者番号：50509106

研究成果の概要（和文）：

ES/iPS 細胞から視細胞への分化誘導期間を短縮することを目的とし、遺伝子導入による視細胞の分化促進の可能性を検討した。種々の検討にも関わらず当初目的は未解決であるが、その検討過程において、遺伝子導入の効果を検出する方法として視細胞特異的に EGFP を発現する Nrl-EGFP マウス iPS 細胞を作製し、またレチノイン酸シグナル阻害剤を用いた網膜前駆細胞の誘導効率上昇効果を見つけた。これらの成果は別の網膜再生研究において強力なツールとして働くことが期待される。

研究成果の概要（英文）：

I investigated the possibility of gene transfer in promoting effect in photoreceptor differentiation in order to shorten the culture period of photoreceptor induction from ESCs/iPSCs. Despite various examinations, the original purpose was pending, however, in the investigation process, Nrl-EGFP mouse iPSCs that expressed EGFP in photoreceptors specifically were produced to detect the effect of gene transfer, and the effect of an inhibitor in retinoic acid signaling to elevate the efficiency of retinal progenitor induction was developed. These research products have expected to work as powerful research tools in other studies of retinal regenerative medicine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：iPS細胞、ES細胞、分化誘導、網膜

1. 研究開始当初の背景

(1) 網膜は、眼に入った光情報を電気信号に

変え、神経細胞網を介して脳へ送り出すという視覚機能の中心的役割を担う組織である。

網膜は発生学的には脳や脊髄と同じく神経管由来の中樞神経系に属し、他の中樞神経組織と同様、一度障害を受けると再生しないものと長い間考えられてきた。しかし近年では網膜を構成する神経細胞も増殖、再分化し得ることが示され、また外から細胞を補充した際に、移植細胞が適切な位置に移動したり視機能が回復し得るといった、組織としての可塑性を示す研究結果も報告されつつある。私の所属する研究室においても、これまで網膜疾患により障害された視機能を回復させるべく研究に取り組んできた。

われわれが治療対象とする疾患は細胞の不可逆的な変性により最終的には失明を来す重篤な疾患であり、具体的には網膜色素変性や加齢黄斑変性を研究対象としてきた。網膜色素変性は遺伝子変異に由来する視細胞の変性疾患であり、他方の加齢黄斑変性は黄斑部において網膜色素上皮 (RPE) 層直下の脈絡膜から派生した新生血管が網膜内に侵入することにより、網膜内出血を起こしたり RPE 層や神経網膜層の障害を生じる。いずれもわが国を始め先進国においては中途失明原因の上位に挙がる疾患であるが、効果的な治療法がほとんどないのが現状である。この問題を解決するためにわれわれは細胞移植により失われた細胞を補填することによる再生治療を目指してきた。移植治療の初期段階では比較的障害範囲の限定された患者を対象と考えているため、移植細胞としては網膜色素変性においては視細胞、加齢黄斑変性においては RPE 細胞が候補と考えられるが、正常な生体内において視細胞と RPE は共存関係で維持されるため、将来的により重篤な患者への適用を検討する際にはどちらの疾患においても視細胞と RPE を共に移植することが必要と考えられる。

(2) 細胞移植研究のスタートとして、われわれはまずサル及びヒト ES 細胞からの網膜系細胞への分化誘導を試みた。ES 細胞は増殖が早く、移植に必要な多量の細胞を得ることが可能であると考えられたからである。ES 細胞から網膜細胞への分化誘導には、Sasai らが開発した SFEB 法を用いた (Watanabe ら、2005; Osakada ら、2008)。この方法は ES 細胞コロニーを細胞十数個からなる小片に分離した後、血清非存在下で浮遊培養することにより胚葉体形成を介して細胞分化を促進させる誘導法であり、その際 Wnt シグナル及び Nodal シグナルの阻害剤である Dkk-1 及び LeftyA を加えることにより、網膜前駆細胞を含む前脳系細胞への分化効率を高めている。この方法で網膜前駆細胞を分化誘導した後、さらに培地を変えて培養を続けることにより、一部は Mitf/Pax6 共陽性の RPE 前駆細胞を経て、RPE65 陽性の成熟

RPE 細胞へと最終分化した。また RPE 前駆細胞と並行してできる網膜神経前駆細胞をレチノイン酸、タウリン及び N2 サプリメント存在下で培養することにより、成熟視細胞が産生されることも確認した。さらにわれわれはサル ES 細胞由来 RPE 細胞を RCS ラット (内在性 RPE の遺伝子異常による視細胞変性モデルラット) に移植することにより、視細胞の生存・機能維持にも成功しており (Haruta ら、2004)、ES 細胞より作製した網膜細胞が移植先の生体内でも機能し得ることを確認した。またわれわれは、近年 Yamanaka らによって開発され、再生医療の大本命と注目されているヒト iPS 細胞 (Takahashi ら、2007) を用いても同様に SFEB 法を用いて視細胞及び RPE 細胞への分化誘導が可能であることを確認し (Hirami ら、2009)、臨床応用する際の障壁となり得る拒絶反応や倫理問題についても解決できることが期待されている。

