

41. 視神経乳頭周囲への遺伝子導入

間宮和久、大黒 浩、大黒幾代、目時友美、伊藤 忠、中澤 満
(弘前大)

研究要旨 目的) ニブラジロールは α 、 β 遮断作用による眼圧下降効果に加え、NOを介した神経保護作用を持つ抗緑内障薬である。現在我々は、ニブラジロールが神経保護をもたらす反応経路中の主要酵素であるグアニレートシクラーゼ(GC)の視神経乳頭部における活性を上昇させることでニブラジロールの視神経保護効果を増強させることが可能かどうかを知ることを目的として、GC cDNAを視神経乳頭周囲の神経線維層に導入する新しい試みを考案している。今回そのための前段階として、エレクトロポレーション法(EP)による遺伝子導入法の効果について検討した。方法) GC cDNA(80 μ g)を発現ベクターに組み込みSDラットの硝子体腔に注射した。5分後にEP(10V)を用いて視神経乳頭周囲にGC遺伝子の導入を試みた。その後、導入遺伝子の発現を免疫組織化学的に解析した。一次抗体としてベクターのクローニング部位の3'側に組み込まれたタグペプチドに対する抗体を用いた。結果) 視神経乳頭周囲へ導入されたGC遺伝子の発現がタグペプチドの発現により確認され、本条件下でEPによる視神経乳頭周囲への遺伝子導入が可能であることが示された。考察) 適切な条件設定によりEPを用いた視神経周囲への遺伝子導入は可能であり、今後高眼圧モデルラットに本方法を用いてGC遺伝子を導入し、ニブラジロールの新しい視神経保護増強効果の可能性についてさらに検討する意義が確認された。

A. 研究目的

ニブラジロールは α 、 β 遮断作用による眼圧下降効果に加え、NOを介した神経保護作用を持つ抗緑内障薬である。現在我々は、ニブラジロールなどが神経保護をもたらす反応経路中の主要酵素であるグアニレートシクラーゼ(GC)の視神経乳頭部における活性を上昇させることでニブラジロールの視神経保護効果を増強させることが可能かどうかを知ることを目的として、GC cDNAを視神経乳頭周囲の神経線維層に導入する新しい試みを考案している。今回そのための前段階として、エレクトロポレーション法(EP)による遺伝子導入法の効果

について検討した。

B. 研究方法

GC cDNA(80 μ g)を発現ベクターに組み込みSDラットの硝子体腔に注射した。5分後にcup式電極を用いたEP(10V)により視神経乳頭周囲にGC遺伝子の導入を試みた。その後、導入遺伝子の発現を免疫組織化学的に解析した。一次抗体としてベクターのクローニング部位の3'側に組み込まれたタグペプチドである6XHis tagに対する抗体を用いた。

C. 研究結果

GC cDNAを含む発現ベクターを導入した

1週間後のラット眼における6XHis tagに対する免疫組織化学的検討では、その発現が確認された(図1)。予備実験でもpBK-CMVベクターを用い、同様の実験を行ない、 β -galactosidaseの発現を確認し(data not shown)、EPによる視神経乳頭周囲への遺伝子導入は可能であることが示された。また形態学的にEPにおける網膜への明らかな傷害も認められなかった(図2)。

図1

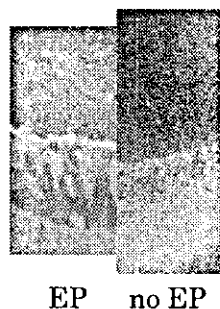
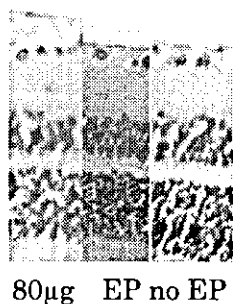


図2



D. 考察

EPによる網膜への遺伝子導入はDezawaら1)により、green fluorescent protein (GFP)を成熟ラットの神経節細胞に有効に導入したと報告されている。今回同様の手技にてラット網膜に外来遺伝子の導入が確認されたことは、本研究で目的としたニプラジロールなどGCを介した視神経保護増強効果の研究に着手するモデルになり得る可能性が示された。しかし、本研究はまだその予備的実験の段階であり、今後、導入効果の判定、外来遺伝子導入により負の

