

2008年2月4日

独立行政法人 理化学研究所

ヒト ES 細胞から視細胞へ：既知の因子のみを用いた分化誘導に世界で初めて成功

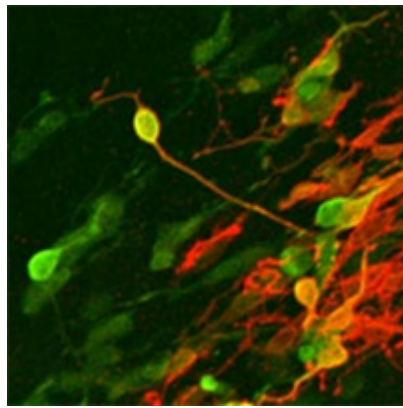
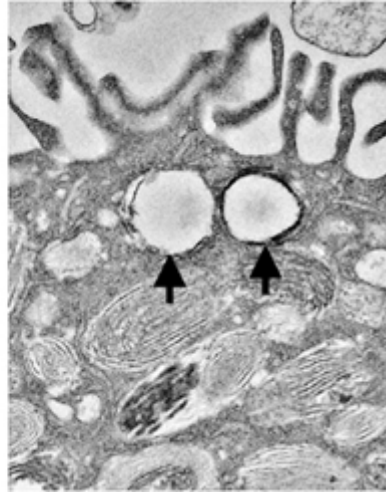
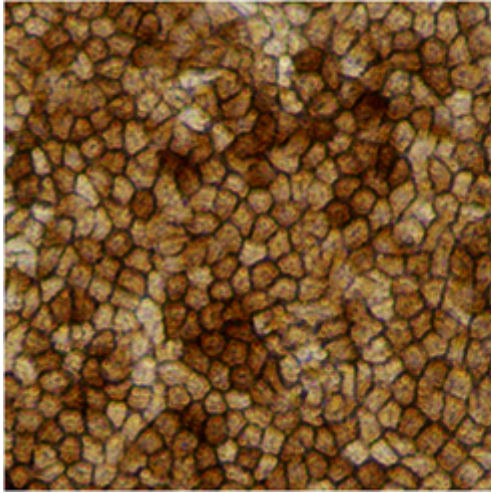
- 胎児網膜を使わずに 20～30%の高効率の分化を達成 -

ES 細胞（胚性幹細胞）は、生体のすべての組織を生み出すことができることから「万能細胞」とも呼ばれ、再生医療や薬品開発への応用が期待されています。また、2007年11月には、ヒトの皮膚細胞から ES 細胞と同じような能力を持つ「iPS 細胞」を生み出すことに京都大学の山中伸弥教授らが成功して世界を驚かせるなど、世界中で万能細胞の研究が急速に進められています。

理研発生・再生科学総合研究センターの網膜再生医療研究チームらは、光を感じる神経細胞である「視細胞」をヒト ES 細胞から 20～30%という高効率で分化させることに、世界で初めて成功しました。

網膜疾患や失明の原因の一部は視細胞や網膜色素上皮細胞の変性にあるため、変性した網膜に視細胞を移植する再生医療の実現が期待されています。研究チームは、以前から ES 細胞から視細胞や網膜色素上皮細胞を生み出す分化誘導法の確立に挑戦してきました。すでにマウスの ES 細胞から網膜の前駆細胞に分化する方法は明らかにしていますが、網膜前駆細胞を視細胞へ分化するには、胎児の網膜と共培養する必要性がありました。今回、胎児網膜を使わず、成分が明らかな条件で視細胞を得る新たな手法を確立しました。

今後、この方法から得られる視細胞を、ヒトの疾患治療に活かすためには、モデル動物を使ってその視機能を的確に評価する方法の開発や、有効性や安全性などを詳細に調べることが不可欠となり、さらなる研究の積み重ねが必要です。研究チームでは、引き続きこれらの問題の解決に取り組んでいきます。



写真は、(上) ヒト ES 細胞から分化した網膜色素上皮細胞と (下) 視細胞

2008年2月4日
独立行政法人 理化学研究所

ヒト ES 細胞から視細胞へ：既知の因子のみを用いた分化誘導に世界で初めて成功

- 胎児網膜を使わずに 20~30%の高効率の分化を達成 -

◇ポイント◇

- ・ マウス、サル、ヒトの ES 細胞から視細胞の誘導に成功
- ・ 成分が不明な血清などを用いず、既知成分だけで試験管内分化させる手法を確立
- ・ 難治性網膜変性疾患に対する移植細胞源として期待

