

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462701

研究課題名(和文)虹彩由来の組織幹/前駆細胞・不死化細胞・iPS細胞を用いた網羅的網膜再生研究

研究課題名(英文) Fundamental medical research of the retinal regeneration using tissue stem / progenitor cells, immortalized cells, induced pluripotent stem cells derived from iris tissue.

研究代表者

山本 直樹 (Naoki, Yamamoto)

藤田保健衛生大学・共同利用研究推進施設・准教授

研究者番号：00267957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：虹彩由来組織幹/前駆細胞の維持培養法として、iPS細胞の培養で使用するコーティング剤と阻害剤を組み合わせることで、組織幹/前駆細胞に発現するマーカーを長期的に発現・維持させることができた。

虹彩由来iPS細胞、虹彩由来不死化細胞について、新たに開発した2段階式分化誘導法を用いることで神経細胞や網膜神経細胞に特異的なマーカーを発現する細胞に分化させることができた。これらの分化した細胞は、生理学的な神経伝達機能を有する神経細胞であった。また、由来細胞の異なるiPS細胞を比較したところ、虹彩由来iPS細胞の方が神経細胞としての形態や維持培養が良好であった。

研究成果の概要(英文)：We discovered that the iris tissue stem / progenitor cells could culture for a long term by the coating agent and the repressor using culture methods of the induced pluripotent stem (iPS) cells.

The immortalization cells and the iPS cells derived from iris were able to differentiate for the expression of specific for nerve and retina cell marker by using the two phases-style new differentiation method. These differentiated cells had the physiologic neurotransmission nerve cell function. In addition, after comparing the iPS cells of the different origin cell, iPS cells derived from iris had better the cell shape and maintenance culture as nerve cells.

研究分野：分子細胞生物学(眼科・再生)

キーワード：iPS細胞 網膜再生 不死化細胞 組織幹/前駆細胞 再生医療 電気生理 虹彩

1. 研究開始当初の背景

網膜変性症などの網膜に障害がある患者数は、推定で約 300 万人以上いるといわれているが、今日の眼科治療(手術など)では、視力を回復させることは非常に難しい。このような状況から、近年目覚ましい研究の進歩により『障害のある網膜神経細胞の代わりに新しい細胞を移植し、その移植細胞が宿主網膜に残存している細胞とネットワークを再構築することで網膜機能を再生させる』という再生医学・医療への期待が高まっている。

従来から研究されている ES 細胞は多能性幹細胞として期待されているが、(1)受精卵を壊してしまう倫理的問題、(2)非自己の細胞であることによる免疫拒絶の問題などがあった。

近年、再生医療の研究で最も注目されている iPS 細胞は上記の問題を回避することができる。眼科領域においては、滲出型加齢黄斑変性に対する患者自身の自己 iPS 細胞由来網膜色素上皮シート移植に関する臨床研究が開始されたことが注目されている。ただし、この iPS 細胞の移植は臨床研究の初期段階であり、目的は安全性の確認であるため大幅な視力改善という治療効果を期待するものではない。他方、目的細胞と同じ系統の細胞を由来とした iPS 細胞を用いた場合、iPS 細胞を作出した元の成体細胞の情報を iPS 細胞が記憶していることを利用できるため、効率的に目的細胞に分化誘導できることが報告された(Kim K. et al. *Nature*. 2010.)。

一方、不死化細胞は字のごとく“不死化”された細胞であるため、複数の実験施設での同時再現性、異なる実験日で実験をしても細胞のコンディションがほとんど変化しないことから、基礎研究や創薬研究への応用が期待されている。しかし、従来の手法によって作出された不死化細胞は、不死化遺伝子を導入する部位がコントロールできないことから、遺伝子導入前の細胞と大きくキャラクターが変わってしまうことが克服すべき課題となっていた。また不死化された不死化細胞は、遺伝子が導入された領域の影響もあり、その細胞が元来から有している分化能が無くなる、または低くなるといわれている。

2. 研究の目的

本研究計画では、成体ヒト虹彩由来組織幹/前駆細胞(虹彩幹/前駆細胞)、虹彩幹/前駆細胞由来不死化細胞(虹彩由来不死化細胞)および虹彩幹/前駆細胞由来 iPS 細胞(虹彩由来 iPS 細胞)を用いて、トランスレーショナルリサーチとしての以下の網膜再生医療に展開するための基礎研究を行った。