効果(ネガティブフィードバックの有無)の存在についても検討していく予定である。

E. 結論

適切な条件設定によりEPを用いた視神経周囲への遺伝子導入は可能であり、今後高眼圧モデルラットに本方法を用いてGC遺伝子を導入し、ニプラジロールの新しい視神経保護増強効果の可能性についてさらに検討する意義が確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Dezawa M et al: Gene transfer into retinal ganglion cells by in vivo electroporation: a new approach. *Micron*. 33, 1-6, 2002

42. BDNF 導入虹彩色素上皮細胞移植と TrkB サブタイプの発現変化

伊勢屋貴史、阿部俊明、村田裕美、西郷陽子、北条昌芳、斉藤孝恵、涌沢亮介、玉井 信
(東北大)

研究要旨 脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子導入虹彩色素上皮細胞を作製し、この細胞を網膜下に移植することで BDNF レセプターである TrkB の遺伝子発現がどのように変化するかを検討した。網膜内には最低でも TrkB-FL と TrkB-T1 の TrkB レセプターサブタイプの発現があることが判明した。光障害を行うとこの2つのサブタイプは経時的に発現を変化させた。また、AAV-BDNF-IPE の網膜下移植でも2つの TrkB サブタイプの発現率は変化すると考えられた。

A. 研究目的

これまで我々は神経栄養因子遺伝子を導入した細胞移植を行い、視細胞変性の抑制することを報告してきた。種々の神経栄養因子を用いたが、その中でも脳由来神経栄養因子 (BDNF) がもっとも抑制効果が高く、副作用も少ないことがわかった。しかし BDNF の網膜内での作用機序については明らかになっていない。今回は、BDNF のレセプターである TrkB の網膜内での遺伝子発現変化の検討を行った。

B. 研究方法

ラット虹彩色素上皮細胞 (IPE) を分離・培養し、アデノアソシエイトウイルス (AAV) を利用するか、リポフェクション法で BDNF 遺伝子を導入した。AAV を利用する場合は 1×10^{12} caspsides/ml に調整したベクター (AAV-BDNF) を段階希釈したものを IPE に感染させた (AAV-BDNF-IPE)。リポフェクション法の場合はベクターの抗生物質遺伝子を利用して遺伝子導入細胞のみを選択した。AAV-BDNF-IPE とこの細胞を網膜下に移

植した網膜から cDNA を合成して TrkB の発現を real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) 法で定量した。Real-time PCR は TrkB の complete 型 (TrkB-FL) と truncate 型 (TrkB-T1) を別々に定量できるようにプライマーを設定した。

C. 研究結果

正常ラット網膜内の TrkB 遺伝子発現を RT-PCR で調べると TrkB-FL は2つの PCR 増幅産物が確認され、塩基配列を確認するとエクソン 13 の全塩基 36bp が欠損する 278 base pair (bp) と、存在する 314bp であることが確認できた。一方 TrkB-T1 は 278bp すなわちエクソン 13 の 36bp が欠損するタイプのみであった (図1)。

