慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	iPS細胞を用いた緑内障再生医療の開発
Sub Title	Development of regenerative medicine of glaucoma using iPS cells
Author	吉田, 哲(Yoshida, Tetsu)
Publisher	
Publication year	2011
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2010.)
JaLC DOI	
Abstract	緑内障の再生医療を念頭に、iPS細胞から網膜神経節細胞および成体における網膜幹細胞であるミューラー細胞を分化誘導する方法の確立、網膜内のミューラー細胞の同定法の探索を行った。まずiPS細胞からの分化誘導を行うために、網膜前駆細胞マーカーであるRx遺伝子座に赤色蛍光タンパク質DsRedが発現する組換えBACを作成しipS細胞に安定導入した。また、ミューサー細胞を同定するためにマーカーを探索し、エピプラキンが該当することを見いだした。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2009～2010 課題番号：21700423 研究分野：再生医学 科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21700423seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 6 月 16 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2009～2010
課題番号：21700423
研究課題名（和文）　ｉＰＳ細胞を用いた緑内障再生医療の開発
研究課題名（英文）　Development of regenerative medicine of glaucoma using iPS cells

研究代表者
吉田　哲　(YOSHIDA TETSU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：00365438

研究成果の概要（和文）：緑内障の再生医療を念頭に、iPS 細胞から網膜神経節細胞および成体における網膜幹細胞であるミューラー細胞を分化誘導する方法の確立、網膜内のミューラー細胞の同定法の探索を行った。まず iPS 細胞からの分化誘導を行うために、網膜前駆細胞マーカーである Rx 遺伝子座に赤色蛍光タンパク質 DsRed が発現する組換え BAC を作成し ipS 細胞に安定導入した。また、ミューサー細胞を同定するためにマーカーを探索し、エピプラキンが該当することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：To develop the regenerative medicine of glaucoma, I tried to introduce iPS cell into retinal ganglion cell and Muller cell, which is an adult stem cell in retina. At the same time, identivication of the marker genes of Muller cell were also taken place. First, a recombinant BAC clone, which has a red fluorescent protein DsRed gene at the position of a retinal progenitor cell marker Rx gene, was constructed. And, I found a gene called Epiplakin was a marker gene of Muller cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総　計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：再生医学
科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学
キーワード：緑内障、網膜神経節細胞、幹細胞、iPS 細胞

１．研究開始当初の背景

2006 年にマウス(Takahashi and Yamanaka, 2006)、2008 年にヒト iPS 細胞が樹立された(Takahashi *et al.,* 2007)。iPS 細胞は多くの細胞に分化する可能性、すなわち多能性(Pluripotency)を持つが、ES 細胞と異なり受精卵から樹立されるのではなく体細胞から樹立できるため、倫理的問題や拒絶反応の問題を克服する再生医療の切り札として注目されている。このような背景の下、現在、iPS 細胞を用いた再生医療の研究が盛んに行われている。ES 細胞や iPS 細胞を用いた再生医療の標的は、膵臓のβ細胞が脱落することによっておこる糖尿病や中脳黒質のドーパミン作動性ニューロンの脱落によりおこるパーキンソン氏病のような、１種類の細胞の変

性が原因でおこる疾患が主であり、既にJaenischらのグループにより、iPS細胞からドーパミン作動性ニューロンの誘導が報告されている(Wernig *et al.,* 2008)。

網膜変性疾患などの眼科領域においては、加齢黄斑変性などの再生医療を念頭に、ES細胞から視細胞への高効率な誘導が積極的に行われている(Osakada *et al.,* 2008)。加齢黄斑変性は、網膜色素上皮細胞が細胞死をおこし二次的に視細胞も変性をおこすことにより失明に至る病であり、先進国において高齢者失明の１位を占める。日本における高齢者失明の主要な原因は、網膜神経節細胞が変性する緑内障であるが、網膜神経節細胞は７種類の網膜細胞のなかで最も早くに分化するためES細胞やiPS細胞からの誘導が困難であり、再生医療に関する研究はあまり検討されてこなかった。