2. 研究の目的

(1) このようにわれわれは視細胞や RPE 細胞をヒト ES 細胞や iPS 細胞からの分化誘導法により得る培養方法を確立させ、それらをモデル動物への移植研究等に利用しているが、成熟視細胞への分化誘導には 4~5 ヶ月と長い期間を要していた。また他の研究グループにおいてもヒト ES/iPS 細胞から網膜細胞へ効率良く分化させる試みが行われてきたが、われわれ同様視細胞や RPE 細胞への分化には長い時間を要していた。

(2) しかし培養操作は染色体の異常や多種微生物の感染等を起こしやすいと考えられており、実際の臨床現場での細胞移植治療を考慮すると、患者等から元となる細胞の供給を受けてから移植までの培養期間はできるだけ短い方が細胞の品質維持の点から望ましい。また移植細胞準備期間の長期化は、原料費や人件費等、治療コストの高騰にもつながると予想された。

(3) これらのことより、視細胞の分化誘導期間の短縮を図ることが必要であると考えられた。これを解決する手段の一つとして、遺伝子導入による細胞特性の改変が考えられた。先に挙げた iPS 細胞も、線維芽細胞や血液細胞などへ遺伝子導入を行なうことにより得られた細胞である。われわれも過去の研究において、ラット及びサルの光彩細胞に *Crx*, *Otx2*, *NeuroD* といった転写因子の遺伝子導入を行なうことにより、ロドプシンが産生されることを確かめており (Haruta ら、2001; Akagi ら、2004、2005)、遺伝子導入

により細胞特性の改変が可能であることを確かめてきた。そこで、既に構築されているES/iPS細胞からの分化誘導系と適切な遺伝子導入を組み合わせることにより、機能を有した視細胞の産生を短期間で行なうことが可能になると考え、本研究における目的とした。

3. 研究の方法

(1) 視細胞への分化誘導過程は、ES/iPS細胞から網膜前駆細胞への分化誘導段階と前駆細胞から視細胞への分化誘導段階の大きく2段階に分けて考えることができるため、そのどちらの分化段階への遺伝子導入が分化誘導促進を目指す上で効果的であるかを調べるため、まずマウスES/iPS細胞を用いて、種々の分化誘導条件による網膜前駆細胞及び視細胞が出現するまでのタイムコースを調べた。誘導される網膜前駆細胞の検出には主にRax-GFPノックインES細胞(Watayaら、2008)の培養系を用い、視細胞(杆体)の検出にはNr1-GFPトランスジェニックマウスよりiPS細胞を新たに作製して用いた(図1、2)。検討した分化誘導培養条件は、基礎培地としてDMEM、DMEM/F12、GMEM、IMDM、NeuroBasal培地を用い、FBS、KSR、N2、B27の添加物やDkk1、Lefty-A、Activin-Aなどのサイトカイン、DAPT等の小分子化合物の添加を行なった。さらにsphere形成に供する細胞数についても1,000~100,000/we11の間で条件を検討した。

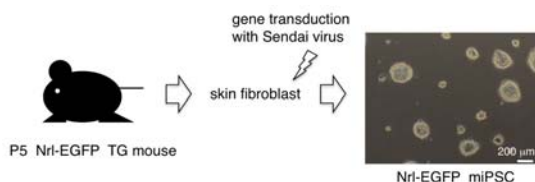


図1 Nr1-EGFPマウスiPS細胞

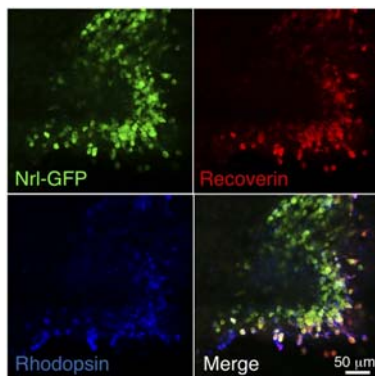


図2 Nr1-EGFPマウスiPS細胞から分化誘導した視細胞

(2) 続いて、遺伝子導入して評価を行なう場合、遺伝子導入に供される細胞のpopulationは高い方が良いため、網膜前駆細胞誘導効率のさらなる改善を検討した。具体的には、DMEM、DMEM/F12、GMEM、IMDM、NeuroBasal培地等の基礎培地、及び、FBS、KSR、N2、B27等の添加物、Dkk1、Lefty-A、Activin-A、FGF2、FGF8等のサイトカインの他、Rax陽性細胞への分化を阻害するシグナル(インスリンシグナル、レチノイン酸シグナル、ソニックヘッジホッグシグナル等)の阻害剤等を、その使用時期も合わせて検討を行なった。

