

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670761

研究課題名(和文) 網膜黄斑部の形成に関する研究

研究課題名(英文) Study on foveal development

研究代表者

田中 卓 (TANAKA, TAKU)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：20443400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：視力に最も重要な領域である網膜黄斑部は視細胞と網膜神経節細胞が高密度に存在している。生体の眼発生過程を模した多能性幹細胞から網膜多層構造形成のプロトコルを検討し、眼胞様構造をもつ胚様体を平面培養に展開することによって、高密度に網膜神経節細胞が集積する領域形成に成功した。また手術検体から分取された網膜を黄斑部と周辺部に分けてRNAを抽出し、マイクロアレイによる発現プロファイルの比較解析により、領域間で発現レベルが有意に異なる遺伝子を選別した。それらの中には網膜の成熟や関連疾患への関与が知られている遺伝子が含まれていた。選別した遺伝子と黄斑形成及び機能との関連について探索を進めている。

研究成果の概要(英文)：The macula is the essential region for visual acuity where retinal ganglion cells and cone photoreceptors are located in high density. We developed the methods for forming high density retinal ganglion cells region by adhesive culture of embryoid body with optic vesicle-like structure derived from human pluripotent stems. We screened the genes showing specific expression signature on macula region by microarray analysis using human retina specimens divided into macula region and periphery region. The result showed that some of these were known to be involved in the maturation and disease of retina. We are looking into the connection between the selected genes and the formation and functions of macula.

研究分野：細胞分化

キーワード：網膜分化 黄斑 網膜神経節細胞 視細胞

1. 研究開始当初の背景

網膜疾患は失明を引き起こす最大の要因であり、加齢黄斑変性症に代表されるように網膜の黄斑部の損傷が決定的な視力低下につながり、黄斑部に関連する眼疾患は数多い。世界初の iPS 細胞を使用した臨床治験が加齢黄斑変性症を対象に実施されるなど、網膜疾患の治療において再生治療の実用化が期待されているが、移植する網膜細胞の質が治療の効果に重要となると考えられる。それゆえ黄斑部を構成する網膜細胞は細胞医療に使用する移植細胞として極めて有用であるが、その発生過程や特性については未知な部分が多かった。またげっ歯類や鳥類では黄斑がなく、黄斑形成の研究を行うにあたりヒトでの解析が必要となるが、適当な解析モデルが存在しなかった。

2. 研究の目的

(1) ヒト黄斑形成および黄斑の特性の評価を可能にする多能性幹細胞を起点とした網膜分化誘導系を構築する。

(2) ヒト黄斑領域に特徴的な発現パターンを示す遺伝子群をスクリーニングし、黄斑形成、機能との関連を探索する。

(3) 黄斑形成、機能に関与する新規遺伝子が得られた場合、黄斑疾患との関連を探索する。

(4) 黄斑形成、機能に関与する新規遺伝子が得られた場合、その情報を多能性幹細胞から黄斑の特性を保有する細胞を分化誘導する方法の開発に活用する。

3. 研究の方法

(1) 神経網膜への分化誘導: 分化誘導に使用した iPS 細胞は理化学研究所から提供されたヒト iPS 細胞 409B2 株を使用した。非接着処理を施した 96 ウェルプレートに市販の KSR20% 添加した無血清培地 (G-MEM、0.1mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸添加物、1mM ビルビン酸ナトリウム、20 μ M Y-27636、3 μ M IWR-1e) に懸濁した iPS 細胞 9000 個を 1 ウェルあたり播種した。2 日後にマトリゲルを終濃度 0.5% になるように添加し、12 日目に先の培地組成で IWR-1e を除いて、FBS (終濃度 1%) を新に加えた培地に交換した。15 日目に CHIR99021 (終濃度 3 μ M)、SAG (終濃度 100nM) を加えて 3 日間培養した。誘導開始後 18 日目から 24 日までの間は無血清培地 (D-MEM/F12、N2 サプリメント) で培養を続け、24 日目の段階で FBS (終濃度 1%)、レチノイン酸 (0.5 μ M) を添加した培地に交換した。その後 3 日間浮遊培養を継続した後、ポリ-D-リシンとラミニンをコーティングしたプレートに移して接着培養を開始した。

(2) 解析サンプルの調製: 提供された手術検体から網膜を黄斑部と周辺部に分けて採取し、RNeasy Mini Kit (キアゲン) を使用して、トータル RNA を抽出・精製した。

(3) 定量 PCR による遺伝子発現解析: 定量 RT-PCR は 2-STEP リアルタイム PCR キット (タカラバイオ) を用いた。RNA を cDNA に逆転写後、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (ライフテクノロジーズ) により、リアルタイム PCR (95 : 15 秒間、60 : 30 秒間、40 cycles) を実施した。得られた Ct 値から Ct 法により、リファレンス RNA (複数組織由来の混合 RNA) との遺伝子発現量の相対比較を行った。

(4) マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル解析: 黄斑部、周辺部、各 4 サンプルを解析に使用した。サンプル RNA はアジレント 2100 バイオアナライザにて品質検定を行った。アレイは Agilent Microarray SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K を使用した。黄斑部のサンプル群と周辺部のサンプル群で有意な発現差がある遺伝子を T-test (unpaired p cut-off < 0.05) により選別した。選別した遺伝子の発現変動は定量 qPCR により検証した。