２．研究の目的

（１）緑内障モデルマウスおよびマウスiPS細胞を用いて緑内障の再生医療の系を確立する。その際、緑内障モデルマウスに①分化誘導しないiPS細胞をそのまま移植、②iPS細胞を網膜神経節細胞に分化誘導させてから移植、③iPS細胞をMüller細胞に分化誘導させてから移植するという、３つの方法を試みる。

（２）成体網膜における幹細胞であるといわれているミューラー細胞をiPS細胞から分化誘導し、緑内障の再生医療を行う。

（３）網膜に存在するミューラー細胞自体を利用して緑内障の再生医療ができないかどうかの検討を行う。

３．研究の方法

（１）理研の高橋政代博士のグループが行ったES細胞から視細胞を分化誘導する培養法であるSFEB (Serum free embryoid body)法を用いて(Ikeda *et al.,* 2005)、まずiPS細胞を網膜前駆細胞への分化誘導を行う。その後遺伝子導入や液性因子の添加により網膜神経節細胞やミューラー細胞の分化を行う。

（２）生体内や試験管においてミューラー細胞を同定するために、ミューラー細胞の新たなマーカーの探索を行う。

（３）緑内障は日本においては失明原因の１位でありながら、モデルマウスの報告は非常に少なく、発祥機構の研究は遅れている。我々は、SOD1 (Superoxide dismutase 1)遺伝子に欠損を持つマウスを解析しているうちに、このマウスが緑内障様の症状を呈していることを見いだした。このマウスを解析することにより、緑内障の発症機構の解析を行う。

４．研究成果

（１）iPS細胞に網膜前駆細胞マーカー遺伝子Rxの発現調節下で赤色蛍光タンパクDsRedを発現する組換えBACを作成し、iPS細胞に安定導入した。この細胞を用いてiPS細胞から分化誘導した網膜前駆細胞を単離することに成功した。網膜からneurosphere法により選択的に培養した網膜幹細胞にMath5遺伝子を強制発現させることにより網膜神経節細胞が分化する事が報告されている(Yao *et al.,* 2007)。現在、iPS細胞から分化誘導した網膜前駆細胞にアデノウイルスをもちいてMath5遺伝子を強制発現させることにより、iPS細胞由来網膜神経節細胞の分化誘導を試みている。一方、iPS細胞からMuller細胞への分化誘導系の確立も行っている。Muller細胞は網膜細胞の中で唯一のグリア細胞であり、網膜前駆細胞に於いてNotchシグナルが活性化されることにより分化誘導されることが報告されている(Hatakeyama and Kageyama, 2004)。そこで、iPS細胞由来網膜前駆細胞にEDTAを加えることによりNotchシグナルを活性化させることにより(Rand et al., 2000)、Muller細胞の分化誘導を試みている。

（２）申請者は、膵臓においてのエピプラキンと呼ばれる遺伝子が幹細胞マーカーであることを報告した（Yoshida et al., 2009)。そこで、成体の網膜において幹細胞の機能を持つことが報告されているMuller細胞(Das et al., 2006)においてエピプラキンが発現しているかどうかを調べた。その結果、エピプラキンはMuller細胞に発現しており、NMDAを投与して再生を誘導した網膜において、Muller細胞における発現量が通常よりも高くなっていることを発見した。このことから、エピプラキン遺伝子はMuller細胞のマーカーであるだけでなく、Muller細胞の幹細胞活

性に何かしらの機能をもつことが示唆された。

（３）SOD 遺伝子は活性酸素の除去に働く遺伝子であり、SOD 遺伝子欠損マウスの網膜において酸化ストレスの亢進が認められた。それにともない細胞死が観測されたが、他の網膜細胞に比べ神経節細胞は特に酸化ストレスに対して脆弱であることが認められた。以上のことから、SOD 遺伝子欠損マウスにおいては網膜神経節細胞の細胞死が起こることにより緑内障のモデルとなることが示唆された。現在、このマウスにおける網膜神経節細胞の細胞死機構を詳細に検討することにより、緑内障における網膜神経節細胞死の機構を調べているところである。

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５件）

① Kenya Y, Ozawa Y, Yoshida T, Kurihara T, Hirasawa M, Ozeki N, Shiba D, Noda K, Ishida S, Tsubota K. (2011) Retinal ganglion cell loss in superoxide dismutase 1-deficiency. Invest. Ophthal. Vis. Sci. in press.査読有

