

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791836

研究課題名(和文) ヒト結膜細胞由来 iPS 細胞の性状解析

研究課題名(英文) Analysis of iPS cells derived from human conjunctive cells

研究代表者

井上 達也 (Inoue, Tatsuya)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80348721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞は従来ヒト皮膚線維芽細胞より樹立された。過去の報告では他の組織由来のiPS細胞も樹立されているが、由来の違うiPS細胞が性状の違いがあるのか未だ明らかではない。今回われわれは、結膜細胞由来iPS細胞を樹立した。さらに結膜細胞由来iPS細胞と皮膚線維芽細胞由来iPS細胞をそれぞれ網膜細胞に分化誘導した。網膜への分化の効率を比較するため、RT-PCRを施行した。Pax6、Rxは網膜に分化した2週目に高発現し、視細胞のマーカーであるCrxも発現を認めたが、両者の細胞間に有意な差を認めなかった。結膜細胞由来iPS細胞の性状解析にはさらなる検討が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Induced pluripotent stem (iPS) cells were initially generated from human dermal fibroblasts. Although previous studies have shown that iPS cells can be generated from different tissues, it remains elusive that iPS cells derived from different tissues represent diverse characteristics. First, we generated human conjunctive cell-derived iPS cells by introducing four specific factors. As previously reported, conjunctive cell-derived iPS cells and dermal fibroblast-derived iPS cells were induced toward retinal neurons, respectively. Next we performed RT-PCR analysis to test the efficiency of retinal differentiation. Pax6 and Rx expression are significantly increased two weeks after retinal induction in both cells. We also found that Crx, photoreceptor cell marker, were up-regulated at this stage. However, expression of the genes was not significantly different between two cell lines. Further investigations are required for understanding the property of conjunctive cell-derived iPS cells.

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：眼細胞生物学 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

iPS(induced pluripotent stem cell)細胞は、ES細胞と同様に多分化能を有し、網膜細胞にも分化誘導が可能であり、疾患のメカニズムの解明、再生医療に役立つものと位置づけられている。従来 iPS細胞は皮膚線維芽細胞から樹立されたが、ウイルスやエピソードプラスミドなどにより遺伝子導入を行うことで、他の組織からの樹立も可能である。由来する細胞が異なる場合、細胞内の遺伝子発現の構成が ES細胞のような未分化な細胞の遺伝子発現に近いものになることは間違いないが、DNAのメチル化やヒストンの修飾といったエピジェネティックなステータスは、由来する細胞のものが引き継がれている(Kim K et al, Nature 2010)。これは由来する細胞の記憶が未分化な細胞に変化した際も残っていることを示す重要な知見である。したがって、iPS細胞から分化誘導を行う際には、分化させたい細胞と同じ系統の細胞を由来とする iPS細胞を用いた方がより効率よく得られると考えられる。本研究については、網膜の細胞に分化誘導を行う目的であったため、同じ眼組織である結膜細胞に着目した。結膜細胞は、手術的に点眼などの局所麻酔下で容易に採取することができ、線維芽細胞と同様に増殖能も高く培養に適していると考えられた。一方で、Kajiwaraらは、由来の違う iPS細胞株の肝細胞への分化効率を比較したところ、末梢血由来 iPS細胞はよい分化効率を示すが皮膚線維芽細胞由来 iPS細胞では分化効率が劣ったと報告している(Kajiwara M et al, Proc Natl Acad Sci U S A 2012)。しかしながら、この報告では同一のドナーから採取したもので作成された末梢血由来 iPS細胞と皮膚線維芽細胞由来 iPS細胞においては、肝細胞への分化効率には差を認めず、由来細胞の違いよりもドナーの違いを考慮することが重要であることと結論付けている。少なくとも iPS細胞を用いて分化誘導する際には、細胞株によってそれなりの効率の差が認められるが、細胞内環境がどういったものが適しているかは、その場面によって違うようである。異なる組織由来の iPS細胞がどのような性状の違い、分化誘導においてどのような特性があるかについては、エピジェネティックなステータスを含めて、いまだ不明な点も多い。本研究でわれわれは、網膜に分化効率のよい iPS細胞の候補として結膜細胞由来 iPS細胞を樹立し、網膜細胞への分化効率を検討する。また皮膚線維芽細胞由来 iPS細胞と比べて発現に有意な差を認める遺伝子があれば、これについてDNAのメチル化などのエピジェネティックな特性も調べる予定である。