1) 虹彩幹/前駆細胞の維持培養法の探索

組織幹/前駆細胞マーカーを発現した状態で培養を継続できる条件を検討した。

2) 虹彩由来 iPS 細胞を用いた網膜神経細胞への分化条件の探索

我々が作出した虹彩由来 iPS 細胞を用いて網膜神経細胞マーカーを発現し、神経細胞に特異的に発現するチャンネルシグナルを、より強く、かつ長期間にわたり発現する分化誘導条件を検討した。

3) 虹彩由来不死化細胞を用いた網膜神経細胞への分化条件の検証

虹彩由来 iPS 細胞を網膜神経細胞に分化誘導した同条件にて、我々が独自開発した不死化 Vector を用いて作出した虹彩由来不死化細胞を虹彩由来 iPS 細胞と同一条件で分化誘導し、虹彩由来不死化細胞の分化能を検討した。

4) 由来細胞の異なる iPS 細胞を用いた分化誘導効率の比較

虹彩由来 iPS 細胞と市販されている血球系由来 iPS 細胞を用いて網膜神経細胞への分化誘導効率を比較検討した。

3. 研究の方法

本学の倫理委員会の承認をえて、成体ヒト虹彩由来組織幹/前駆細胞(虹彩幹/前駆細胞)、虹彩幹/前駆細胞由来不死化細胞(虹彩由来不死化細胞)および虹彩幹/前駆細胞由来 iPS 細胞(虹彩由来 iPS 細胞)を用いて、網膜神経細胞へ分化する機構を解明し、虹彩由来細胞による網膜再生医療の有用性を明らかにするため、以下の方法にて研究を行った。

1) 虹彩幹/前駆細胞の維持培養法の探索

細胞の足場による未分化状態の維持について検証するため、iPS 細胞を培養する際に足場として使用するフィーダー細胞の代替試薬(ゲルトレックス, Laminin-5 など)を培養皿にコーティングして、申請者が報告(Yamamoto N. et al. *J Dermatol Sci.* 2007.), さらに iPS 細胞の神経細胞への分化の研究でも注目されている組織幹/前駆細胞マーカー(CD271 など)を中心に、細胞を継代してもマーカーの発現が維持できるかを検討した。対照実験としてフィーダー細胞(MEF など)を用いた実験も行った。

2) 虹彩由来 iPS 細胞を用いた網膜神経細胞への分化条件の探索

我々が作出した虹彩由来 iPS 細胞を用いて網膜神経細胞マーカーを発現し、神経細胞に特異的に発現するチャンネルシグナルを発現する細胞への分化誘導を検討した。我々が既に報告しているレチノイン酸などを含む分化誘導条件(Yamamoto N. et al. *Med Mol Morphol.* 2010.)をさらに改良し、Apoptosis Inhibitor などの複数の阻害剤を添加して分化誘導を検討した。

分化誘導した細胞を電気生理学的手法であるホールセルパッチクランプ法にて検討し、神経細胞に特異的なチャンネルの発現を評価する。

3) 虹彩由来不死化細胞を用いた網膜神経細胞への分化条件の探索

我々が開発した偽 *attP* 部位に特異的に不死化遺伝子を挿入することができる不死化 Vector を用いて作製した虹彩幹/前駆細胞由来不死化細胞を用いて、虹彩由来 iPS 細胞と同一条件で分化誘導し、網膜神経細胞への分化能を検討した。

4) 由来細胞の異なる iPS 細胞を用いた分化誘導効率の比較

虹彩由来 iPS 細胞と市販されている血球系由来 iPS 細胞を用いて網膜神経細胞への分化誘導効率を比較検討した。

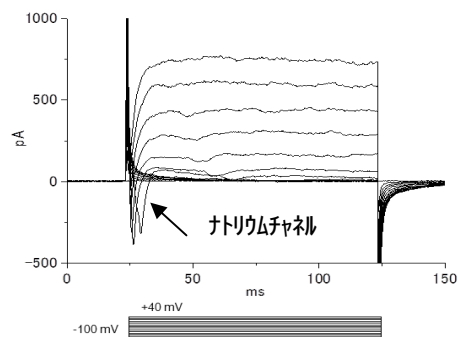
4. 研究成果

1) 虹彩幹/前駆細胞の維持培養法の探索

虹彩幹/前駆細胞を維持培養させるために、iPS 細胞の培養で使用するコーティング剤は有用であり、SSEA-4 や CD29 などの未熟な幹/前駆細胞に発現するマーカーを長期的に発現・維持させることができた。さらに組織幹/前駆細胞の状態をより強力に維持させるため、複数の阻害剤を組み合わせることにより、さらに安定した虹彩由来組織幹/前駆細胞を培養することに成功した(論文作成中)。