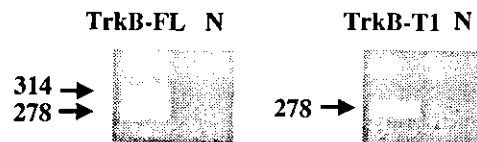


図1 網膜内の TrkB サブタイプの発現

まず AAV-BDNF を IPE に感染させたときの IPE での TrkB 発現状態を調べた。IPE では

ほとんどが T1 タイプであり、AAV-BDNF の感染でも、この 2 つのアイソフォームの発現には大きい変化はないと考えられた (図 2)。この細胞を網膜下に移植すると網膜内では TrkB-FL の発現は減少することが分かった。AAV-LacZ-IPE 移植でも減少するが、AAV-BDNF-IPE 移植でより減少すると推測できた。一方、TrkB-T1 の発現は AAV-BDNF-IPE で増加することが疑われる (図 3)。TrkB-FL と TrkB-T1 の発現量の関係は BDNF のシグナルを細胞内に伝達するのに重要と報告されてきたので、両者の発現量を比で示してみると AAV-BDNF-IPE 移植で網膜内の TrkB-FL と TrkB-T1 の発現の割合が著明に変化すると考えられた (図)。すなわち TrkB-T1/TrkB-FL が著明に増加した。BDNF, Axokine, bFGF 遺伝子をリポフェクション法で導入した網膜色素上皮細胞 (RPE) 移植でも同様に検討したが、BDNF 遺伝子導入 RPE 移植によって TrkB-T1 の発現が多くみられた (図 4)。TrkB-T1 の発現は BDNF 分泌の刺激によるものと推測した。連続光照射後の網膜内の TrkB の発現を RT-PCR で検討すると、通常的环境下では TrkB-FL は 2 つの PCR 増幅産物が確認されるが、光照射後 3 時間をピークに減少傾向を示した。それに対し TrkB-T1 の PCR 増幅産物は発現が持続していると考えられた (図 5)。

D. 考察

BDNF 導入虹彩色素上皮細胞移植と TrkB サブタイプの発現変化を遺伝子発現を中心に検討した。網膜内には TrkB-FL と TrkB-T1 の発現があることが示された。この発現は AAV-BDNF-IPE 移植で変化すると考えられた。BDNF の作用は神経細胞では TrkB-FL に作用

し、そのシグナルは細胞内に存在する Thymidine kinase domain (TK) によりが細胞内に伝わると考えられてきた。TK ドメインを細胞内に持たない TrkB-T1 は TrkB-FL の機能に対し抑制する方向で働くことが考えられてきた。しかし、最近 TrkB-T1 も脳内グリア細胞でシグナル伝達に関与することが報告された。視細胞に発現しない TrkB は網膜内の Muller グリアを含めたほかの細胞にどのような形で発現し BDNF がどのように作用するか興味のあるところである。今後検討したい。

E. 結論

網膜下に AAV-BDNF-IPE を移植すると BDNF のリセプターである TrkB は、その isoform の発現率を変化させる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1. 参考文献

1. Rose CR, et al : Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. : Nature 426:74-78, 2003.

43. BDNF 遺伝子搭載 AAV 感染虹彩色素上皮細胞移植の 視細胞保護効果と BDNF 濃度の関係

齋藤孝恵、阿部俊明、西郷陽子、北條昌芳、村田裕美、伊勢屋貴史、涌澤亮介、玉井 信
(東北大)

研究要旨 アデノアソシエイトウイルスベクター (AAV) に脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子を組み込み、種々の濃度でラット虹彩色素上皮細胞 (IPE) に感染させ、網膜下に移植を行い、光障害に対する視細胞保護効果と BDNF 濃度の関係を検討した。その結果、 1×10^5 capsids/ml 以下になると、視細胞保護効果は AAV2-LacZ-IPE や IPE のみの移植と統計学的に有意差は見られなかった。 1×10^7 capsids/ml 以上になると保護効果が見られた。

A. 研究目的

脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子導入虹彩色素上皮細胞 (BDNF-IPE) 移植の光障害に対する視細胞保護効果と BDNF 濃度の関係を検討する。

B. 研究方法

アデノアソシエイトウイルスベクター (AAV) の最良の血清型の決定するため、血清型 1、2、5、7、8 型の血清 AAV に eGFP 遺伝子を組み込み、human、monkey、rat の IPE に感染させ蛍光顕微鏡で発現を比較した。

培養方法の検討として、IPE を通常プレートと intercell 上で培養し、この両者に BDNF 遺伝子を導入した AAV

(AAV2-BDNF) を感染させた。Real time PCR で BDNF の半定量をおこなった。AAV-BDNF を rat、human の IPE に各々の濃度で感染し、ELISA をおこなった。AAV2-BDNF をヘパリンカラムを利用して精製した。 1×10^{12} capsids/ml に調整した精製ベクターを段階希釈し、それぞれの濃度をラット IPE に感染後の 3、7、10 日後

