



Generation of three-dimensional retinal organoids expressing rhodopsin and S- and M-cone opsins from mouse stem cells.

Ueda, Kaori

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7140号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007140>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



Generation of three-dimensional retinal organoids expressing rhodopsin and S- and M-cone opsins from mouse stem cells.

マウス幹細胞における杆体・錐体視細胞を発現する三次元網膜組織の分化

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
眼科学
(指導教員：中村 誠 教授)

UEDA Kaori
上田 香織

要約

【背景・目的】

① 眼科領域における多能性幹細胞の利用

多能性幹細胞は潜在的にあらゆる組織への分化能力を持ち、自己組織化等の分化手法を用いて組織発生研究や分化組織の移植による再生医療研究が進められている。さらに、体細胞から多能性幹細胞を樹立する人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の確立により、上記の発生・再生研究に加えて患者 iPS 細胞による病態解析・創薬研究が展開されるなど、適用範囲が広がっている。眼科領域では、2011 年に永楽らが無血清凝集浮遊培養法 (SFEBq 法) を用いてマウスの胚性幹細胞 (ES 細胞) から眼杯組織を作製したことを皮切りに、現在ではヒト多能性幹細胞から角膜や毛様体組織・神経網膜・色素上皮など眼の様々な構成組織が作製され、分化色素上皮細胞においては加齢黄斑変性患者への自家・他家移植による再生医療研究が進められている。

② マウスによる視細胞の発生物学的研究

神経網膜は眼球後方に位置し外界からの光情報を脳に伝える役割を持ち、視細胞を含む外顆粒層、水平細胞・双極細胞・アマクリン細胞の 2 次ニューロンが位置する内顆粒層と神経節細胞層の 3 つの神経細胞層に構成される。多くの脊椎動物は暗所視を担う杆体視細胞と昼間視・色覚を担う錐体視細胞の 2 種類の視細胞を持つ。各視細胞の生理機能は発現する光受容蛋白質 (オプシン) に起因し、杆体は光に鋭敏に反応するロドプシンを発現する。錐体には青色 (短波長) 光を受ける S (short-wavelength sensitive) 錐体と、緑色 (中波長) 光に反応する M (middle-wavelength sensitive) 錐体があり、それぞれ S-オプシン、M-オプシンを発現する。杆体は網膜の全域に分布する一方、S 錐体と M 錐体は異なる分布を示す。霊長類以外の哺乳類では S 錐体は主に腹側 (眼球下側) に、M 錐体は主に背側 (眼球上部) に分布し、マウスなど一部の動物では境界部分の錐体が S・M-オプシンを共発現する。

哺乳類発生モデル動物として汎用されるマウスでは、視細胞発生は胎生 12 日ごろより始まり、その分化と成熟に関与する様々な転写因子が報告されている。例えば、Nr1 (Neural retina leucine zipper), Nr2e3 (Nuclear receptor subfamily 2 group E member 3) は杆体の分化に、Trβ2 (Thyroid hormone receptor β2 isoform), Rxry (Retinoid X receptor γ), Onecut1 は錐体の分化に必須であり、Crx (Cone-rod homeobox) はオプシンなどの視細胞特異的遺伝子の発現・維持に不可欠である。また、これら転写因子の発現・活性は特異的なリガンドにより直接的・間接的に制御されるため、レチノイン酸や T3 (Triiodothyronine), BMP4 (Bone morphogenetic protein 4) などの *ex vivo* による分化誘導研究が多く報告されている。例えばラット胎仔由来網膜前駆細胞をレチノイン酸含有培地で維持するとロドプシン陽性画分が増加し、BMP4 添加により背側網膜への誘導が促進される。

③ 本研究の目的

ES/iPS 細胞から分化誘導した神経網膜組織でも *ex vivo* 実験と同様の再現結果が報告さ

れ、神経網膜の特定の細胞種・領域の選択的分化が可能となっている。しかしながら、マウス ES/iPS 細胞由来分化網膜組織は分化後 20 日 (DD20) 以降は自然崩壊が進むため、錐体視細胞分化の観察は困難である。すなわち、生体マウスでは M-オブシンの発現は P10 付近で認められるが、培養網膜では少なくとも DD 30 (P10 を受精から 30 日後と概算) まで維持が必要と推測される。そこで、本研究では既知の SFEBq 培養プロトコルを改変し、マウス iPS 細胞由来の三次元立体網膜組織から杆体・錐体の視細胞サブタイプを可視化させる培養条件の確立を目標とした。

【結果】

① 9-*cis*-レチノイン酸は杆体分化を促進する

立体網膜で杆体視細胞分化を可視化するため、杆体特異的遺伝子である *Nrl* のプロモータ制御下で EGFP を発現する *Nrl*-EGFP マウスより樹立した iPS 細胞を使用した。*ex vivo* 実験ではレチノイン酸がロドプシンの発現を増加させるが、既報では光学異性体である 9-*cis*-レチノイン酸 (9cRA) が *all-trans*-レチノイン酸 (ATRA) より高い効果を示す。そこでこれら 2 つの光学異性体を用いて杆体視細胞分化が促進される立体網膜の作製を試みた。