2) 虹彩由来 iPS 細胞を用いた網膜神経細胞への分化条件の探索

本研究期間において新たに樹立したヒト虹彩組織由来 iPS 細胞を用いて、より詳細なクローニングを行い、最も増殖能と未分化能が維持された虹彩由来 iPS 細胞株を樹立した。樹立した虹彩 iPS 細胞株について EB 体(細胞凝集体)形成実験を行い、三胚葉へ分化することを確認した。次に接着培養法にて新たな 2 ステップの分化誘導方法を樹立した。分化誘導の 1 段階目において、神経幹/前駆細胞マーカーである Nestin, Musashi を強発現する細胞に分化させることができた。次に 2 段階目の分化誘導法にて MAP2, β 3-tubulin, Neurofilament-M, Neurofilament-H などの神経細胞マーカーを発現する細胞に分化誘導させることができた。また網膜神経細胞で検出される Recoverin, Rhodopsin などを発現する細胞も観察された。これらの細胞を電気生理学的手法であるホールセルパッチクランプ法にて検証したところ、神経細胞に特異的に発現するナトリウムチャンネルを発現する神経細胞であった(論文作成中)。



3) 虹彩由来不死化細胞を用いた網膜神経細胞への分化条件の探索

虹彩由来不死化細胞を用いて、虹彩由来 iPS 細胞と同様に神経細胞への分化誘導を行った結果、同様に神経細胞マーカーの MAP2, β 3-tubulin, Neurofilament-M, Neurofilament-H, Recoverin, Rhodopsin などを発現する細胞に分化誘導することができた。ホールセルパッチクランプ法でも検討したところ、ナトリウムチャンネルを発現する神経細胞であった。

新たに作出した虹彩由来不死化細胞は、独自に開発した不死化細胞作出 Vector にて作出しており、遺伝子導入前の細胞が元来から有している DNA を損傷させることなく、現在の遺伝子研究では機能していないとされている DNA 領域に不死化遺伝子を導入できるため、元の細胞が有している分化に必要な遺伝子領域を温存できていることから、虹彩由来 iPS 細胞と同様に神経細胞への分化誘導が可能であったと考えられる（論文作成中）。

4) 由来細胞の異なる iPS 細胞を用いた分化誘導効率の比較

虹彩由来 iPS 細胞と比べて、市販されている血球系由来 iPS 細胞を用いて分化誘導した細胞は、分化誘導をすることはできたが細胞の形態、とくに神経突起の長さが短く、分化誘導後の細胞の維持が難しい傾向があった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 25 件)

1. Kawagishi-Hotta M, Hasegawa S, Igarashi T, Yamada T, Takahashi M, Numata S, Kobayashi T, Iwata Y, Arima M, Yamamoto N, Yagami A, Nakata S, Uzawa T, Matsunaga K, Sugiura K, Akamatsu H. Enhancement of individual differences in proliferation and differentiation potentials of aged human adipose-derived stem cells. *Regenerative Therapy* 6(1), 29-40, 2017(査読有り)
2. 山本直樹, 平松範子, 谷川篤宏, 宮地栄二, 堀口正之【第 55 回日本白内障学会・第 42 回水晶体研究会セッション優秀賞

受賞記念】虹彩由来 iPS 細胞を用いた水晶体上皮細胞への分化誘導. 日本白内障学会誌 29(1), 2017.(印刷中) (査読有り)