に細胞活性を MTS で確認した。

さらに段階希釈した AAV2-BDNF を IPE に感染後にラット網膜下に移植し、1 週間の光照射を負荷した。光照射後の視細胞保護効果は視細胞外顆粒層の厚さで比較検討した。

(倫理面への配慮)

動物の取り扱いは Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) で決められた方法に従っておこなった。

C. 研究結果

AAV の血清型の決定

1 型、8 型にはほとんど感染せず、2 型、5 型、7 型の順に発現が多かった (図 1)。

Human、rat、monkey への発現は human が最も良好で、monkey、rat の順であった。

培養方法の決定

通常プレート、intercell とともに、AAV-BDNF 濃度 5×10^{10} capsids/ml が一番多く、 5×10^9 capsids/ml、 5×10^8 capsids/ml に続き、両者ともほぼ差がなかった。

ELISA

上清中の BDNF 量を計算すると、細胞 10^4 個あたりの 1 時間の産生量は Rat

AAV-BDNF 1×10^{11} capsids/ml では約 3.4

9pg、control は 0.38pg、human

AAV-BDNF 1×10^{11} capsids/ml では

22.05pg、control は 0.56pg であった。

細胞活性

AAV2-BDNF はラット IPE がコンフルエントの培養状態で感染させれば細胞活性に影響はなかった。この結果は感染後 3、7、10 日とも同様であった。

IPE 移植の結果

AAV2-BDNF 感染濃度は 1×10^5 capsids/ml

以下になると、視細胞保護効果は

AAV2-LacZ-IPE や IPE のみの移植と統計学的に有意差は見られなかった。

1×10^7 capsids/ml 以上になると保護効果が見られた。

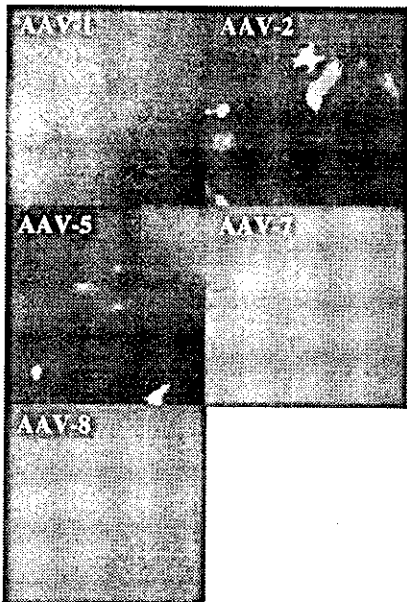


図1 サル IPE への各種血清型 AAV-GFP の感染

D. 考察

AAV2型が human IPE に対し遺伝子の発現が良好なため、今回の検討に用いた。

AAV2-BDNF はラット IPE に感染させる光障害の実験系においては 1×10^9 capsids/ml 前後で最も効果があると推測された。

E. 結論

AAV2-BDNF 感染 IPE 移植は感染 IPE 濃度が少なくとも 1×10^{11} capsids/ml までは感染細胞に毒性は与えない。また、

AAV2-BDNF-IPE が光障害から網膜を保護するには、AAV2-BDNF 濃度が少なくとも 1×10^7 capsids/ml 以上必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Hojo M, et al. Photoreceptor protection by iris pigment epithelial transplantation transduced with AAV-mediated brain-derived neurotrophic factor gene. IOVS. 45:3721-3726, 2004.