(3) その後、網膜前駆細胞への遺伝子導入による視細胞誘導検討を行なった。具体的には、前駆細胞への遺伝子導入方法としてはレンチウイルスベクター系を使用し、CAGプロモーターあるいはドキシサイクリンで誘導発現可能なプロモーター下流に候補遺伝子のcDNAを置き、さらにIRESでmCherry繋いで導入遺伝子を発現する細胞を可視化できるようにした。Nr1-EGFPマウスiPS細胞を用いて視細胞への分化誘導培養を行ない、その過程上でCrx、Foxc1、Hdac1、Ikzf1、Neurod1、Nr2e1、Nr2e3、Otx2、Pax6、Pitx2、Prox1、Rax、Six3、Sox2、Tgif1、Vax2、Vsx1、Vsx2、Yy1のcDNAを発現するレンチウイルスを1種~複数種感染させ、GFPの蛍光発現を指標に視細胞(杆体)の産生時期を調べた。

4. 研究成果

(1) 上術した基礎培地と添加物類の様々な組み合わせを試したところ、Rax陽性の網膜前駆細胞の出現時期はいずれの方法を用いても分化誘導開始から7~8日めとバラツキはほとんどなかった(ただし条件によってはRax陽性細胞が全く観察されなかった)が、視細胞(杆体)の出現時期は分化誘導開始から15~29日と分化誘導条件や、あるいは同一条件内でも大きく変動が見られた。このことは、分化誘導前半の未分化細胞から前駆細胞への分化は培養条件にかかわらずある程度の期間が必要であるのに対し、後半の網膜前駆細胞から視細胞への分化誘導過程は条件次第で期間短縮が可能であることを意味し、適切な転写因子群の遺伝子導入による分化誘導促進も可能性があると考えられた。視細胞誘導の際に発現に時間を要する転写因子が分化誘導の律速段階と考えられ、導入遺伝子の候補となり得ると考えた。

(2) 上記結果に基づき、視細胞への分化誘導を加速するために網膜前駆細胞への遺伝子導入を検討するにあたっては、従来の培養条件では網膜前駆細胞の誘導効率がそれほど

高くなく、遺伝子導入効率も考慮するとその後の視細胞誘導条件を検討するには不十分であると考えられた。そこで次に、網膜前駆細胞誘導効率のさらなる改善を検討した。その結果、基礎培地に NeuroBasal 培地を用い、BSA 及び脂質混合物、AGN193109 (レチノイン酸受容体アンタゴニスト) を添加することで網膜前駆細胞の誘導効率が 35.1% となり (図 3)、十分に遺伝子導入検討実験に使用できる量の網膜前駆細胞の調製が可能になった。

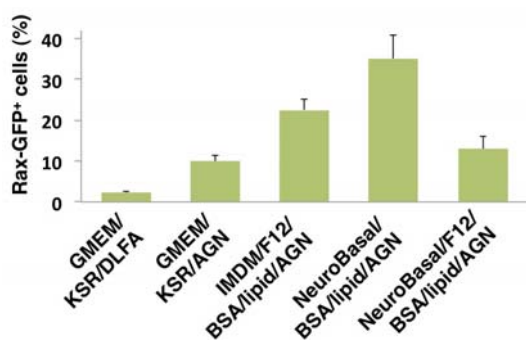


図 3 AGN193109 添加による網膜前駆細胞分化誘導効率の上昇

(3) これらの結果をベースに、実際に遺伝子導入による視細胞誘導促進の検討を行なった。Nr1-EGFP マウス iPS 細胞を網膜前駆細胞の出現するステージ (誘導開始後 7-10 日) まで分化誘導した後、Rax, Crx, Neurod1 等の cDNA を発現するレンチウイルスを感染させ、EGFP の蛍光発現を指標に視細胞 (杆体) の産生を調べたところ、EGFP の発現は 20 日目以降で出現したが、これまでの検討より遺伝子導入を行なわない種々の分化誘導条件での視細胞出現時期が誘導開始後 15~29 日目であったことから、遺伝子導入による分化誘導促進効果は確かめられなかった。また、EGFP 陽性細胞の割合についても、遺伝子導入を行なわない場合よりもむしろ低くなったことから誘導効率の点でも効果は認められず、遺伝子導入が Nr1-EGFP の発現 (つまり視細胞の誘導) に影響を及ぼしたかどうかも疑わしい結果となった。さらに最近他の研究グループより、細胞群の自己組織化を利用した極めて効率の良い分化誘導方法が発表された (Eiraku ら、2011 ; Nakano ら、2012) ことから、遺伝子導入による iPS 細胞からの視細胞誘導促進研究は期待される効果が低いと判断した。