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は国立大学法人京都大学（尾池和夫総長）と共同で、ヒト胚性幹細胞（ES細胞）から光を感知する神経細胞の視細胞^{*1}へ 20~30%という高効率で分化させる手法を世界で初めて開発しました。理研発生・再生科学総合研究センター（竹市雅俊センター長）網膜再生医療研究チームの高橋政代チームリーダー、小坂田文隆研究員、池田華子客員技師らと細胞分化・器官発生研究グループの笹井芳樹グループディレクターらの研究グループによる成果です。

視細胞や網膜色素上皮細胞^{*2}の変性は、多くの網膜疾患や失明の原因となっています。これらに対する治療の可能性として、変性網膜に視細胞を移植する網膜再生が注目されていますが、入手困難な胎児網膜を使うため、胎児網膜に代わる移植細胞源が求められていました。そこで研究グループは、試験管内で培養し大量に増やすことができるES細胞から、視細胞や網膜色素上皮細胞を分化誘導し、移植細胞源とする方法の確立を試みましたが、これまでにマウスのES細胞から網膜前駆細胞へ分化する方法は明らかになっていましたが、既知の成分だけで試験管内で視細胞を得られないという問題を根本的に解決することができませんでした。特に、ヒトに応用することを考えた場合、感染や拒絶反応などの原因の可能性のある血清や組織を用いない分化誘導方法の開発が求められていました。

小坂田研究員らは、胎児網膜中に含まれる分化誘導因子に着目し、視細胞を誘導する因子を探索した結果、ヒトES細胞から既知組成の培養条件で杆体（かんたい）視細胞^{*1}や錐体（すいたい）視細胞^{*1}からなる視細胞を大量に得る手法を確立し、同時に、ヒトES細胞から網膜色素上皮細胞を分化誘導することにも成功しました。

本研究の成果により、ヒトES細胞から分化させた網膜細胞が胎児網膜に代わる移植細胞源として活用することが可能となり、これまでの網膜移植の根本的な問題を解決することができると期待されます。今後、ヒトへの応用を目指すには、これらの分化細胞を用いて網膜変性疾患のモデル動物に移植を行い視機能を評価し、有効性や安全性などを詳細に調べる必要があります。

本研究は、文部科学省のリーディングプロジェクト「再生医療の実現化プロジェクト」の一環として行われたものであり、科学雑誌『*Nature Biotechnology*』オンライン版（2月3日付け：日本時間2月4日）に掲載されます。

1. 背景

網膜（図 1）は中枢神経系の一部で、一度傷害を受けると修復が極めて難しい組織です。日本で約 3 万人の患者がいるといわれる網膜色素変性^{*3}は、光を感知する視細胞の生存・維持に必要な遺伝子の異常が原因で、視細胞が変性・脱落し、やがて失明することが知られています。また、欧米で高齢者の失明原因の 1 位を占める加齢黄斑変性^{*4}では、脈絡膜からの血管新生などによって網膜色素上皮細胞が変性し、2 次的に視細胞が細胞死を引き起こします。現在までにこれらの網膜細胞変性に対する有効な治療法はほとんど確立されていません。

胎児網膜由来の視細胞を変性網膜に移植することにより、視機能が回復することが報告され（2006 年 McLaren ら、*Nature*誌）、脱落した視細胞や網膜色素上皮細胞を細胞移植により補充して網膜を再建させる網膜の再生が注目されています。しかし、胎児網膜は入手が困難なため、胎児網膜に代わる移植細胞源が求められていました。そこで、研究グループは培養により大量に増やすことができる胚性幹細胞（ES細胞）に着目し、これまでに、マウスのES細胞から網膜前駆細胞へ分化誘導することに成功していました（2005 年 8 月 2 日プレス発表：ES細胞からの神経網膜前駆細胞と視細胞の分化誘導に世界で初めて成功）。しかし、この方法では、未知の成分を含む血清を使用する必要がありました。また、網膜前駆細胞からさらに視細胞へ分化誘導するには、網膜前駆細胞と胎児網膜とを共培養する必要がありました。将来、移植に使うためには、感染や拒絶反応の原因になりうる血清や胎児網膜を使用せず、試験管内で大量に網膜細胞を得る方法の確立が望まれていました。今回の研究で、小坂田研究員らはマウス、サル、ヒトのES細胞から視細胞へ分化誘導する因子を探索し、既知の因子のみを用いた培養条件でES細胞から視細胞や網膜色素上皮細胞を効率的に得る方法を確立しました。