44. SIV ベクターを用いた2種類の神経栄養因子遺伝子発現による相乗的視細胞保護効果

宮崎勝徳¹⁾、池田康博¹⁾、米満吉和²⁾、後藤純信³⁾、向野利一郎^{1,2)}、坂本泰二⁴⁾

田畑寿晃⁵⁾、長谷川護⁵⁾、飛松省三³⁾、居石克夫²⁾、石橋達朗¹⁾

(¹⁾九州大、²⁾九州大病理病態学、³⁾九州大神経生理学、⁴⁾鹿児島大、⁵⁾DNAVEC 株式会社)

研究要旨 遺伝性難治性疾患である網膜色素変性に対し、我々は独自に開発したサル由来レンチウイルス (SIV) ベクターを用いた遺伝子治療に取り組み、有効な結果を報告してきた。現在は臨床応用に向けた大動物を対象とする安全性試験を実施中である。今回、より高い治療効果を目指し、2種類の神経栄養因子 PEDF、FGF-2 の同時遺伝子発現による、その相乗的神経保護効果を検討した。疾患モデルである RCS ラットにおいて組織学的・電気生理学的に高い視細胞保護効果が認められ、各々単独投与群と比較して有意な治療効果が得られた。以上から SIV ベクターを用いた PEDF、FGF-2 の両遺伝子発現により得られた相乗的神経保護効果は、より低いベクター濃度でより高い治療効果が得られることを示唆し、安全かつ有効な遺伝子治療として有望な方法論であると考えられた。

A. 研究目的

長期遺伝子発現というレンチウイルスベクターの特性から、緩徐に進行する網膜変性疾患は遺伝子治療のよい対象になると考えられる。我々は、ヒトに病原性を有しないサル由来レンチウイルス (SIV) ベクターを独自に開発し、その眼内導入特性、さらに網膜変性モデルにおける治療効果を報告してきた。さらに現在は臨床応用に向けた大動物 (サル) を対象とする安全性試験を実施しており、急性毒性試験をほぼ終了した段階でその安全性が確認されている。今回より安全でより高い治療効果を目指し、2種類の神経栄養因子 PEDF、FGF-2 の同時遺伝子発現による、その相乗的神経保護効果を検討した。

B. 研究方法

SIV-PEDF、SIV-FGF-2 両ベクターを各々

単独、及び同時投与 (各群とも total 2.5×10^7 TU/ml に調整) にて RCS ラット 3 週齢の網膜下腔に注入し、遺伝子導入を行った。病理組織学的評価を光学顕微鏡的に、電気生理学的機能評価を網膜電図を用いて経時的に検討し、その治療効果を比較した。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験は、九州大学の動物実験施設のガイドラインをふまえ、学内委員会の許可を得ている。DNA 組換え実験・それに準ずる実験は、「大学等における組換え DNA 実験指針」をふまえ、文部科学大臣の承認に加え、学内審査による実験許可を得ている。

C. 研究結果

導入4週間後の検討では、組織学的に各々

単独群において視細胞核が有意に残存しており、さらに同時投与群ではより高い視細胞保護効果が得られた。電気生理学的には、ERG 波形における a,b 波の振幅が、単独群に比較して同時投与群で有意に高く認められた。観察期間を通じて、局所炎症・網膜変性・血管新生等の合併症は認められなかった。

D. E. 考察・結論

SIV ベクターを用いた PEDF、FGF-2 の両遺伝子発現により得られた相乗的神経保護効果は、より低いベクター濃度でより高い治療効果が得られることを示唆し、網膜変性疾患における安全かつ有効な遺伝子治療として有望な方法論であると考えられた。現在感染宿主であるサルを対象とした安全性試験を実施中であり、SIV ベクターの高いポテンシャルを臨床の場に還元し、眼科領域における日本独自の遺伝子治療の確立を目指している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1. 参考文献

1. Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y, Sakamoto T, Tabata T, Ueda Y, Hasegawa M, Tobimatsu S, Ishibashi T, Sueishi K. Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor protects retinal degeneration and electrical defect in Royal College of Surgeons rats. Gene Ther. Aug 10(17):1503-1511, 2003

45. 変性網膜下への網膜前駆細胞移植におけるコンドロイチナーゼの影響

鈴木拓也¹⁾、秋元正行²⁾、横田友子²⁾、万代道子²⁾、高橋政代²⁾、吉村長久¹⁾

(¹⁾京都大、²⁾京都大探索医療センター)

