

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659769

研究課題名(和文) iPS細胞由来視細胞シート作成とそれを用いた網膜神経間ネットワーク構築機構の解明

研究課題名(英文) photoreceptor cell sheet derived from mouse iPS cells

研究代表者

上田 裕司 (Ueda, Yuji)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：00223470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：網膜組織は中枢神経系由来の組織で再生能を持たない。iPS細胞を用いて網膜を構成する細胞を分化誘導して、これを細胞シートとして2次元像を結ぶことができる形の網膜修復を目指している。ここではマウスiPS細胞にpax6を導入し作成した視細胞前駆細胞株を用いて、特定の培養条件下で高純度に杆体視細胞あるいは錐体視細胞に分化することを目指した。さらに高純度視細胞を温度感応性ポリマーを応用してシート状に培養して高度なシナプス再形成を行わせて、より生体に近い網膜神経層ことに視細胞層の再構築を行なった。今回の検討で、高純度の杆体視細胞シートが得られることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The retinal tissue is derived from the central nervous system and does not have the regeneration ability. Thus once damaged, regeneration of retina is almost impossible. We generated retinal progenitor cell lines from mouse iPS cells transfected with pax6 cDNA, and by using the cloned retinal progenitors we made retinal cell sheet including rhodopsin positive photoreceptor cells. They made massive synaptic connection among them and the sheet looked resembling native retinal neuron layers. It could be clinically applicable for patients with damaged retina.

研究分野：再生医学

キーワード：iPS細胞 網膜 視細胞 ロドプシン

1. 研究開始当初の背景

網膜組織は中枢神経系由来の組織であり、一旦障害を受けるとその修復は困難である。網膜疾患での失明の主要な原因は視細胞変性・壊死であることから、最終的に視細胞に分化できる視細胞前駆細胞の分化誘導と視細胞分化の調節機構の解明が待ち望まれている。理化学研究所の高橋らは胚性幹 (ES) 細胞から視細胞を分化誘導できたと報告している。

我々はマウス ES 細胞に神経発生に関わる転写因子の一つである pax6 を遺伝子導入した後、限界希釈法を用いることで網膜神経前駆細胞株を樹立した。(Ueda Y, et al. Transfection with pax6 gene of mouse ES cells and subsequent cell cloning induced retinal neuron progenitors, including retinal ganglion cell-like cell, in vitro. Ophthalmic Research 15;43(2):79-91 2009). 更に iPS 細胞に pax6 を導入し視細胞前駆細胞株を作成した (Ueda Y, et al. Establishment of retinal neuron progenitor cell clones by transfection with pax6 gene of mouse iPS cells. Neuroscience Letters 投稿中)。iPS 由来の細胞株は特定の培養条件下で高純度に杆体視細胞に分化する。

2. 研究の目的

網膜組織は中枢神経系由来の組織で再生能を持たない。各種の幹細胞から視細胞を分化誘導して移植することで視覚の再獲得が報告されている。しかし現在用いられている移植方法では 2 次元画像を再生網膜上で再構築することは難しい。我々は視細胞前駆細胞株を樹立しこれを用いて成熟視細胞シートを作成することに成功した。この細胞シート単独あるいは視細胞シートに双極細胞シート・網膜神経節細胞シートを重層化して再生神経網膜組織シートを作成移植する。この過程で網膜神経細胞相互の分化の分子メカニ

ズムを明らかにすると共に、視神経挫滅マウスへのシート移植後に再生網膜上で二次元画像を再生することを最終目標とする。

3. 研究の方法

視神経細胞シートおよび再生神経網膜組織シートの作成

我々はマウス iPS 細胞に pax6 遺伝子を導入した後、限界希釈法を用いて視細胞前駆細胞株を作成した(投稿中)。この細胞を用いて温度感応性ポリマーを応用して視細胞前駆細胞シートを作成出来た。このシートは種々の成長因子・ケモカインに反応してロドプシンを細胞質全体に持つ視細胞細胞シートに成熟する(前ページ図参照)。樹立した高純度視細胞を温度感応性ポリマー上で培養することで、視神経細胞シートを作成する。

この方法では、既に視細胞が高度なシナプス形成を行なっている上に、シート回収時に蛋白分解酵素を用いていないため、シート構成細胞間の高次構造とそれを介した相互作用は保たれている。

今後は成熟視細胞シート単独での解析を行うとともに、成熟視細胞シートの上に双極細胞シートを載せて培養したあとに、網膜神経節細胞シートを載せて培養を行うことで、三層からなる再生神経網膜組織シートを構築する。同様に再生神経網膜組織シートの解析を行う。

これまでの成績から FGF や IGF1 等成長因子、SDF1 等ケモカイン、フィブロネクチン等の細胞外マトリックス蛋白が分化調節に重要であることが分かってきているが、今後は分化効率のより改善した分化誘導プロトコルを確立する。その時に関わる転写因子、接着因子、成長因子受容体の発現を解析する。視細胞シートの中で起こる相互作用のみでなく、視細胞シート、双極細胞シート、網膜神経節細胞シートの間での相互作用はこれまで全く調べられていない領域であり、そこにアプローチする。分化や神経ネットワーク