2. 研究手法と成果

(1) マウス ES 細胞→網膜前駆細胞→視細胞前駆細胞→視細胞への分化誘導

研究グループではこれまでに、マウス ES 細胞からの網膜前駆細胞への分化誘導法を確立しています。今回も前回と同じ方法を用いて、網膜前駆細胞を分化誘導しました。具体的には、網膜前駆細胞に分化した場合に緑色に光る蛍光タンパク質の遺伝子を組み込んだマウスの ES 細胞に、①Wnt（ウイント）シグナルを阻害する Dkk-1、②Nodal シグナルを阻害する Lefty-A（レフティ・エー）、③ウシ胎仔血清、④増殖因子であるアクチビン A、という 4 つの培養成分を培地に添加して分化誘導を行いました。その結果、緑色に光る網膜前駆細胞が認められました。

次に、この網膜前駆細胞を視細胞へ分化させるために、網膜前駆細胞だけを分離し、培地に⑤Notch シグナルを抑制する化合物である DAPT を処置し、視細胞前駆細胞を誘導しました。これまでの報告で、生体の発生の過程で Notch シグナルが抑制されることにより視細胞が誘導される仕組みが明らかになっており、これを試験管内で再現するために DAPT を使用しました。続いて、この分化した視細胞前駆細胞を視細胞にさらに分化させるために、生体において視細胞の発生に必要な因子として知られている⑥レチノイン酸、⑦タウリンなどを培地に添加したところ、錐体視細胞と杆体視細胞を共に誘導できることが明

らかになりました。

(2) サル ES 細胞から網膜前駆細胞→網膜色素上皮細胞・視細胞への分化誘導
次に、動物由来の細胞や血清を使わずに視細胞や網膜色素上皮細胞へ分化誘導するために、サル ES 細胞を用いて検討しました。マウス ES 細胞の培養系でも使った因子の中で①Dkk-1 と②Lefty-A を培地に処置して、サル ES 細胞を分化誘導しました。この処置期間をこれまでより長くすることによって、③ウシ胎仔血清、④増殖因子であるアクチビン A を使用せずに網膜前駆細胞を効率良く分化誘導することができました。その後培養を続けたところ、色素を有する多角形状の網膜色素上皮細胞への分化が認められました。一方、マウス ES 細胞の場合と同じように網膜前駆細胞を視細胞に分化させるために、分化因子である⑥レチノイン酸と⑦タウリンで処置したところ、杆体視細胞および錐体視細胞へ分化することが認められました。以上の検討により、ES 細胞から既知組成培養条件下で網膜細胞を分化誘導する方法を確立できました。

(3) ヒト ES 細胞から網膜前駆細胞→網膜色素上皮細胞・視細胞への分化誘導
サル ES 細胞で確立した分化誘導方法を用いて、ヒト ES 細胞を網膜細胞へ分化誘導しました。同様に、①Dkk-1 と②Lefty-A を培地に添加したところ、ヒト ES 細胞は網膜前駆細胞へ効率良く分化しました。

さらに、そのまま培養を続けたところ、色素を有する多角形状の網膜色素上皮細胞が認められました。これらの細胞は、網膜色素上皮細胞の特徴である貪食能を有していることが確認できました (図 2)。

次に視細胞に分化させるために、分化因子である⑥レチノイン酸と⑦タウリンで処置したところ、杆体視細胞 (図 3) および錐体視細胞へ分化することが認められました。これらの細胞は、視細胞に特有な光刺激を電気信号に変換する因子を発現していました。これにより、動物成分の血清や組織などを使わない既知の因子だけを用いた培養方法で、ヒト ES 細胞から 20~30% の効率で視細胞を得ることに成功しました。