既報の SFEBq プロトコルでは 10% の FBS を維持培地に使用するが、FBS がレチノイン酸を含有するため DD 9 より FBS を非含有培地で維持培養を行った。これは FBS を含む培地で培養を続けると、分化した網膜組織がロゼッタ構造をとりやすいためである。胚様体は DD1 で形成され始め、DD14 では眼杯様構造を形成する。これ以降の培養における培地に ATRA または 9cRA を添加する群、溶媒コントロールとしてエタノールのみを添加した群の 3 群の網膜組織の構造を比較した。

DD23 では全群で EGFP の発現を認めたが、9cRA 添加群では ATRA 添加群とコントロール群と比較してその発現が増強していた。また、他の 2 群が DD20 以降で発現してくるのに比して 9cRA 添加群では DD19 以前より発現しており、9cRA が杆体発生を促進することが示唆された。免疫染色では、9cRA 添加群では多くのロドプシン陽性細胞が外層に認められた。対して S-オブシンの発現はそれぞれのレチノイン酸投与群では同等であった一方で、溶媒コントロール群で高い発現を示した。GFP 陽性細胞の一部は S-オブシンと共陽性であり、このことからマウス網膜の発生において杆体の一部は発生の経過中にロドプシンと S-オブシンが共発現することが予測された。

② M-オブシン陽性立体網膜の分化誘導条件の検討

次に、立体網膜組織をより長期に維持し M-オブシンを発現させる培養条件を検討した。まず視細胞の発生・分化の経時変化を検証するため、培養経過中のロドプシン、S-オブシンと、*Crx*、*Trp2* の転写因子の発現を、9cRA 添加群と溶媒コントロール群で比較した。9cRA 添加群では DD20 前よりロドプシンの発現を認める一方、S-オブシンの発現は分化の全期間を通して少ない傾向にあった。溶媒コントロール群では S-オブシンの発現は DD20 から増加し、DD25 よりロドプシンの発現が増加した。*Crx* の発現は共に DD17 から DD20

頃に高い発現を認め、*Trp2* は共に DD25 以降で発現が減少した。M-オブシンの発現を増加させるため、分化初期に T3 (*Trp2* を活性化し M-オブシン発現を活性化)、BMP4 (M 錐体が多い背側網膜を誘導)、DAPT (Notch シグナル阻害剤で脱分化を促進) を添加して培養する群を用意した。免疫染色では DD17 の染色像はコントロール群と同等であったが、DD20 では S-オブシン陽性細胞の減少をみた。*Crx* と *Trp2* については概ね同等であったが、*Trp2* 陽性細胞がコントロール群では網膜全層に分布するように見受けられた。

この培養条件で立体網膜組織を DD35 まで維持培養したが、T3/BMP4/DAPT 添加群は組織の表層が崩れ、網膜構造の維持が困難であった。一方で溶媒コントロール群ではロゼッタ化していたが DD35 まで神経網膜層を維持することができ、S-オブシン、M-オブシンを検出することができた。4 個の DD35 網膜組織において S-オブシンと M-オブシン陽性細胞数を計測すると、S-オブシン陽性細胞が多い網膜組織が 4 個中 3 個であったが、1 個の網膜組織では M-オブシン陽性錐体と、S-オブシンと M-オブシン共陽性の錐体が多かった。これらの結果から、S 錐体と M 錐体の数の比は各網膜組織によって異なることが予測された。なお、これら DD35 の溶媒コントロール群ではロドプシン陽性細胞画分は錐体画分より多く、生体マウスの網膜組織と同等の結果であった。

【考察】

本研究では第一に、9cRA を添加することで杆体を多く発現させることができた。この結果は過去のラット網膜での検討と同様の結果である。

第二に、DD20 以降で FBS を 1% 含む培地を使用することで、DD35 まで網膜組織を維持することができた。我々は以前に、10% の FBS を DD14 から使用すると網膜組織はあまり大きく成長せず、ロゼッタ構造をとりやすくなることを報告している。すなわち成熟培地を使用する際は初めのうちは FBS を除去しておいた方がよいが、1% の FBS を DD20 以降に培地に添加することで、細胞の維持に必要な栄養分を供給し、ロゼッタ構造の形成を最小限にしているものと考えられる。