研究要旨 視細胞変性網膜への細胞移植においては、移植自体の侵襲及び視細胞変性に伴う宿主網膜の環境、特にグリアの性状変化が、移植成功の妨げの主要因と考えられている。脊髄などの中枢神経では、*chondroitinase ABC* (ChABC) が、中枢神経損傷時に生じるグリア癒痕部細胞外マトリックスの成分であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを、分解、減少させ、損傷ニューロンの機能的再生に寄与することが分かっている。そこで我々は、視細胞変性網膜下に移植細胞とともに ChABC を移植しその影響を調べた。移植4週間後、移植された視細胞は、両群とも宿主網膜の本来の視細胞層で生着していた。ChABC 投与群では、生着細胞の一部で、突起が変性網膜のグリア癒痕部を越え網膜内に達し、宿主網膜とシナプス形成している可能性が免疫組織化学的に示唆された。ChABC 非投与群ではこれらの現象は確認し難かった。コンドロイチナーゼは、移植細胞の宿主網膜内への突起伸長とシナプス形成を促進する可能性があると考えられた。

A. 研究目的

マウス変性網膜へ移植した *Neural retina leucine zipper* (*Nrl*) 視細胞(前駆細胞)に対する ChABC の影響を検討した。

B. 研究方法

移植細胞は、*Nrl transgenic* マウスより、視細胞のみが GFP で識別できる新生 *Nrl-GFP* マウスの網膜細胞(網膜前駆細胞)を取り、パイン処理した。宿主には、視細胞変性モデルの一つである、*N-methyl-N-nitrosourea* (MNU) 腹腔内投与成体マウスを用いた。移植は、ChABC 同時投与群と非投与群に分け、網膜下に経強膜的に移植した。移植後4週間で免疫組織化学的手法等を用いて比較検討した。

C. 研究結果

移植4週間後、*Nrl-GFP* 陽性視細胞は宿主網

膜の本来の視細胞層で生着していた。生着細胞の一部は宿主網膜に向けて突起をのびしており、ChABC 投与群でこの傾向が強かった。これらの突起は、ChABC 投与群では、変性網膜下のグリア癒痕部位を越え網膜内顆粒層に達していた。さらに抗シナプス蛋白抗体と GFP の共染が確認でき、宿主網膜細胞とのシナプス形成が示唆された。ChABC 非投与群ではこれらの現象は確認し難かった。

D. 考察

ChABC 投与群では、移植後早期の段階で、宿主網膜のグリア癒痕部位でのコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの発現が低下しており、このことが、移植細胞の宿主網膜内への突起伸長、シナプス形成へとつながっていると考えられた。

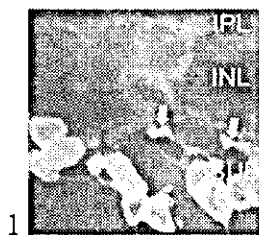


図1 移植4週間後の二重染色像。ChABC群のNrl-GFP視細胞(緑)、VgluT1(赤)、共染(黄、矢印)。

I. 参考文献

1. Kinouchi R, et al. Nat. Neurosci. 6 863-868, 2003.
2. Bradbury EJ, et al. Nature. 416 636-640, 2002.

E. 結論

コンドロイチナーゼは、移植細胞の宿主網膜内への突起伸長とシナプス形成を促進する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. T.Suzuki, S.Ooto, T.Akagi, K.Amemiya, M.Haruta, M.Mandai, M.Takahashi.: Short-term Course of Retinal Pigment Epithelial Sheets Transplanted into Monkey Retina. ARVO meeting 2004.5 (Florida)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



網膜幹細胞の臨床と基礎—最近の話題

—Recent research on retinal stem cells
—from basic and clinical aspects—

高橋 政代*

I. はじめに

幹細胞の中にはES細胞のように、あらゆる臓器の細胞となる万能細胞と呼ばれるものから、造血幹細胞や神経幹細胞のように多分化能を持つもの、ある種類の細胞にしか分化しない単分化能の幹細胞などがある。

