

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659770

研究課題名(和文) ヒト眼組織由来 iPS 細胞の樹立・機能解析と新規診断・治療システムの開発

研究課題名(英文) Generation of human iPS cells derived from ocular tissues and their use for functional analysis, novel diagnostic technique and medical treatment

研究代表者

東 範行 (Azuma, Noriyuki)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：10159395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)：ヒト皮膚iPS細胞およびマウスのES細胞、iPS細胞から、発生初期の網膜組織と成熟した視神経細胞の分化誘導に成功した。浮遊培養後に平面培養に移し、外因性遺伝子を導入することなく内因性遺伝子の誘導のみで、軸索をもつ視神経細胞の自己分化誘導に成功した。作製した細胞は、すべての神経節マーカーをもち、軸索流やパッチクランプ法による電気生理学的反応が認められた。同様の方法で、マウスES細胞とiPS細胞から同様に軸索をもつ網膜神経節細胞の作製に成功し、この方法が種を超えて多能性幹細胞から視神経細胞を自己分化誘導させる普遍的なものであることが示され、軸索を含めた視神経細胞の研究を行うことが初めて可能となった

研究成果の概要(英文)：We generated primitive retinal tissues from human iPS cells, mouse iPS cells and mouse ES cells. We also generated self-induced retinal ganglion cells (RGCs) with functional axons from human induced pluripotent stem cells. After development of the optic vesicle from the induced stem cell embryoid body in three-dimensional culture, conversion to two-dimensional culture resulted in differentiation of RGCs. Axons extended radially from the margin of the clump. Induced RGCs expressed specific markers by quantitative PCR and immunohistochemistry. The long, prominent axons contained neurofilaments and tau, and manifested anterograde axonal transport and sodium-dependent action potentials. The ability to generate RGCs with functional axons uniformly and at a high rate may contribute to both basic and clinical science, including embryology, neurology, pathognomy, and treatment of various optic nerve diseases that threaten vision

研究分野：眼科学

キーワード：再生医学 遺伝学 遺伝子・細胞治療 角膜 網膜

1. 研究開始当初の背景

日本を含む先進国においては、失明原因のほとんどが先天性あるいは後天性の網膜疾患である。網膜の構造は種によって大きく異なり、ヒト由来のiPS細胞研究は、ヒト網膜の発生、ヒト網膜疾患の病態解明、創薬、診断・治療法の開発に不可欠であると期待される。iPS細胞は、ドナーの由来組織の違いによって、得られるiPS細胞の性質ごとに分化能が異なることが指摘されている。したがって、臨床的に有用な網膜細胞を作成するには、その潜在性を高くもつ眼組織由来の細胞から作成したiPS細胞が必須である。

2. 研究の目的

本研究では、世界に先駆け、国立成育医療研究センター倫理委員会（承認番号156）にて承認を受けた眼手術検体からヒト網膜由来iPS細胞の樹立をめざす。網膜への分化過程において発現する遺伝子群の発現調節ネットワークを同定し、他のiPS細胞やES細胞とも比較する。iPS細胞から成熟した網膜細胞へと分化するプロセスを、生体外での分化誘導系として明示することを目的とする。これによって、網膜発生の基礎知識が得られるとともに、再生医学による失明予防に応用できる。

3. 研究の方法

(1) 当施設の倫理委員会で承認を受け、患者家族の同意を得た後に、手術において得られたヒト小児患者由来の細胞を用いて、iPS細胞を作成した。山中4因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC)を導入したレトロウイルスを感染させた。網羅的DNAメチル化解析と免疫不全マウスの奇形腫形成を検討した。

(2) 当施設の倫理委員会で承認を受け、患者の同意を得た後に、患者皮膚細胞から疾患iPS細胞を作製した。山中4因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC)を導入したレトロウイルスを感染させた。

(3) ヒト皮膚由来iPS細胞およびヒト虹彩由来細胞を用い、浮遊培養でマトリゲル、栄養因子の調節によって、眼組織の自己分化誘導を行った。

(4) ヒト皮膚iPS細胞およびマウスのES細胞、iPS細胞を用いて、浮遊培養から平面培養に移行するとともにマトリゲル、栄養因子の調節によって、視神経細胞(網膜神経節細胞)の自己分化誘導を行った。

4. 研究成果

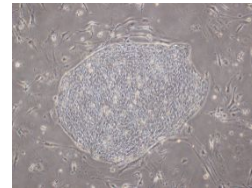
(1) ヒト小児患者由来の細胞を用いて、iPS細胞を作成した。樹立効率は、脈絡膜由来細胞では0.01%以下であったが、網膜由来細胞では0.13%であり、他の胎児線維

芽細胞(0.03)、子宮内膜細胞(0.03)、指皮膚細胞(0.05)と比べて高かった。

網羅的DNAメチル化解析から網膜特異的DNAメチル化可変領域(Ret-DMRs)を同定した。DNAメチル化プロファイルにおいて、他の細胞由来iPS細胞と比べて、ES細胞のような幹細胞に近い性質を持っていた。

