

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	チューターポーン アサワチャナーノン
論文題目	Transplantation of embryonic and induced pluripotent stem cell-derived 3D retinal sheets into retinal degenerative mice (網膜変性モデルマウスへのES/iPS 細胞由来立体網膜シート移植)		
(論文内容の要旨)			
網膜色素変性は網膜における光受容細胞である視細胞が遺伝的背景により選択的に変性して失われる病態であるが、確立した治療法はない。近年、特定時期の生後マウスの視細胞前駆細胞を移植すると、成体マウスのホスト網膜に移植細胞が生着・成熟して2次ニューロンとシナプスが形成されることが報告された。またそれとは別にES細胞から網膜組織を自己組織化により立体的に分化する系が報告されたことから、分化培養によって得られた視細胞を移植する事により、失われた視細胞を補い網膜の光感受機能を回復出来るのではないかと、いう課題が現実的なものになってきた。しかし、視細胞の層構造を維持しているホスト網膜には移植細胞が機能的に生着することが報告されているものの、実際の臨床で移植治療の適応になるような、視細胞層が失われた末期変性網膜において移植視細胞が生着し機能するという事はまだ報告されていない。 本研究ではマウスES細胞およびiPS細胞を用いて、再現性をもって網膜組織が分化誘導できるか、これらの組織は末期変性網膜下においても移植後分化成熟するか、そしてホスト網膜とシナプスを形成するか、を検討した。 実験には網膜前駆細胞がGFP陽性となるES細胞(RX-GFP)、RX-GFP細胞のROSA遺伝子座にtdTomatoを導入したES細胞、桿体細胞特異的にGFPを発現するNRL-GFPトランスジェニックマウスより作成したiPS細胞の3ラインを用いた。最初に分化条件を最適化し、retinoic acid receptor antagonist (RRA)の添加により、いずれのラインも同じ分化段階を経て効率よく網膜様組織に分化誘導することができた。次に、異なる分化段階の組織を末期変性モデルである6-8週令のrd1マウス網膜下に移植した。移植後の組織を観察すると、分化11日-17日目(胎生期網膜相当)で移植した組織は、有意に視細胞層の構造を維持した状態で生着成熟し、それ以降の分化日数での移植片では層構造を失うものが多かった。層構造を維持した移植組織では外節様構造の形成がみられ、色素上皮上に生着したものでは電顕観察においても生体内視細胞と遜色ない外節形成がみられた。次にホスト網膜への生着パターンを観察すると、1)移植片の内層構造が移植片の視細胞層とホストの内層の間に見られるパターン2)移植片の視細胞層がホスト内層と隣接しているパターン(生体内構造に類似したパターン)、および3)層構造は失われているが移植視細胞がホスト内層に接しているパターン、に分類された。2)のパターンにおいて、立体的な免疫組織学的観察を行うと、移植視細胞内の前シナプスマーカー(CtBP2)とホスト側の双極細胞の軸索末端が接している像が確認され、組織学的にホスト/グラフト間でのシナプス形成が示唆された。また電顕観察においてホスト/グラフト境界領域に特徴的なリボンシナプス構造が認められた。 本研究により、末期網膜変性に対してES/iPS細胞由来の網膜様組織を移植することによる再生治療の可能性が前向きに示唆された。			

(論文審査の結果の要旨) 網膜色素変性などの網膜疾患では視細胞が遺伝的な背景により失われていく。視細胞層構造の保たれたマウス成体のホスト網膜に生後マウスの視細胞前駆細胞を移植すると生着・機能する事が報告されているが、視細胞層が失われた末期変性網膜に視細胞が機能的に生着するか、更にES/iPS細胞から自己組織化分化誘導により得た組織が生着するかを検証した研究はない。 本研究では2ラインのES細胞と1ラインのiPS細胞を用いて既報のプロトコールにretinoic acid receptor antagonist (RRA)を添加し効率的に再現性よく網膜様組織が分化できる事を示した。またこの組織を分化11-17日目の胎生期相当の状態で6-8週令のrd1マウス(末期網膜変性モデル)の網膜に移植すると組織は生後令相当分化組織に比べ有意に視細胞層構造を維持しつつ成熟し、色素上皮では生体内と遜色ない視細胞の外節構造が観察された。またこの移植片は生体内の網膜と同様に視細胞層がしばしばホスト網膜の内層と隣接する形で生着した。このホスト視細胞層/グラフト内層の隣接部位の立体的な免疫組織学的観察より、移植視細胞の前シナプス末端のCtBP2とホスト網膜の双極細胞の軸索末端が接する像が観察され、シナプスの形成が示唆された。この隣接領域を電顕観察すると視細胞と双極細胞の間で特徴的なリボンシナプス構造が見られた。 以上の研究は末期網膜変性に対してES/iPS細胞由来の網膜様組織の移植による再生治療の可能性を前向きに示唆し、現在確立した治療法のない網膜変性に対し新たな治療の開発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 26 年 12 月 3 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、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			