幹細胞の選別は難しいが、多くの多分化能幹細胞がATP binding cassette (ABC) transporter 蛋白を持ち、Hoechst 33342 という蛍光色素を細胞内から排出する機能を有することがわかっている (ABC transporter の幹細胞における役割はまだわかっていない)。この性質を利用してセルソーターで低蛍光の細胞を集めることにより、ある程度幹細胞の純度を高めることができる¹⁾。一方、筋肉、皮膚、腸粘膜の幹細胞などはそういったマーカーとなる蛋白を持たず、その存在位置から幹細胞だと考えられている。肝臓や膵臓では成体での組織の再生に幹細胞が関与しているかどうかはまだ不明である。幹細胞の研究は加速度的に進んでいるが、それでも他の分野に比べるとまだ初歩的なことしか解明されていない。

II. 幹細胞研究の流れ

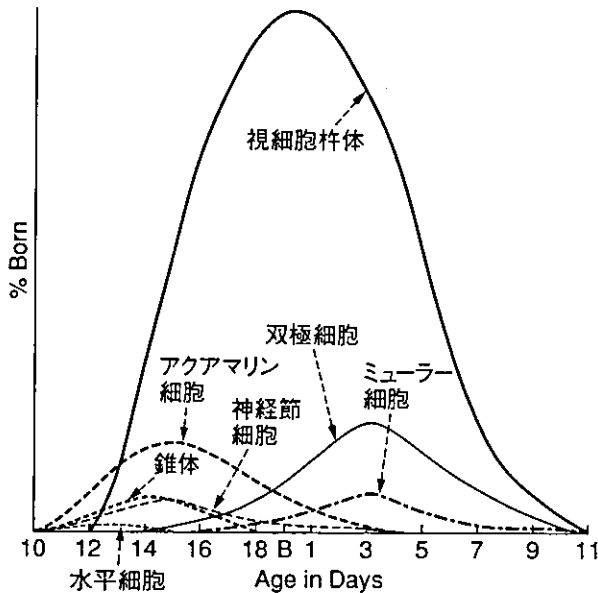
1990年代半ば、カナダのWeissらのグループが成体脳からの神経幹細胞の培養に成功し、アメリカのGageの研究室では別の方法で海馬由来神経幹細胞の培養が始まっていた。初めは、Gageの研究室でも培養された細胞が神経幹細胞であるという保証はなく、まずは培養された細胞が幹細胞であるという証明から始まった。中枢神経のどこからとった幹細胞でも同じ形態、性質を示したし、また幹細胞を採取した部位と異なる部位に移植すると、移植場所に特異的な神経細胞に分化したという報告がいくつか出たために、その頃には神経幹細胞は部位による特異性はあまりないと考えられていた。そこで、筆者らは脳の幹細胞を網膜に移植したが、いくら完璧な網膜神経の形態に分化しても網膜神経のマーカーとなる蛋白を発現しなかった²⁾。

一方、1990年代の終わりには神経幹細胞から血球が分化したり³⁾、あるいは逆に造血幹細胞から神経が分化したり⁴⁾という論文があいついで発表され、幹細胞の可塑性ということが大変注目された。もし、これらが本当であれば、容易にしかも大量に得られる種類の幹細胞を利用して、さまざまな臓器の治療に使える可能性がある。しかし、造血幹細胞から胚葉を超えて神経が作られるなら、脳の幹細胞から網膜を作ることなど容易なはずであり腑に落ちない点があった。