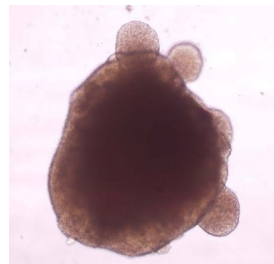
免疫不全マウスに移植して奇形腫を形成させたところ、虹彩由来iPS細胞、網膜由来iPS細胞ともに、眼組織以外の組織から樹立されたiPS細胞によって形成された奇形腫よりも、神経網膜だけでなく網膜色素上皮が多く見られた。神経網膜とともに網膜色素上皮の再生にも用いられる可能性がある。

(2) 疾患iPS細胞として、網膜芽細胞腫、Peters奇形、無虹彩症、常染色体優性視神経萎縮の患者皮膚細胞からiPS細胞を作製した。疾患の病態解明に用いる事ができる。



無虹彩症の疾患iPS細胞

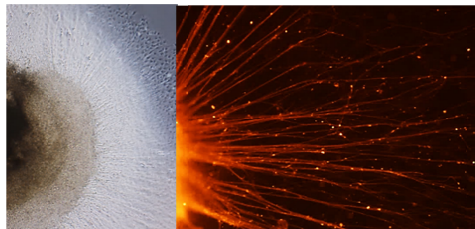
(3) ヒト皮膚由来iPS細胞およびヒト虹彩由来細胞を用い、眼組織の誘導を検討した。いずれの細胞でも、浮遊細胞塊の表面から眼胞様の突出構造が、さまざまな大きさで形成され、この部分ではRT-PCRや免疫染色によって、初期発生の眼組織に特有なPax6、やRx遺伝子が発現していた。さらに、不完全ながらも神経網膜や網膜色素上皮が形成された。角膜や水晶体で特異的に発現する遺伝子は、現在のところ検出されていない。



ヒトiPS細胞から誘導された眼胞

(4) ヒト皮膚iPS細胞およびマウスのES細胞、iPS細胞を用いて、視神経細胞(網膜神経節細胞)の分化誘導に成功した。浮遊培養後に平面培養に移し、外因性遺伝子を導入することなく内因性遺伝子の誘導のみで、軸索をもつ視神経細胞の自己分化誘導に成功した。作製した細胞は、すべての神経節マーカーをもち、軸索流やパッチクランプ法による電気生理学的反応が認

められた。同様の方法で、マウス ES 細胞と iPS 細胞から軸索をもつ網膜神経節細胞の作製に成功した。ヒトや動物で初めて軸索を含めた視神経細胞の研究を行うことが可能となった。



ヒトiPS細胞から誘導された視神経細胞

5 . 主な発表論文等 〔 雑誌論文 〕 (計15件)

Seko Y, Azuma N, Kaneda M, Nakatani K, Miyagawa Y, Noshiro Y, Kurokawa R, Okano H, Umezawa A. Derivation of Human Differential Photoreceptor-like Cells from the Iris by Defined Combinations of CRX, RX and NEUROD. PLoS One. 2012;7(4):e35611. Epub 2012 Apr 25.

Hosono K, Ishigami C, Takahashi M, Park DH, Hirami Y, Nakanishi H, Ueno S, Yokoi T, Hikoya A, Fujita T, Zhao Y, Nishina S, Shin JP, Kim IT, Yamamoto S, Azuma N, Terasaki H, Sato M, Kondo M, Minoshima M, Hotta Y . Two Novel Mutations in the EYS Gene Are Possible Major Causes of Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa in the Japanese Population. PLoS One. 2012;7(2):e31036. Epub 2012 Feb 17.

Nishina S, Suzuki Y, Yokoi T, Kobayashi Y, Noda E, Azuma N. Clinical features of congenital retinal folds. Am J Ophthalmol 2012;153(1):81-87.

Nishina S, Kurosaka D, Nishida Y, Kondo H, Kobayashi Y, Azuma N. Survey of microphthalmia in Japan. Jpn J Ophthalmol. 2012; 56:198-202.

Nishina S, Kosaki R, Yagihashi T, Azuma N, Okamoto N, Hatsukawa Y, Kurosawa K, Yamane T, Mizuno S, Tsuzuki K, Kosaki K. Ophthalmic features of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. Am J Med Genet A. 2012; 158A(3):514-518.

Shigeyasu C, Yamada M, Mizuno Y, Yokoi T, Nishina S, Azuma N. Clinical features of anterior segment dysgenesis associated with congenital corneal opacities. Cornea. 2012; 31:293-298.

Nishina S, Tanaka M, Yokoi T, Kobayashi Y, Azuma N. Stereopsis after early surgery for bilateral congenital cataracts. Update on

Strabismology, Proceeding of the XIth meeting of the International Strabismological Association in Istanbul, Turkey, 282-286, 2012.