3. 今後の期待

今回の研究により、マウス、サル、ヒトの ES 細胞から、視細胞、網膜色素上皮細胞が得られることが明らかになりました (図 4)。ヒト ES 細胞から既知組成の培養条件により視細胞や網膜色素上皮細胞が得られたことから、網膜の再生を目指した移植治療への利用が期待されます。しかし、実際に治療に用いるにはまだ多くの課題があり、(i) ヒト ES 細胞由来の視細胞の機能解析、(ii) 視細胞のみを分離する方法の開発、(iii) 網膜変性モデル動物への移植、その視機能の解析、(iv) 拒絶反応の解析、(v) 腫瘍の形成などの安全性の検証、などを詳細に検討する必要があります。一方、本研究で確立した分化誘導法を用いると、ES 細胞と同じ性質を持つ iPS 細胞 (induced pluripotent cell) *5 からも網膜細胞を得ることができると考えられます。また、この分化誘導方法により得られた細胞を用いて、創薬研究や毒性試験、眼の発生研究への応用も期待できます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

発生・再生科学総合研究センター 網膜再生医療研究チーム

チームリーダー 高橋 政代 (たかはし まさよ)

研究員 小坂田 文隆 (おさかだ ふみたか)

神戸研究所研究推進部 企画課

Tel : 078-306-3008 / Fax : 078-306-3039

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 視細胞

視細胞は光に反応する神経細胞で、光刺激を電気信号に変えることができる。この視細胞には大きく分けて2つの種類の細胞があり、1つは杆体視細胞で、主に暗いところでの物の見え方などに関与する。もう1つは錐体視細胞で、主に中心の視力や色覚などに関与する。

※2 網膜色素上皮細胞

網膜の一番外側に位置する色素を有する多角形状の細胞で、網膜に栄養を供給したり、網膜と脈絡膜のバリアを形成したりする細胞。隣接している視細胞の外節部分を貪食する(貪食能)という特徴的な性質を持っており、視細胞の機能発現、生存・維持に非常に重要な役割を担っている。

※3 網膜色素変性

網膜色素変性では、視細胞のうち主に杆体視細胞が、細胞の生存維持に必要な遺伝子の異常により徐々に変性・消失して視野が狭窄し、多くの場合視力低下を来す病气。日本人の患者数は約3万人。

※4 加齢黄斑変性

加齢黄斑変性は、網膜下の網膜色素上皮細胞の細胞死や脈絡膜からの血管新生によって、2次的に視細胞が障害を引き起こす。先進国において高齢者の失明原因の1位を占める重篤な疾患の1つ。

※5 iPS細胞

成人の皮膚などの組織から採取した細胞に、Oct3/4、Sox2、Klf4を遺伝子導入することにより作製される、ES細胞と同等の能力を持つ細胞。日本の京都大学再生医科学研究所の山中伸弥教授らの研究グループにより世界で初めてiPS細胞が作製された。