構築の確認は免疫染色とともに電顕での特徴的な形態などから判断する必要がある。神経網膜の各神経層間ではシナプトフィジンが強く発現され豊富なシナプス形成が行われているが、視細胞シート内でのシナプス形成機構（例えば横方向）と、視細胞シート・双極細胞シート・網膜神経節細胞シート間のシナプス形成機構（例えば縦方向）に差異があるのか、それらを司る分子を明らかにできる。

4. 研究成果

我々が樹立した株化 pax6 導入細胞は網膜神経前駆細胞の中でも視細胞前駆細胞に相当する分化段階の細胞でその後杆体視細胞と錐体視細胞に分化する。本研究では、まずはじめに我々の樹立したiPS細胞由来視細胞前駆細胞を用いて各種のケモカイン、増殖因子、細胞外マトリックスやそれらの抗体・siRNAを用いて成熟視細胞へと分化するメカニズムを解明した。

2つの異なるクローン化網膜前駆細胞株を用いて検討した(#17, #14)。両細胞株共にSDF1に反応して、視細胞分化をもたらす転写因子群、otx2, rx1, crx, nrl mRNAの発現を誘導し、あるいは増強し、結果としてロドプシンmRNAの発現を増強した。この分化段階は培養系に添加したケモカインの阻害剤で抑制された。

この細胞株は温度感応性ゲル上で培養することによりシート化することが可能になった。これまでの網膜の再生研究では視細胞移植を主に注射する事により対光反射や網膜電図での回復が報告されているが、二次元画像の回復・再生は難しいと思われる。本研究により重層化成熟視細胞シート移植が可能になれば注入移植では成し得ない、再生網膜上で二次元画像を再生することが可能になると考える。

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 10 件)

Suzuki N, Shimizu J, Hirotsu C, Takada E, Arimitsu N, Ueda Y, Fujiwara N, Suzuki T, Takai K. Generation of Retinal Progenitor Cell Sheets which Differentiate into Rhodopsin Positive Photoreceptors from Mouse iPS Cell Derived Retinal Progenitor Cell Clones. International Journal of Ophthalmology and Clinical Research 2015; 2:1-5 査読有

Misawa H, Saito A, Shimizu J, Iinuma M, Shiratsuchi T, Fujiwara N, Takai K, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. Pax7 Gene Induction Rapidly Regulates Myocyte Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells. St. Marianna Medical Journal. 2014; 5:59-67. 査読有

Kono T, Arimitsu N, Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Umehara T, Saito A, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Hashimoto T, Tanaka Y, Suzuki N. Human iPS Cell Derived Neurons with Cortical Motor Neuron Phenotype are Relevant for Functional Recovery of Hemiplegic Mice with Injured Motor Cortex. St. Marianna Medical Journal 2013; 4(2): 31-40. 査読有

Umehara T, Arimitsu N, Iinuma M, Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Saito A, Kono T, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. Transplantation of Motor Neurons Derived from Human iPS Cells into Total Transection Model of

Spinal Cord Injury in Mice. St.Marianna Medical Journal 2013; 4(2): 21-30. 査読有

Saito A, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Arimitsu N, Umehara T, Kono T, Misawa H, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. IGFII/Akt Signaling Regulates Myocyte Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells. St.Marianna Medical Journal 2013; 4(2): 41-48. 査読有

Fujiwara N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Saito A, Kono T, Umehara T, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Restoration of spatial memory dysfunction of human APP transgenic mice by transplantation of neurons derived from human iPS cells. Neuroscience Letters. 2013; 557:129-134. pii: S0304-3940(13)00947-6. 査読有

Suzuki N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Ueda Y, Takada E, Hirotsu C, Suzuki T, Fujiwara N, Tadokoro M. Establishment of retinal progenitor cell clones by transfection with Pax6 gene of mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. Neuroscience Letters 2012; 509(2): 116- 120. 査読有

Arimitsu N, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Takada E, Ueda Y, Suzuki T, Suzuki N. Role of SDF1/CXCR4 interaction in hemiplegic mouse model with neural cell transplantation. International Journal of Medical Science 2012.2 13: 2636-2649. 査読有

Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Yoshikawa H, Kaneko F, Suzuki T, Suzuki

N. Excessive CD4+ T cells co-expressing interleukin -17 and interferon- in patients with Behçet's disease. Clinical and Experimental Immunology. 2012; 168 (1): 68-74. 査読有

Shimizu J, Izumi T, Arimitsu N, Fujiwara N, Ueda Y, Wakisaka S, Yoshikawa H, Kaneko F, Suzuki T, Takai K, Suzuki N. Skewed TGF /Smad signaling pathway of T cells in patients with Behçet's disease. Clinical and Experimental Rheumatology. 2012; 30(35): S35- S39. 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

6. 研究組織

(1)研究代表者 上田 裕司 (UEDA, YUJI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：00223470

(2)連携研究者 鈴木 登 (SUZUKI, NOBORU)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：40235982

(3)連携研究者 有光 なぎさ (ARIMITSU, NAGISA)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：40408688