2. 研究の目的

網膜色素変性症などに代表される遺伝性網膜疾患は、進行性の視力障害、視野障害が生じるが、現状では特に治療法のない難治性疾患である。原因遺伝子についてはこれまで多数報告されているが、これらの遺伝子導入など治療法の開発が試みられている。また、家族歴のない孤発症例もあり、これらの症例については原因遺伝子も同定すること自体が困難である。最近の複数の研究から、iPS細胞は再生医療の分野でも応用出来る有用なツールであることは言うまでもない。iPS細胞から網膜神経細胞への分化誘導についても、多くの研究により網膜視細胞、網膜神経節細胞、網膜色素上皮細胞といった個々の細胞にまで効率よく分化誘導できることが報告されている(Lamba DA et al, PLoS One 2010. Chen M et al, Invest Ophthalmol Vis Sci 2010. Osakada F et al, J Cell Sci 2009.)。細胞単位での移植治療を試みる研究グループもあるが、患者から採取した体細胞から iPS細胞が樹立できればこれを網膜視細胞に分化誘導することで患者自身の網膜視細胞を再現することになる。先に述べたように孤発症例では原因遺伝子の同定も難しいため、患者の iPS細胞から網膜視細胞が得られれば、健常者の網膜視細胞と比較してどの遺伝子が足りないか、診断に使用することが可能である。また患者の網膜視細胞にどのような化合物が神経保護作用をもたらすかなど、創薬研究の分野に役立つとする考え方もある。

本研究でわれわれは、効率よく網膜視細胞を得る目的で、結膜細胞由来 iPS細胞を樹立した。結膜細胞は、眼科外来で手術的に簡便に採取でき、増殖能も問題なく培養に適した細胞である。皮膚線維芽細胞由来のものと同じ眼組織である結膜細胞由来 iPS細胞は網膜細胞に近い細胞内環境である可能性がある。

さらに網膜色素変性のモデルマウスである rd1 マウスを用いて iPS細胞を樹立し、野生型マウスから樹立した iPS細胞とともに網膜視細胞に分化誘導した。すでに rd1 の原因遺伝子として知られている PDE6b の発現比較を行うことが可能であれば、今後患者から得られた iPS細胞から invitro で網膜細胞に分化誘導し、未知の原因遺伝子の検索に利用可能か否かを検討する。本研究により、網膜変性疾患の患者などの網膜細胞を研究する際、結膜採取を行うことで樹立できる結膜細胞由来 iPS細胞が効率よく網膜に分化誘導できるものであることが期待され、さらには原因遺伝子の検討にも用いることができる可能性がある。

