

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	岡本 理志
論文題目	Investigation of retinal regeneration by cell therapy with the induced pluripotent stem cell technology (iPS細胞技術を用いた細胞移植による網膜再生治療の可能性の検討)		
(論文内容の要旨)			
<p>網膜は、光情報を電気信号に変え神経細胞網を介して脳へと送り出す眼の機能の中心的役割を担う組織であり、網膜の障害は視力低下や失明につながる。障害された網膜を再生する選択肢の一つとして細胞移植による再生治療の研究が試みられているが、近年開発された人工多能性幹細胞 (iPS細胞) は、あらゆる細胞への分化能を有し、また患者本人の組織から作製できることから、網膜再生治療においても有望な移植細胞の供給源であると考えられる。</p> <p>そこで本研究では、iPS細胞を用いた網膜細胞移植治療を目指して、iPS細胞から網膜細胞への分化誘導や視細胞移植の検討をおこなった。その結果、サルおよびヒトの皮膚よりiPS細胞作製を経て網膜細胞の誘導に至る培養系を確立し、網膜疾患患者由来iPS細胞を用いた場合には、<i>in vitro</i>で病態を再現でき薬剤評価系としての応用も可能であることを示した。また視細胞移植の検討では、疾患の進行に合わせた適切な移植方法の選択が有効であり、移植された視細胞は、宿主中において機能的に成熟することを示した。</p> <p>本論文の主な内容は以下のとおりである。</p> <p>第1章では、サルおよびヒト由来iPS細胞の作製と網膜細胞への分化誘導を行なった。まず、カニクイザルをモデルとして皮膚由来の線維芽細胞からiPS細胞の樹立と網膜色素上皮 (RPE) 細胞への分化誘導までの連続した培養方法の確立を試みた。まず、カニクイザル皮膚由来の線維芽細胞にレトロウイルスを用いて<i>Oct4</i>, <i>Sox2</i>, <i>Klf4</i>, <i>c-Myc</i>の4遺伝子を導入し、形態的にも性質的にもカニクイザルES細胞と酷似したiPS細胞を得た。続いて、このサルiPS細胞をマウス間葉系細胞株PA6の培養上清を用いて培養することにより、細胞内に褐色の色素を有し、単層上皮様シートを形成するRPE細胞のコロニーを得た。このRPE細胞は継代後においても<i>RPE65</i>や<i>BEST1</i>などのRPE細胞マーカーを発現し、生体内と同様の貪食活性を有することを示した。</p> <p>次に、視細胞の変性疾患である網膜色素変性の患者よりiPS細胞技術を用いて視細胞を作製し、その性質を調べた。まず遺伝子変異が既知である5人の網膜色素変性患者より、レトロウイルスによる遺伝子導入法を用いてiPS細胞を作製した。この患者由来iPS細胞より、まず<i>Dkk1</i>および<i>Lefty-A</i>存在下に神経前駆細胞を誘導し、さらにレチノイン酸およびタウリン存在下に長期培養することで、分化誘導開始より120日目にはいずれの患者由来細胞からも<i>Crx</i>およびロドプシン陽性の視細胞に分化すること</p>			

を認めた。しかし、分化培養120日目と150日目に視細胞数を比較したところ、健常人由来視細胞では細胞数の変化は認められなかったが、患者由来視細胞ではいずれの場合も150日目では細胞数の減少が見られ、患者由来の視細胞が網膜色素変性の病態を再現することがわかった。さらに細胞生物学的な解析を進めたところ、**RP9**に変異をもつ2患者由来の視細胞では、他の患者由来視細胞と比較して酸化ストレスマーカーの発現が高く、またその培養中に抗酸化作用をもつビタミンE ( $\alpha$ -tocopherol) を添加したところ、**RP9**変異をもつ患者由来視細胞のみで視細胞の保護効果が認められた。これらのことから、網膜色素変性患者からiPS細胞作製を経て視細胞を分化誘導する一連の培養系を用いて、オーダーメイド治療薬の*in vitro*スクリーニング系を構築できる可能性が示唆された。