(4) 以上のように、当初目標の遺伝子導入による ES/iPS 細胞からの視細胞分化誘導の期間短縮は未解決であるが、その検討過程で派生した成果である、Nr1-EGFP マウス iPS 細胞や AGN193109 添加による網膜前駆細胞の産生

効率上昇は、現在、視細胞移植を検討している別研究においても利用されており (未発表データ)、また今後も網膜の発生、再生に関する多くの研究に応用可能なツールとして広く利用されて行くことが期待される。

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 9 件)

① Homma K, Okamoto S, Mandai M, Gotoh N, Rajasimha HK, Chang YS, Chen S, Li W, Cogliati T, Swaroop A, Takahashi M, Developing rods transplanted into the degenerating retina of Crx-knockout mice exhibit neural activity similar to native photoreceptors, Stem cells, 査読有、印刷中

DOI:10.1002/stem.1372

② Mandai M, Homma K, Okamoto S, Yamada C, Nomori A, Takahashi M, Adequate time window and environmental factors supporting retinal graft cell survival in rd mice, Cell Medicine, 査読有、4 巻、2012, pp. 45-54 DOI:http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639315

③ Jin ZB, Okamoto S, Xiang P, Takahashi M, Integration-free iPS cells derived from retinitis pigmentosa patient for disease modeling, Stem Cells Translational Medicine, 査読有、1 巻、pp. 503-509 DOI:10.5966/sctm.2012-0005

④ Okamoto S, Takahashi M, Induction of retinal pigment epithelial cells from monkey iPS cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 査読有、52 巻、2011, pp. 8785-8790 DOI:10.1167/iovs.11-8129

⑤ Jin ZB, Okamoto S, Osakada F, Homma K, Assawachananont J, Hirami Y, Iwata T, Takahashi M, Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells, PLoS ONE, 査読有、6 巻、2011, e17084 DOI:10.1371/journal.pone.0017084

⑥ 岡本理志、高橋政代、加齢黄斑変性、実験医学、査読無、30 巻、2012, pp. 1646-1650 https://www.yodosha.co.jp/bookdata/9784758103237/9784758103237_contents.pdf

⑦岡本理志、鎌尾浩行、高橋政代、網膜色素上皮細胞移植による網膜再生医療、メディカル・サイエンス・ダイジェスト、査読無、37巻、2011、pp.312-315
<http://www.book-stack.com/browsing/msd201107rzt.pdf>

⑧岡本理志、高橋政代、ES細胞とiPS細胞、眼科、査読無、53巻、2011、pp.449-455
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40018802865>

⑨岡本理志、高橋政代、細胞移植による網膜疾患治療、実験医学、査読無、28巻、2010、pp.230-235
https://www.yodosha.co.jp/bookdata/9784758103046/9784758103046_contents.pdf

[学会発表] (計4件)

①Okamoto S、Transplantation of retinal pigment epithelium derived from iPS cells、WOC (World Ophthalmology Congress) 2012、2012/2/20、Abu Dhabi (UAE)

②Okamoto S、Homma K、Takahashi M、New induction method of photoreceptors from mouse pluripotent stem cells、ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 9th Annual Meeting、2011/6/15-18、Toronto (Canada)

③岡本理志、高橋政代、網膜色素上皮細胞移植に向けた取り組み、第10回日本再生医療学会、2011/3/1、東京

④Okamoto S、Kamao H、Mandai M、Takahashi M、Induction of RPE cells from monkey iPS cells. 2010 ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting、2010/5/4、Fort Lauderdale (Florida, US)

[産業財産権]

○出願状況 (計5件)

① 名称：網膜細胞への分化誘導方法
発明者：高橋政代、岡本理志
権利者：理化学研究所
種類：特許
番号：PCT/JP2012/65285
出願年月日：2012.6.14
国内外の別：国外

② 名称：Method of producing human retinal

pigment epithelial cells

発明者：Masayo Takahashi、Satoshi Okamoto、Noriko Sakai

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：13/408,642

出願年月日：2012.2.29

国内外の別：国外

③名称：網膜色素上皮細胞シートの製造方法

発明者：高橋政代、岡本理志、鎌尾浩行

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：PCT/JP2012/54631

出願年月日：2012.2.24

国内外の別：国外

④名称：網膜細胞への分化誘導方法

発明者：高橋政代、岡本理志

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：特願 2011-132712

出願年月日：2011.6.14

国内外の別：国内

⑤名称：網膜色素上皮細胞シートの製造方法

発明者：高橋政代、岡本理志、鎌尾浩行

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：特願 2011-040130

出願年月日：2011.2.25

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 理志 (OKAMOTO SATOSHI)

独立行政法人理化学研究所・網膜再生医療研究開発プロジェクト・リサーチアソシエイト

研究者番号：50509106