3. 研究の方法

既報の通り、採取したヒト結膜細胞を培養し十分な細胞数を確保した上、レンチウイルスを用いて OCT3/4, SOX2, c-MYC, KLF4 の4 遺伝子を遺伝子導入し、ヒト結膜細胞由来 iPS 細胞を作成した。独立した3つの細胞株を作成し、実験に用いることとした。teratoma formation assay にて多分化能も確認し、核型解析にて染色体異常のないことも確認された。得られた iPS 細胞は、増殖能も問題なく、本研究に十分使用できるものと考えられた。さらに、皮膚線維芽細胞由来の iPS 細胞と今回作成した結膜細胞由来の iPS 細胞の性状の比較するため、in vitro にて網膜細胞へ分化誘導した。Lambaらの報告の通りに培養を行った(Lamba DA et al, PLoS One 2010)。まず iPS 細胞のコロニーを feeder-free のディッシュ上にまき、mouse noggin(1ng/ml), human recombinant DKK-1(1ng/ml), human recombinant IGF-1(1ng/ml)の存在下に3日間培養を行った。4日目からはそれぞれ10ng/mlの濃度にして培養し、2-3日おきにメディウムの交換を行いながら3週間培養しそれ以後は分化がさらに進まないように N2, B27 supplement を加えたメディウムで培養をつづけた。皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞と比較して結膜由来 iPS 細胞が網膜細胞により分化しやすい要素をもつか否かを検討するため、RT-PCR を行い分化誘導の効率を比較した。網膜前駆細胞のマーカである Pax6, Rx, などの遺伝子や、網膜視細胞のマーカである Crx などについても発現を比較した。

次に、網膜変性モデルマウスである rd1 を用いて、rd1 マウスと野生型マウスの両者から皮膚線維芽細胞を採取し、レンチウイルスを用いて OCT3/4, SOX2, c-MYC, KLF4 を導入しそれぞれ iPS 細胞を樹立した。細胞株ごとに違いがある可能性を考慮して独立した3株ずつ実験に用いた。これらを先の手順にて rd1 マウスにおいて網膜変性の原因となる網膜視細胞へと分化誘導した。ロドプシンの免疫染色により視細胞の存在を確認し、実際に rd1 で欠損している PDE6b について両者の発現を比較した。

4. 研究成果

皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞と結膜細胞由来 iPS 細胞を独立した3株ずつ用い、それぞれから網膜神経細胞に分化誘導したものについて RT-PCR を施行した。その結果、既報通りいずれの細胞株にも網膜に分化誘導後2週間の時点で Pax6, Rx などの網膜前駆

細胞に発現する遺伝子が高発現していた(Lamba DA et al, PLoS ONE 2010)。さらに網膜視細胞のマーカである Crx についても発現を認めた。しかし、これらの遺伝子発現はいずれも由来の違う iPS 細胞間で有意な差を認めなかった。免疫染色では、ある程度の細胞が網膜細胞に分化できていることが確認できたが、これらは均一な細胞集団ではないにもかかわらず、それら全体を RNA 抽出しているために RT-PCR の結果そのものの解釈が難しいと考えられた。今回の結膜由来 iPS 細胞については、網膜細胞への分化効率がよいものと結論付けるデータが得られなかったため、さらなる検討が必要である。具体的には、より均一な細胞集団の状態で両者の差を見るために、網膜へ分化誘導した初期の状態での遺伝子比較をおこなうことを考えている。

さらに rd1 マウスを用いた検討では、それぞれ3系統の独立した細胞株について網膜視細胞に分化誘導をかけた。ロドプシン陽性の網膜視細胞は各々得られたが、rd1 マウスから得られた網膜視細胞は apoptosis がおこるためかそもそもの細胞数が少なく、野生型マウスからえられた網膜視細胞との比較が困難であった。Rd1 マウスから分化誘導した視細胞では PDE6b 遺伝子発現はみられなかった。しかし、既知の遺伝子であれば発現の有無は判定できるものの、未知の遺伝子であった場合に原因遺伝子の判定が困難であると予想される。本研究においても網膜視細胞への分化高率をあげるための培養法を検討する、あるいは今回の判定に使用した段階よりも未分化な時期に判定を行うなどの改善が必要と考えられる。現時点で発表論文を出す段階に至っていないが、1) 結膜由来 iPS 細胞の解析、2) iPS 細胞から網膜細胞へ分化誘導することで疾患遺伝子の同定を可能にする方法を検討を加えていく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上達也 (Inoue Tatsuya)
東京大学 医学部附属病院 眼科 助教
研究者番号：80348721