また DD35 まで組織を維持するためには、サプリメントの添加をしない方がよいという結果になった。このとき各錐体は外顆粒層に分布しており、S-オブシン、M-オブシンもしくはその両方を発現していた。生体マウスの網膜では、錐体は網膜の背側と腹側によって異なる分布を持つ。我々の実験では S 錐体の多い部位、M 錐体の多い部位のほかに、S-オブシンと M-オブシンの両方が共発現している錐体が認められた。立体網膜組織でも生体と同様に錐体の分布が偏る可能性は高いが、同一培養ディッシュで維持した立体網膜毎に割合が異なることから分化決定は偶発的と予想される。また M 錐体の発現を促進するため T3/BMP4/DAPT を添加したが、この方法では外層の構造を DD35 まで維持することはできなかった。この理由として視細胞以外の細胞でもリガンドが作用したため、外顆粒層以外の層構造が変容した可能性が推測された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2763 号	氏 名	上田 香織
論文題目 Title of Dissertation	マウス幹細胞における杆体・錐体視細胞を発現する三次元網膜組織の分化 Generation of three-dimensional retinal organoids expressing rhodopsin and S- and M-cone opsins from mouse stem cells.		
審査委員 Examiner	主 査 青井 貴之 Chief Examiner 副 査 和氣 和明 Vice-examiner 副 査 榎本 香樹 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

脊椎動物の神経網膜を構成する組織のなかで、外界からの光刺激を最初に受容する視細胞は、暗所視を司る杆体視細胞と昼間視・色覚を担う錐体視細胞に分けられる。杆体は光に鋭敏に反応するロドプシンを、また錐体には青色光を受けるS錐体と、緑色光に反応するM錐体があり、それぞれS-オプシン、M-オプシンを発現する。マウスでは杆体は網膜の全域に分布する一方、S錐体は主に腹側(眼球下側)に、M錐体は主に背側(眼球上部)に分布し、境界部分の錐体がS・M-オプシンを共発現する。マウスの視細胞発生は胎生12日ごろより始まり、視細胞特異的遺伝子の発現と維持、また杆体・錐体の分化に関与する様々な転写因子が報告されている。また、これら転写因子の発現・活性は特異的なりガンドにより直接的・間接的に制御される。

体内のあらゆる組織への分化能をもつ多能性幹細胞を用いて、組織発生研究や再生医療研究が広く行われている。眼科領域では、無血清凝集浮遊培養法(SFEBq法)を用いた眼杯作製をはじめとして様々な構成組織の分化・誘導技術が報告されている。神経網膜組織について、ES/iPS細胞から特定の細胞種・領域の選択的分化は可能であるが、マウスES/iPS細胞由来の分化網膜組織は分化後20日(DD20)以降に自然崩壊が進むため、これまで錐体視細胞分化の観察は困難であった。

本研究では既知のSFEBq培養プロトコルを改変し、マウスiPS細胞由来の三次元立体網膜組織から杆体・錐体の視細胞サブタイプを可視化させる培養条件の確立を目標とした。

立体網膜で杆体視細胞分化を可視化するため、杆体特異的遺伝子であるNrlのプロモータ制御下でEGFPを発現するNrl-EGFPマウスより樹立したiPS細胞を使用した。Ex vivo実験として、眼杯様構造が形成されるDD14以降の培地に9-cis-レチノイン酸(9cRA)またはall-trans-レチノイン酸(ATRA)を添加する群、溶媒コントロールとしてエタノールのみを添加した群の3群の網膜組織の構造を比較した。9cRA添加群ではEGFPが他の2群と比較して早い時期から発現し、杆体発生を促進することが示唆された。免疫染色では、9cRA添加群では多くのロドプシン陽性細胞が外層に認められた。

視細胞の発生について、培養経過中のロドプシン、S-オプシンと、視細胞発生に関与するCrx、またM-オプシンの発生を促進するTrβ2の転写因子の発現を、9cRA添加群と溶媒コントロール群で比較した。ロドプシンは9cRA添加群で数日程度、発現が早く、S-オプシンの発現は9cRA群で分化の全期間を通して少ない傾向にある一方、コントロール群ではDD20から高い発現を示した。Crxの発現は共にDD17からDD20頃に高い発現を認め、Trβ2は共にDD25以降で発現が減少した。M-オプシンの発現を増加させるため、分化初期にT3、BMP4、DAPTを添加して培養する群を用意し経時変化をみたところ、DD17の免疫染色像はコントロール群と同等であったが、DD20ではS-オプシン陽性細胞が減少した。CrxとTrβ2については概ね同等であったが、Trβ2陽性細胞がコントロール群では網膜全層に分布し、錐体への分化促進が示唆された。

しかしこの培養条件では組織の表層が崩れ、長期にわたる網膜構造の維持が困難であった。一方で溶媒コントロール群では DD35 まで神経網膜層を維持することができ、S-オプシン、M-オプシンを検出することができた。回収した網膜組織は、S-オプシン陽性錐体が多い組織と、M-オプシン陽性錐体および S-オプシンと M-オプシン共陽性の錐体が多い組織があった。これらの結果から、S 錐体と M 錐体の数の比は各網膜組織によって異なることが予測された。

本研究は、マウス iPS 細胞から神経網膜への分化誘導法について、その誘導効率を向上させる方法を研究したものであるが、従来行われていなかった、マウス iPS 細胞由来の三次元立体網膜組織から杆体細胞をより多く分化発現させ、M 錐体を可視化する新たな方法確立した点で、価値があると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。