3. 山本直樹. 新たな手法で作出した不死化細胞による医薬品・医薬部外品の評価. *眼薬理* 31 (1), 2017.(印刷中) (査読有り)
4. Yamamoto N, Kato Y, Sato A, Hiramatsu N, Yamashita H, Ohkuma M, Miyachi E, Horiguchi M, Hirano K, Kojima H. Establishment of a new immortalized human corneal epithelial cell line (iHCE-NY1) for use in evaluating eye irritancy by in vitro test methods. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 52(7), 742-748, 2016. (査読有り)
5. Uezumi A, Nakatani M, Ikemoto-Uezumi M, Yamamoto N, Morita M, Yamaguchi A, Yamada H, Kasai T, Masuda S, Narita A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Fukada S, Nishino I, Tsuchida K. Cell-surface protein profiling identifies distinctive markers of progenitor cells in human skeletal muscle. *Stem Cell Reports.* 7(2), 263-278, 2016. (査読有り)
6. Shimomura A, Iizuka-Kogo A, Yamamoto N, Nomura R. A lower volume culture method for obtaining a larger yield of neuron-like cells from mesenchymal stem cells. *Med Mol Morphol.* 49(2), 119-126, 2016. (査読有り)
7. Morikawa S, Okamura T, Minezawa T, Goto Y, Hayashi M, Yamaguchi T, Isogai S, Mieno Y, Yamamoto N, Uozu S, Nakanishi T, Okazawa M, Imaizumi K. A simple method of bronchial occlusion with silicone spigots (Endobronchial Watanabe Spigot; EWS[®]) using a curette. *Thor Adv Respir Dis.* 10(6), 518-524, 2016. (査読有り)
8. 山本直樹. 【総説】虹彩由来細胞を用いた網膜再生. - 組織幹/前駆細胞・不死化細胞・iPS 細胞を用いて - . *BIO Clinica* 31 (11), 1166-1168, 2016. (査読有り)
9. 平松範子, 山本直樹. 細胞を用いた水晶体再生の基礎検討. - 不死化水晶体上皮細胞による三次元水晶体再構築モデル

- 作製の試み - . 日本白内障学会誌 28(1), 106-110, 2016. (査読有り)
10. Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Tsuchida K, Fukada S, Yamamoto H, Yamamoto N, Shiomi K, Hashimoto N. Pro-insulin-like growth factor-II ameliorates age-related inefficient regenerative response by orchestrating self-reinforcement mechanism of muscle regeneration. *Stem Cells*. 33(8), 2456-2468, 2015. (査読有り)
 11. Inaguma Y, Akatsuka Y, Hosokawa K, Maruyama H, Okamoto A, Katagiri T, Shiraishi K, Murayama Y, Tsuzuki-Iba S, Mizutani Y, Nishii C, Yamamoto N, Demachi-Okamura A, Kuzushima K, Ogawa S, Emi N, Nakao S. Induction of HLA-B*40:02-restricted T cells possessing cytotoxic and suppressive functions against haematopoietic progenitor cells from a patient with severe aplastic anaemia. *Br. J Haematol*. 172(1), 131-134, 2015. (査読有り)
 12. Chihara T, Shimpo K, Beppu H, Yamamoto N, Kaneko T, Wakamatsu K, Sonoda S. Effects of aloe-emodin and emodin on proliferation of the MKN45 human gastric cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev*. 16(9), 3887-3891, 2015. (査読有り)
 13. 山本直樹 .【特集】病理からみた前眼部手術 . 水晶体と白内障手術 . IOL&RS 29(3), 325-331, 2015. (査読有り)
 14. Wada K, Matsushima Y, Tada T, Hasegawa S, Obara Y, Yoshizawa Y, Takahashi G, Hiai H, Shimanuki M, Suzuki S, Saitou J, Yamamoto N, Ichikawa M, Watanabe K, Kikkawa Y. Expression of Truncated PITX3 in the Developing Lens Leads to Microphthalmia and Aphakia in Mice. *PLoS One*. 9(10), e111432, 2014. (査読有り)
 15. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Ikemoto-Uezumi M, Nakatani M, Morita M, Yamaguchi A, Yamada H, Nishino I, Hamada Y, Tsuchida K. Identification and characterization of PDGFR α + mesenchymal progenitors in human skeletal muscle. *Cell Death Dis*. 17(5), e1186, 2014. (査読有り)
 16. Hayashi C, Ito M, Ito R, Murakumo A, Yamamoto N, Hiramatsu N, Fox IJ, Horiguchi A. Effects of edaravone, a radical scavenger, on hepatocyte transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 21(12), 919-924, 2014. (査読有り)
 17. Yamada T, Hasegawa S, Inoue Y, Date Y, Arima M, Yagami A, Iwata Y, Takahashi M, Yamamoto N, Mizutani H, Nakata S, Matsunaga K, Akamatsu H. Accelerated differentiation of melanocyte stem cells contributes to the formation of hyperpigmented maculae. *Exp Dermatol*. 23(9), 652-658, 2014. (査読有り)
 18. 山本直樹 . 水晶体の細胞生物学 : なぜ透明なのか ? あたらしい眼科 . 31(10), 1425-1429, 2014. (査読有り)
- 〔学会発表〕(計 11 件)
1. 山本直樹, 大熊真人, 平松範子, 磯谷澄都, 今泉和良, 谷川篤宏, 宮地栄一, 堀口正之 . 虹彩由来細胞を用いた iPS 細胞作出と生理的機能を有する神経細胞への分化誘導 . 第 48 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 . (2016 年 9 月 23 日 ~ 24 日, 熊本県熊本市, くまもと県民交流館パレア)
 2. 山本直樹 .【招待講演】新たな手法で作出した不死化細胞による医薬品・医薬部外品の評価 . 第 36 回日本眼薬理学会 . (2016 年 9 月 10 日 ~ 11 日, 東京都板橋区, 帝京大学板橋キャンパス)
 3. 山本直樹, 平松範子, 山下宏美, 加藤義直, 佐藤淳, 中田悟, 松井優子, 真野陽介, 原和宏, 増蘭夕紀子, 中村政志, 小島肇 . ヒト不死化角膜上皮細胞を用いた三次元角膜モデルの有用性 . 日本組織培養学会第 89 回大会 . (2016 年 5 月 25 日 ~ 26 日, 大阪府大阪市, 千里ライフサイエンスセンター)
 4. 山本直樹, 平松範子 . 虹彩由来 iPS 細胞を用いた水晶体上皮細胞への分化誘導 . 第 55 回日本白内障学会総会・第 42 回水晶体研究会合同学会 . (2016 年 7 月 29