Yokoi T, Toriyama N, Yamane T, Nakayama Y, Nishina S, Azuma N. Development of a premacular vitreous pocket. JAMA Ophthalmol. 2013, 131(8): 1095-1096.

Nakayama Y, Yokoi T, Nishina S, Okuyama M, Azuma N. Electroretinography and spectral-domain optical coherence tomography detection of retinal damage in shaken baby syndrome. J AAPOS. 2013, 17(4): 411-413.

Azuma N, Ito M, Yokoi T, Nakayama Y, Nishina S. Visual outcomes after early vitreous surgery for aggressive posterior retinopathy of prematurity. JAMA Ophthalmol. 2013;131(10):1309-1313.

Seko Y, Azuma N, Ishii T, Komuta Y, Miyamoto K, Miyagawa Y, Kaneda M, Umezawa A. Derivation of human differential photoreceptor cells from adult human dermal fibroblasts by defined combinations of CRX, RAX, OTX2 and NEUROD. Genes Cells. 2014; 19:198-208.

Tanaka M, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Noda E, Ito M, Azuma N. Three Cases of rhegmatogenous retinal detachment associated with regressed retinoblastoma after conservative tumor therapy. Retin Cases Brief Rep. 2014; 8:223-226.

Yamane T, Yokoi T, Nakayama Y, Nishina S, Azuma N. Surgical outcomes of progressive tractional retinal detachment associated with familial exudative vitreoretinopathy. Am J Ophthalmol 2014; 158:1049-1055

Seko Y, Azuma N, Ishii T, Komuta Y, Miyamoto K, Miyagawa Y, Kaneda M, Umezawa A. Derivation of human differential photoreceptor cells from adult human dermal fibroblasts by defined combinations of CRX, RAX, OTX2 and NEUROD. Genes Cells. 19(3):198-208, 2014.

Tanaka T, Yokoi T, Tamalu F, Watanabe S, Nishina S, Azuma N. Generation of retinal ganglion cells with functional axons from human induced pluripotent stem cells. Sci. Rep. 2015 Feb 10;5:8344. doi: 10.1038/srep08344.

Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N. A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples. Lab Invest. 95(1):4-13, 2015.

Higuchi A, Ling QD, Kumar SS, Munusamy MA, Alarfaj AA, Chang Y, Kao SH, Lin KC, Wang HC, Umezawa A. Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material. Lab Invest. 95(1):26-42,

2015.

Retina-glaucoma meeting 東京,
2012.5.27

〔学会発表〕（計9件）

仁科幸子, 横井 匡, 中山百合, 東 範行, 松岡健太郎, 中澤温子: 胎生血管系遺残に網膜芽細胞腫を発症した1例. 第38回日本小児眼科学会総会, 広島, 2012.7

横井 匡, 中山百合, 仁科幸子, 東 範行: 小児眼底疾患におけるSwept-Source OCTの有用性. 第38回日本小児眼科学会総会, 名古屋, 2012.7

東 範行: 視神経乳頭形成異常の構造と機能, Japan Macula Club, 蒲郡, 2012.8

松下五佳, 近藤寛之, 石橋真吾, 田原昭彦, 緒方 勤, 仁科幸子, 東 範行: 真性小眼球におけるMFRP遺伝子の関与. 第116回日本眼科学会総会, 東京, 2012.4

仁科幸子, 伊藤牧子, 横井 匡, 中山百合, 山根敬浩, 東 範行, 松岡健太郎, 中澤温子: 急速に増大する嚢胞を伴った小眼球症の治療経験. 第37回日本小児眼科学会総会, 名古屋, 2012.6

Yamane T, Ito-Ui M, Yokoi T, Nakayama Y, Nishina S, Azuma N: Surgical outcomes of tractional retinal detachment associated with familial exudative vitreoretinopathy. 第51回網膜硝子体学会総会, 甲府, 2012.11

横井 匡, 東 範行: SS-OCTによる小児の眼底疾患所見—Pir-macular症候群の発生機序—
Japan Macula Club 蒲郡 2013.8

東 範行: 眼の発生と進化 - さまざまな動物の眼やヒトの疾患から -

東範行: 硝子体術者から見た網膜光凝固: 適応、成績と限界 日本臨床眼科学会 神戸 2014.11

出願状況

名称: 網膜神経節細胞の作製方法

発明者: 東 範行

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願2014-230157号

出願年月日: 2014年8月8日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 範行 (AZUMA, Noriuki)

国立成育医療研究センター 眼科・医長・

視覚科学研究室・室長

研究者番号: 10159395

(2) 研究分担者

梅澤 明弘 (UMEZAWA, Akihiro)

国立成育医療研究センター 再生医療セン

ター 副所長・再生医療センター長

研究者番号: 70213486