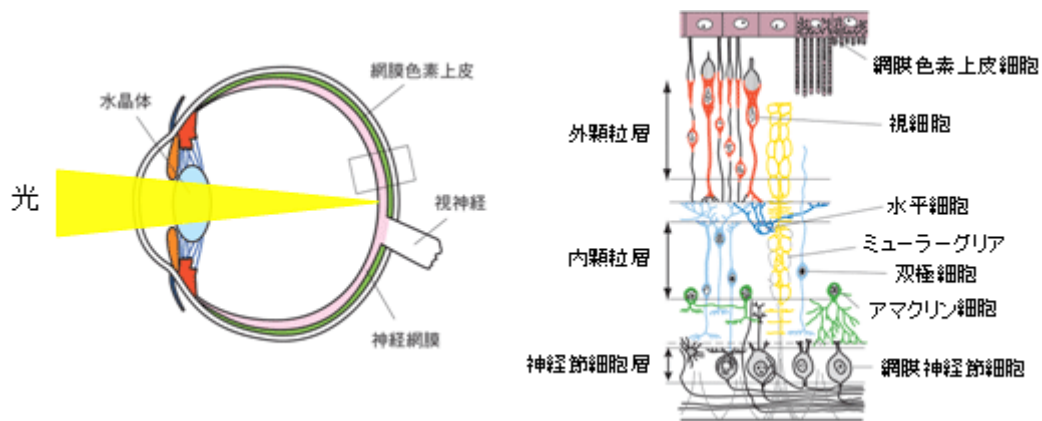


図1 網膜の構造

角膜や水晶体を透過した光は、神経網膜に到達し、視細胞で感知される。その後、視覚情報は双極細胞、神経節細胞へと伝達され、視神経を通じて視覚野へと伝えられる。

(小坂田文隆、高橋政代「体性幹細胞を用いた網膜再生」実験医学 24, 256-262 (2006) より改変)

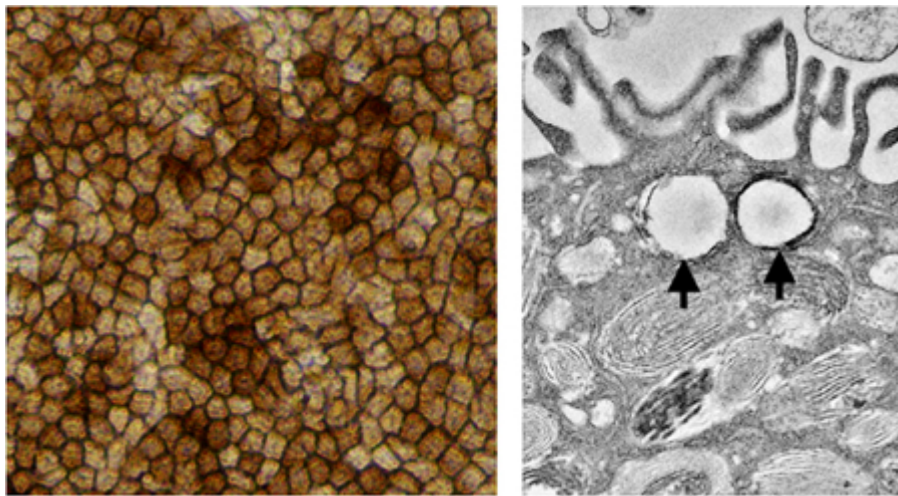


図2 ヒト ES 細胞から分化した網膜色素上皮細胞

(左図) ヒト ES 細胞を Dkk-1 と Lefty-A で処置することにより色素を有する多角形状の網膜色素上皮細胞へ分化した。

(右図) 上の白い部分が細胞の外側、下側の暗い部分が細胞。人工ビーズ (矢印の白い丸いもの) を細胞内に取り込んでいる (貪食能を持つ) ことがわかる。

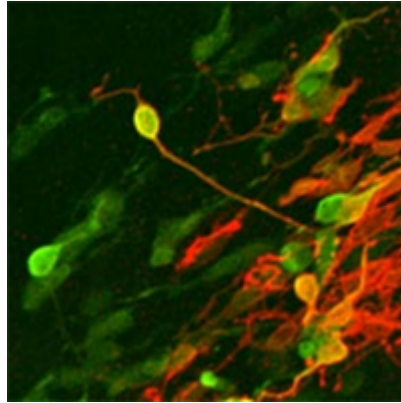
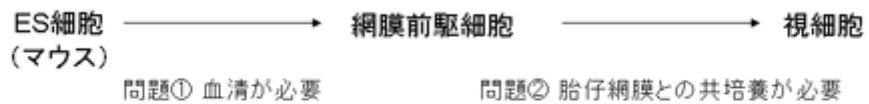


図3 ヒト ES 細胞から分化した視細胞

ヒト ES 細胞を Dkk-1 と Lefty-A で処置し、その後 レチノイン酸とタウリンで処置することにより分化した杆体視細胞。(赤：ロドプシン 緑：リカバリン)

これまで



ES細胞から視細胞への分化は、既知組成の培養条件下では不可能であった。

今回の研究で

- ② マウスES細胞を使って、視細胞への分化因子を同定(レチノイン酸、タウリン)。
- ① サルES細胞を使って、血清を使わない方法を確立。



ヒトES細胞から血清を使わず、試験管内で視細胞の分化誘導に成功。

図4 今回の成果のまとめ