

京都大学	博士（医学）	氏名	中野 徳重
論文題目	Self-Formation of Optic Cups and Storable Stratified Neural Retina from Human ESCs (ヒト ES 細胞からの眼杯および保存可能な多層網膜組織の自己組織化)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>幹細胞研究の進展によりヒト胚性幹細胞 (ES 細胞)やヒト人工多能性細胞 (iPS 細胞) から多様な細胞への分化誘導が可能になっているが、一方、シャーレ上で平面的に培養するのみでは生体機能を十分に再現することは困難である。そこで、本研究ではヒト多能性幹細胞から胎生期における眼の原基である眼杯と神経網膜を試験管内で分化させ、生体に近い立体的な組織を作成する技術の確立を目指した。</p> <p>分化誘導には約 9000 個のヒト ES 細胞を分散し、再凝集したものを無血清培地で浮遊培養する SFEBq 法を用いた。眼領域に特異的に発現する転写因子である Rx をコードする遺伝子座に GFP をノックインしたヒト ES 細胞を樹立し、それをレポーター株として分化誘導条件の最適化を実施した。その結果、Wnt シグナルの阻害剤 IWR1-endo を分化誘導 0 日目から 12 日目まで添加し、12 日目から 18 日目まで血清と Shh アゴニスト SAG を添加して培養すると、18 日目には凝集塊の表層に Rx::GFP 陽性の網膜前駆細胞が分化し、特有の上皮構造を形成することが明らかになった。</p> <p>上記の方法で誘導した上皮構造は大部分が神経網膜であった。眼杯は神経網膜と網膜色素上皮より構成されるため、神経網膜に加え網膜色素上皮を共存させる条件検討を行った。その結果、分化誘導 15 日目から 18 日目に GSK3 阻害剤で処理し、Wnt 経路を活性化させると、色素上皮への分化が一定程度惹起されることが明らかとなった。この条件下では袋状に突出した眼杯様の構造が形成された後、続いてその先端部が陥入し、培養 22～26 日目には眼杯様の構造がつけられた。その外側の層は網膜色素上皮に、内側の層は神経網膜に分化し、これらの形成過程は生体内の眼杯発生と酷似していた。また、眼杯様組織は直径約 500 マイクロメートルあり、ヒト初期胎児の眼杯と同様の大きさだった。一方、マウス ES 細胞から誘導した眼杯は約半分の大きさだったことから、それぞれ生体内の大きさを反映していることが示唆された。</p> <p>次に、分化誘導した神経網膜を切り出し、浮遊培養を長期に続けることで、網膜の層構造を形成する各種の細胞への分化について検討した。解析の結果、培養 126 日目には神経節細胞の基底膜側への局在、アマクリン細胞・水平細胞の中間層への局在、視細胞の頂端面への局在等が観察され、発生中期の網膜に酷似した層構造をもった網膜組織を形成することが判明した。胚発生での視細胞の分化は Notch 経路で負に制御されていることが報告されているが、本培養法でも Notch 経路阻害剤である DAPT で網膜組織を処理したところ、視細胞への分化が促進された。</p> <p>幹細胞からの網膜組織の誘導はヒトの発生過程を模倣するように起るため、上述の通り 100 日を越す長期の持続的な培養が必要となる。こうした網膜組織を疾患研究や再生医療に利用する場合、これは大きな制約となりうる。そこで、網膜組織を分化培養過程の中間段階でも保存できるように、急速凍結法 (ガラス化法)の条件確立に取り組んだ。その結果、液体窒素への浸漬前に網膜組織を DMSO、スクロース、エチレングリコールの混合液で前処理することで、組織損傷の少ない網膜組織の凍結保存することに成功した。</p>			

これにより、一定の段階まで分化誘導を進めた網膜組織を作り置いて、凍結保存し、必要に応じて継続培養をすることが可能になった。

以上の結果は、ヒト ES・iPS 細胞から生体の近い立体的なヒト網膜組織を高効率に産生し、保存・供給することを可能にするものであり、再生医療や創薬・安全性研究の推進に貢献することが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、網膜変性疾患に対する再生医療や疾患 iPS 細胞を用いた創薬研究などに利用可能なヒト網膜組織を得るために必要となる、ヒト多能性幹細胞から網膜組織への分化誘導法の確立を目的としたものである。

網膜マーカーである Rx の発現を示標にヒト ES 細胞から網膜への分化誘導法の最適化を実施し、浮遊凝集塊培養と Wnt シグナルの阻害剤および Shh アゴニストの処理を組み合わせることにより、神経網膜組織を高効率に製造する方法を確立した。この培養条件に加えて一時的な Wnt シグナル増強を培養 15 日目から 18 日目にのみ加えることにより、眼の原基である眼杯様の構造をヒト ES 細胞から立体的に形成することに成功した。

さらに、上記の立体網膜組織の 100 日以上長期培養法を確立し、神経節細胞、視細胞等の分化細胞の産生とそれらの層状の配置による多層化組織の形成を可能にした。分化した視細胞には錐体および桿体の両者が混在していた。この系では、分化途中の網膜組織を  $\gamma$ セクレターゼ阻害剤で処理することにより、網膜前駆細胞から視細胞を選択性高く調製可能であることを示した。また、ガラス化法に凍結保護液の前処理を追加することにより、網膜組織を層構造を有した状態で凍結保存する手法を確立した。

以上の研究はヒト多能性幹細胞から網膜組織への分化制御の解明に貢献し、網膜変性疾患に対する再生医療や創薬研究の推進に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 25 年 11 月 20 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降