日～31日,岩手県盛岡市,いわて県民情報交流センター アイーナ)

5. 山本直樹, 平松範子, 山下宏美, 大熊真人, 宮地栄一, 磯谷澄都, 今泉和良, 谷川篤宏, 堀口正之, 谷口孝喜. iPS 細胞の培養で必要なフィーダー細胞の検討. 第48回藤田学園医学会(2016年10月6日～7日,愛知県豊明市,フジタホール500)
6. 山本直樹. 幹細胞を用いたさまざまな眼組織の再生. 第54回日本白内障学会総会・第41回水晶体研究会合同学会(2015年9月18日～20日,愛知県名古屋市,ミッドランドホール)
7. 山本直樹, 平松範子, 大熊真人, 宮地栄一, 磯谷澄都, 今泉和良, 谷川篤宏, 堀口正之, 谷口孝喜. DBA2-GFP マウス虹彩細胞由来新規 iPS 細胞の作出. 第47回藤田学園医学会(2015年10月1日～2日,愛知県豊明市,フジタホール500)
8. 平松範子, 山本直樹, 山下宏美, 大熊真人, 磯谷澄都, 谷川篤宏, 宮地栄一, 堀口正之, 今泉和良. iPS 細胞による再生医療へのアプローチ. 第47回藤田学園医学会.(2015年10月1日～2日,愛知県豊明市,フジタホール500)
9. 山本直樹, 平松範子, 谷川篤宏, 平野耕治, 堀口正之. PhiC31 偽 attP 部位特異的に遺伝子を導入した不死化細胞の樹立と三次元角膜モデルの作製. 第46回藤田学園医学会(2014年10月2日～3日,愛知県豊明市,フジタホール500)
10. 山本直樹, 馬嶋清如, 内藤尚久, 市川一夫, 平松範子, 谷口孝喜. 特異的遺伝子部位に不死化遺伝子を挿入した水晶体上皮細胞の作出. 第40回水晶体研究会.(2014年1月11日～12日,大阪府大阪市,ホテルコスモスクエア国際交流センター)

〔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〕

<http://www.fujita-hu.ac.jp/~kyoriken/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 直樹 (YAMAMOTO, Naoki)
藤田保健衛生大学・研究支援推進センター・共同利用研究推進施設・分子生物学・准教授
研究者番号: 00267957

(2)研究分担者

谷川 篤宏 (TANIKAWA, Atsuhiro)
藤田保健衛生大学・医学部・眼科学・准教授
研究者番号: 40324412

堀口 正之 (HORIGUCHI, Masayuki)
藤田保健衛生大学・医学部・眼科学・教授
研究者番号: 70209295

大熊 真人 (OHKUMA, Mahito)
藤田保健衛生大学・医学部・生理学・講師
研究者番号: 50329710

宮地 栄一 (MIYACHI, Ei-ichi)
藤田保健衛生大学・医学部・生理学・教授
研究者番号: 90129685

(3)研究協力者

今泉 和良 (IMAIZUMI, Kazuyosi)
磯谷 澄都 (ISOGAI, Sumito)
平松 範子 (HIRAMATSU, Noriko)
山下 宏美 (YAMASHITA, Hiromi)
山田 治基 (YAMADA, Harumoto)
田島 香里 (TAJIMA, Kaori)