また、従来のレトロウイルスを用いた遺伝子導入によるiPS細胞作製法は、外来遺伝子の染色体への組込みを伴うため、臨床応用を考えた場合、発ガンリスクが懸念される。そこで、外来遺伝子の挿入を必要としないセンダイウイルスを用いて、iPS細胞の樹立および網膜細胞への分化誘導の検討を行なった。その結果、センダイウイルスを用いて作製されたiPS細胞からも、RPE細胞や視細胞などの網膜細胞への分化誘導が可能であり、網膜色素変性患者由来の視細胞ではレトロウイルスを用いた場合と同様に経時的な視細胞数の減少が見られた。また、iPS細胞中に残存する外来遺伝子を調べたところ、継代数依存的に外来遺伝子の減少が見られ、10回継代後ではいずれの細胞株においても検出されなかった。これらのことから、センダイウイルスベクターによる遺伝子導入法が臨床用iPS細胞を樹立する際の選択肢のひとつとなり得ることを示した。

第2章では、視細胞移植法の至適化検討と、移植された視細胞の機能解析を行なった。まず、野生型および視細胞変性モデルマウス (rdマウス) へ視細胞の移植を行なったところ、rdマウスでは移植細胞が効率よくシナプス形成できないことが分かった。この原因としては、rdマウスでは内在的な視細胞死が起こる際にマイクログリアやミュラーグリアの活性化による炎症やグリオーシスが生じており、これらが移植細胞のシナプス形成を妨げている可能性が考えられた。そこで炎症やグリオーシスを抑える薬剤を添加することで、移植細胞の生着率の改善を試みた。その結果から、変性初期のrdマウスへの移植では酢酸グラチマーの投与やバルプロ酸ナトリウムの添加が有効であり、変性後期においてはコンドロイチナーゼABCの添加で移植細胞の生着率が改善されることを示した。以上の結果から、疾患の進行度に合わせた適切な移植方法の選択が有効であることを明らかにした。

次に、カルシウムイメージング法およびパッチクランプ法を用いて、野生型および網膜変性モデルマウスの網膜下に移植された視細胞の生理的な機能の解析を行なった。その結果、移植2週後の視細胞は成体マウス視細胞に見られる内節・外節様の細

胞突起を形成しており、発生途上であった移植前の視細胞よりも成熟視細胞により近い性質を持つことを神経生理学的解析によって示した。これらの結果は、移植された視細胞が宿主の中で機能的に成熟することを示し、視細胞の移植を用いた細胞置換による変性網膜再生治療の合理性を支持するものである。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

網膜の障害は視力低下や失明につながることから、細胞移植による障害網膜の再生研究が試みられているが、近年開発されたiPS細胞は網膜再生治療においても有望な移植細胞の供給源と考えられる。

そこで本研究では、iPS細胞技術を用いた網膜細胞の移植治療を目指して、iPS細胞から網膜細胞への分化誘導や視細胞移植の検討を行なった。その結果、サルおよびヒトの皮膚よりiPS細胞作製を経て網膜細胞の誘導に至る培養方法を確立し、網膜疾患患者由来のiPS細胞を用いた場合に、病態を再現できることを示した。また視細胞移植の検討では、疾患の進行度に合わせた適切な移植方法の選択が有効であり、移植された視細胞は宿主中において機能的に成熟することを示した。

本研究において、評価すべき点は以下の通りである。

1. カニクイザル皮膚より iPS 細胞を作製し、さらにその iPS 細胞から機能的な網膜色素上皮細胞に分化誘導できることを示した。
2. 網膜疾患患者由来の iPS 細胞より分化誘導された視細胞は、経時的な細胞変性をおこし、患者の病態を再現できることを示した。
3. *RP9* 変異をもつ患者由来 iPS 細胞より分化誘導された視細胞の変性に対して、ビタミン E 添加が細胞保護効果をもつことを明らかにし、患者由来 iPS 細胞が *in vitro* 薬剤評価系の構築へと応用可能であることを示した。
4. センダイウイルスを用いて作製された iPS 細胞は、外来遺伝子を保持せず、臨床用 iPS 細胞作製時の選択肢になり得ることを示した。
5. 視細胞変性モデルマウスへの視細胞移植においてはシナプスが効率よく形成されず、これはグリア細胞の活性化がその原因と考えられた。これに対し、酢酸グラチラマーやコンドロイチナーゼ ABC 等の薬剤の添加により時期特異的な改善が認められ、疾患の進行度に合わせた移植方法の選択が有効であることを示した。
6. 移植された視細胞が宿主中において機能的に成熟することを示し、細胞置換による網膜再生治療の合理性を示した。

以上のとおり、本論文は、網膜変性疾患の細胞移植治療や治療薬開発にとって重要な、iPS細胞および分化誘導細胞の培養方法と細胞移植方法の確立に関するものであり、細胞生物学、生理学、生化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成25年2月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。