② Matsuo A, Yoshida T, Yasukawa T, Miki R, Ishikawa K, Fujiwara S, Kume K, Kume S. (2011) Epiplakin1 marks the cholangiocyte lineage in normal liver and adult progenitors in injured liver. Gene Expr Patterns. 11:255-262.査読有

③ Terashima M, Kobayashi M, Motomiya M, Inoue N, Yoshida T, Okano H, Iwasaki N, Minami A, Matsuoka I. (2010) Analysis on the expression and function of BRINP family genes during neural differentiation of mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells. J. Neurosci. Res. 88:1387-1393.査読有

④ Yoshida T, Guo X, Namekata K, Mitamura Y, Kume S, Harada T. (2010) Expression of Epiplakin1 in the developing and adult mouse retina. Jpn J. Ophthalmol. 54:85-88.査読有

⑤ Yoshida T, Murata K, Shiraki N, Kume K, Kume S. (2009) Analysis of gene expressions of ES-derived Pdx1-expressing cells: Implications of genes involved in pancreas differentiation. Dev. Growth Differ. 51:463-472.査読有

〔学会発表〕（計７件）

① 吉田哲、小泉春菜、結城賢弥、平林由香、鈴木啓一郎、三谷幸之介、小林哲郎、大山学、天谷雅行、岡田洋平、赤松和土、坪田一男、榛村重人、小沢洋子、岡野栄之
ヘルパー依存型アデノウイルスを用いたヒト iPS 細胞の遺伝子変異治療
第１０回　日本再生医療学会総会、京王プラザホテル（東京）、2011 年 3 月 1 日、2 日

② Yoshida, T., Koizumi, H., Yuki, Y., Kubota, S., Hirabayashi, Y., Suzuki, K., Mitani, K., Kobayashi, T., Ohyama M., Amagai, M., Okada, Y., Akamatsu, W., Tsubota, K., Shimmra, S., Ozawa, Y., Okano, H. A gene therapy for a gene mutation in human iPS cellusing helper-dependent adenoviral vector.
The 16th International Conference of the International Society of Differentiation, From Stem Cells to Organisms.
Nara-ken New Public Hall, Nara, Japan. November 15-18, 2010.

③ 吉田哲
ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いたヒト iPS 細胞の遺伝子変異治療の試み
iPS・ES・体性幹細胞 Forum 2010 ～基礎研究から臨床応用・創薬研究へ～
秋葉原 UDX GALLERY（東京）、
2010 年 6 月 29-30 日

④ T. Yoshida, H. Koizumi, K. Yuki, K. Tsubota, H. Okano, Y. Ozawa.
Purification of iPS cells derived from a retinitis pigmentosa patient from feeder cells.
ARVO 2010, The Future of Eye and Vision Research.
Fort Lauderdale, Florida, USA.
May 2-6, 2010.

⑤ Tetsu Yoshida, Haruna Koizumi, Kenya Yuki, Keiichiro Suzuki, Kohnosuke Mitani, Kazuo Tsubota, Shigeto Shimmra, Yoko Ozawa, Hideyuki Okano.
A gene therapy for a patient with a familial neurodegenerative disease using iPS cell.
Global COE Program Symposium 2010, Education and Research for Sterm Cell Medicine.
Center for Integrated Medical Research, Keio University, Tokyo, Japan.
February 25-26, 2010

⑥ Yoshida T, Kume S, Harada T, Tsubota K, Ozawa Y.
Expression of Epiplakin1 in the Developing and Adult Mouse Retina
Retina: Neural Stem Cells and Photoreceptor Degeneration.
Okinawa Institute of Science and Technology, Okinawa, Japan.
November 9-12, 2009.

⑦ 吉田哲、白木伸明、馬場秀夫、後藤瑞希、藤原作平、粂和彦、粂昭苑
Epiplakin1 の発現パターンの解析
第４２回日本発生生物学会、トキメッセ（新潟）、2009 年 5 月 28-31 日

〔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〕
ホームページ等
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
吉田　哲（YOSHIDA TETSU）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：００３６５４３８

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし