



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Transplantation of cells from eye-like structures differentiated from embryonic stem cells in vitro and in vivo regeneration of retinal ganglion-like cells(内容の要旨(Summary))
Author(s)	青木, 仁美
Report No.(Doctoral Degree)	博士 (再生医科学) 甲 第761号
Issue Date	2008-03-25
Type	博士論文
Version	
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/23166

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名 (本籍)	青木 仁美 (岐阜県)
学位の種類	博士 (再生医科学)
学位授与番号	甲第 761 号
学位授与日付	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Transplantation of cells from eye-like structures differentiated from embryonic stem cells in vitro and in vivo regeneration of retinal ganglion-like cells
審査委員	(主査) 教授 國貞 隆弘 (副査) 教授 山本 哲也 教授 中川 敏幸

論文内容の要旨

【目的, 緒言】

胚性幹細胞 (ES 細胞) は, 胚盤胞の内部細胞塊より樹立される細胞で, 多能性を有し, 初期胚に導入されると全ての細胞系譜へ分化する能力を有する。

マウス ES 細胞由来眼様構造は神経網膜, レンズ細胞, 網膜色素上皮細胞からなる構造で, マウス ES 細胞由来眼様構造に存在する網膜色素上皮細胞は, 発生中の鶏胚の眼胞へ移植されると, 発生中の鶏胚の網膜色素上皮細胞層に取り込まれ, 正常に分化する事をこれまでに報告してきた。

網膜神経節細胞は, 網膜の最内層に位置し, 先進国の年配者の主要な失明原因である緑内障と深く関係している。緑内障は視神経乳頭の病気であるが, 視神経は網膜神経節細胞の軸索から構成されており, 網膜神経節細胞の消失は緑内障に特徴的な視神経萎縮をもたらす。進行性に症状が悪化する緑内障には, 現在のところ根本的な治療法がない。

そこで我々は, 眼疾患に特化した再生医療の実用化を目指し, マウス ES 細胞由来眼様構造に存在する網膜神経節細胞が, 網膜神経節細胞が障害された眼球へ移植された時に, 障害された網膜神経節細胞を再生し, 将来的には緑内障の治療に役立つようなドナー細胞の供給源となりうるかどうかを調べ, 細胞移植による網膜神経節細胞の再生治療動物モデルを確立しようと試みた。

【対象と方法】

マウス ES 細胞は PA6 という支持細胞上で共培養し, 眼様構造へと分化を誘導する。培養 6 日目及び 11 日目の眼様構造を移植のためのドナー細胞とした。また比較対象として, 未分化マウス ES 細胞と胚齢 14 日目の胎児の網膜を用いた。

レシピエントには, 成体アルビノマウスを用い, 網膜神経節細胞未障害群と障害群とした。網膜神経節細胞障害群には, マウス ES 細胞由来眼様構造の移植 20 時間前に, 網膜神経障害性物質である NMDA を硝子体腔へ投与し, 網膜内層特に網膜神経節細胞を障害した。未障害群には同量の溶媒のみを投与した。

NMDA の投与及びマウス ES 細胞由来眼様構造の移植は, 経硝子体的に行われた。具体的には隅角に穴をあけ, 粘弾性物質を投与し, 同じ穴に鈍針をさして, レンズの側方を迂回して後房へ針を進め, 硝子体腔特に網膜直上へ細胞を移植した。

移植 10 日後及び 8 週間後に眼球を摘出し, 免疫組織学的な解析により移植された細胞の局在と分化を調べ, 視覚誘発電位の測定により電気生理学的に機能的な回復を評価した。免疫組織染色では, 神経系への分化を調べるために Tuj1, Pax6, NeuN を用い, 網膜神経節細胞への特異的な分化を調べるために Brn3b と Thy1.2 と用いた。視覚誘発電位は, 眼で受け取られた光刺激が視神経を介して脳に伝えられているかを調べる電気生理学的な機能の評価法で, マウスの目に装着したコンタクトレンズから光刺激を与え, 視神経を挟むように頭蓋に装着された電極からの電気反応を記録する。

【結果】

未分化な ES 細胞を移植した場合には、眼球内を埋め尽くすようなテラトーマが半数の眼球で形成された。分化した眼様構造の移植では、網膜内層に一層あるいは数層の細胞層を形成し、テラトーマの形成は低くなった。これらの層構造を形成する眼様構造由来の細胞は TuJ1 を発現し、神経への分化が確認されたが、正常な網膜では眼様構造の寄与や分化は非常に限定的であった。網膜神経障害性物質である NMDA を用い、網膜内層、特に神経節細胞を障害したマウスへの移植では、単層構造を形成した眼様構造由来の細胞は未障害時よりも高頻度で TuJ1 陽性の神経へと分化した。数層からなる細胞層を形成した例でも、眼様構造由来の細胞において TuJ1 の発現が観察され、さらに Pax6 や NeuN といった網膜神経節細胞を含む神経マーカーや、より網膜神経節細胞に特異的な Brn3b や Thy1.2 といったマーカータンパクを発現する細胞が観察された。NMDA 障害時には、眼様構造を移植されたほとんどの眼球で網膜神経節細胞層へ層構造を作るように寄与する眼様構造が観察された。

網膜の展開標本では、移植された眼様構造は視神経乳頭付近に観察された。視神経乳頭の周辺では、視神経へ向かって伸びるような GFP 陽性の ES 細胞由来眼様構造の軸索で、TuJ1 の発現も観察された。そこで視覚誘発電位の測定を行った。未障害マウスからは光刺激に対する電位を測定できるが、NMDA 障害後や、つづく媒体のみの移植では視覚誘発電位が失われる。移植 10 日後および 8 週間後においても、これまでのところ、ES 細胞由来眼様構造の移植眼から視覚誘発電位は失われたままであった。

【考察】

in vitro で ES 細胞から分化誘導した眼様構造は、マウスの硝子体腔へ移植すると網膜神経節様の細胞へ分化すること、NMDA 障害された網膜で新たに網膜神経節細胞様の層を形成すること、視神経乳頭に向かって軸索用の神経突起をのばすことが示された。しかしながら、視覚誘発電位の測定により電気生理学的に機能的な回復を評価したところ、視覚誘発電位は測定出来ず、視機能の回復を示す証拠を得るには至っていない。

【結論】

in vitro で分化誘導したマウス ES 細胞由来眼様構造に含まれる網膜神経節様の細胞は、緑内障の治療の対象である視神経乳頭へ軸索様の構造をのばすことを示し、将来的には緑内障の治療のための有益な細胞供給源になりうると思われる。

論文審査の結果の要旨

申請者 青木 仁美は、*in vitro* で ES 細胞から分化誘導した眼様構造が、NMDA 投与により網膜神経節細胞を障害された網膜に対し組織学的には障害部位を再生し、緑内障の治療の対象である視神経乳頭へ軸索様の構造をのばすことを示した。

これらの知見は、現在根本的な治療法のない緑内障の治療に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Transplantation of cells from eye-like structures differentiated from embryonic stem cells *in vitro* and *in vivo* regeneration of retinal ganglion-like cells

Graefes Archive for clinical and Experimental Ophthalmology 246, 255-265 (2008).