4. 研究成果

(1) ヒト多能性幹細胞から網膜神経節細胞への分化誘導: 多能性幹細胞から網膜層構造を形成させる既存のプロトコルに変更を加え、胚様体から眼胞様構造が形成された段階で、浮遊培養から接着培養に切り変えたところ、眼胞様構造から神経線維の伸長が観察された (図 1)。免疫染色により網膜神経節細胞のマーカー遺伝子の発現を調べたところ、眼胞様構造の領域に網膜神経節細胞が高密度に存在することを確認した (図 2)。黄斑形成において、視細胞と並び網膜神経節細胞の発生、細胞死は重要なイベントであり、網膜神経節細胞への分化誘導系は黄斑形成関連の遺伝子の評価において有用になると考える。

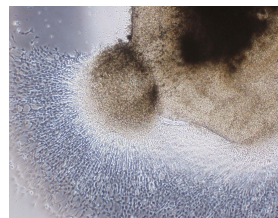


図 1 眼胞領域からの神経線維伸長

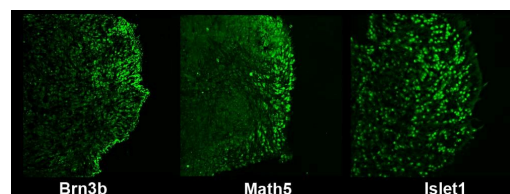


図 2 眼胞領域の網膜神経節細胞の生成

(2) 網膜細胞の発現プロファイル解析
 網膜の黄斑部、周辺部から抽出したトータル RNA を使用して、まず網膜分化の指標となる遺伝子の発現レベルを調べた(図 3)。予定網膜領域を決定する Rx 遺伝子の発現はリファレンス RNA と同等のレベルであったが、網膜前駆体生成、神経網膜への運命決定に関わる Chx10、視細胞マーカー遺伝子であるロドプシン、S-オプシンは数百倍高い発現が確認できた。眼発生マスター制御転写因子として知られている Pax6 もリファレンス RNA と比較して顕著に高い発現を示したが、他のマーカー遺伝子とは異なり、黄斑部のほうが周辺部よりも幾分か、高い発現を示した。黄斑形成との関連が報告されている Pax6 のスプライシング異性体、Pax6-5a(引用文献)も Pax6 と同様の傾向を示したが、黄斑部と周辺部との差がより大きかった。

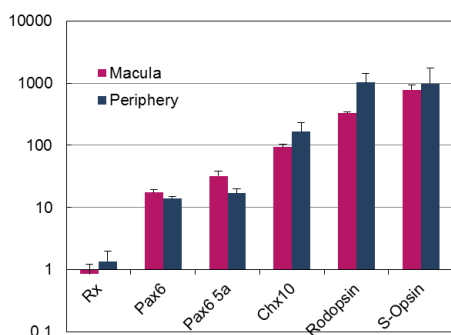


図 3 網膜黄斑部と周辺部における網膜分化マーカー遺伝子の発現

黄斑部、周辺部、(各 4 サンプル)のマイクロアレイデータを使用して T-test (unpaired p cut-off <0.05) を行い、2 群間で 2 倍以上発現レベルが異なる遺伝子をスクリーニングした(図 4)。その結果、864 遺伝子該当し、そのうち黄斑部のほうで発現が高いものが 739 遺伝子、周辺部のほうで高いものが 125 遺伝子であった。5 倍以上異なるものに絞るとそれぞれ 77 遺伝子、14 遺伝子存在した。発現差の大きい上位 22 遺伝子について定量 PCR により検証を行ったところ、18 遺伝子について発現差を確認することができた。この中には疾患遺伝子として報告されているものが複数あり、視細胞、アマクリン細胞の成熟など網膜分化とのつながりが既に知られている遺伝子も含まれていた。転写因子は少なかったが、Pax6 との制御関係がある転写因子が黄斑部で顕著に高い発現を示していた。黄斑部には網膜細胞の構成以外にも色素代謝や血管誘導阻害等の周辺部には無い特徴を有するので、ヒト網膜分化誘導を基にした黄斑形成モデルを完成させ、遺伝子工学手法を駆使して選別した遺伝子との関連を精査していく。

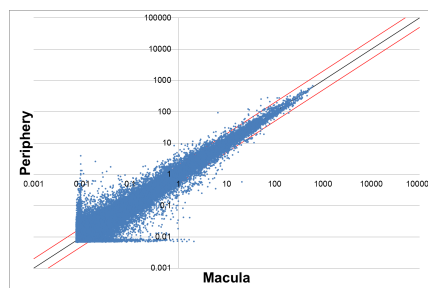


図 4 マイクロアレイによる網膜黄斑部と周辺部との遺伝子発現プロファイルの比較(スキャタープロット)

<引用文献>

Azuma N, et al, Hum Mol Genet. 2005 Mar 15;14(6):735-45.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tanaka T, Yokoi T, Tamalu F, Watanabe S, Nishina S, Azuma N. Scientific Reports. 査読有, 2015 Feb 10;5:8344. doi: 10.1038/srep08344

〔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：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 卓 (TANAKA, Taku)
国立成育医療研究センター研究所
視覚科学研究室 研究員
研究者番号：20443400

(2) 連携研究者

東 範行 (AZUMA, Noriyuki)
国立成育医療研究センター病院 眼科 医長
(研究所 視覚科学研究室室長 兼任)
研究者番号：10159395

横井 匡 (YOKOI, Tadashi)
国立成育医療研究センター病院 眼科 医員
研究者番号：80514025

仁科 幸子 (NISHINA, Sachiko)
国立成育医療研究センター病院 眼科 医員
研究者番号：40237954