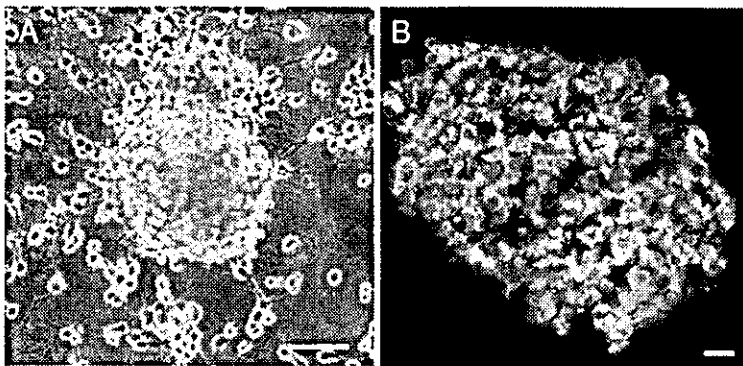
最近では、これら成体の組織幹細胞の分化転

* Masayo TAKAHASHI 京都大学医学部附属病院
探索医療センター開発部、助教授

Key words: 幹細胞, 網膜色素上皮, 視細胞, Stem cell,
retinal pigment epithelial cells, photoreceptors



第1図 網膜発生時期と生まれる細胞種の関係 (文献2) から改変)



第2図 胎仔網膜由来 neurosphere
A: 位相差像, B: neurosphere 断面。殆どの細胞がネスチン陽性未分化細胞である (文献6) から引用。

換といわれる現象の多くは、移植された幹細胞自身が別の組織の細胞に分化したわけではなく、実は組織に残っていた幹細胞や脱分化した細胞から組織が再生されていたり、あるいは移植細胞と組織に存在する細胞が細胞融合を起こしていて、もともとその組織にある細胞が移植細胞のマーカーを発現しているだけであるということがわかってきた⁴⁾。現在はどこまでが本当の幹細胞の可塑性なのかということの見直しが行われている。細胞融合は細胞移植でなくても生理的な状態でも体内で起こっていることが証明

され、もともと組織の修復に関与していると考えている研究者もいるが、その頻度があまりに低いことから、現在のところ機能を再生させるほどの効果は期待できない。

III. 胎仔網膜由来幹細胞

1987年 Cepko らは、胎仔網膜で1個の細胞からその後に分化する細胞の種類を調べた。その結果、1個の細胞から分裂した細胞が細胞網膜を形作るすべての細胞、すなわち、ミュラーグリアと視細胞を含むすべての網膜神経細胞になることが判明した⁶⁾。こうして、網膜グリアとすべての網膜神経細胞が共通の幹細胞を持っていることがわかったのである (ただし、発生

の時期で分化する細胞の種類はかぎられている⁷⁾ (第1図)。また、網膜内アストロサイトについては視神経を介して網膜内に遊走してきたと考えられている⁸⁾。

脳の神経幹細胞培養と同様の方法を用いて胎仔網膜由来の幹細胞を培養することが可能である。Neurosphere という神経幹/前駆細胞から分裂増殖した細胞塊として培養する方法である (第2図)。ただし、Neurosphere 中の多数の細胞のうち何個かは自己複製能を持つ幹細胞で

あるが、その他の殆どの細胞は幹細胞から分化系譜にはいった前駆細胞あるいはかなり分化した細胞である。このことは neurosphere を形成する細胞のうちの3.6%のみが幹細胞で、他は神経前駆細胞であると報告された脳由来神経幹細胞と同様であろう⁹⁾。

また、胎仔網膜細胞の中から網膜幹 (前駆) 細胞を分離する試みは、前述の Hoechst 33342 を用いて cell sorting する方法を用いて Bhat-tacharya らによって報告された¹⁰⁾。

これらの方法を用いて得られた幹細胞は脳か

ら得られる神経幹細胞と異なり、分化誘導によって視細胞を含む網膜神経細胞に分化することができる。由来部位によって神経幹細胞の性質が異なることの顕著な例である。

筆者らは、胎児由来神経幹細胞を neurosphere 法 (cell sorting による純化は行っていない) で培養、継代し、視細胞への分化を調べた。その結果、3 回継代程度の neurosphere からは視細胞が多数分化してくるが、10 回以上も継代した後には視細胞の分化は見られなくなった¹¹⁾。また、ヒト胎児網膜からも神経前駆細胞は得られたが、分裂が遅く実験に十分な量の細胞を得るまでに要する培養期間がラットに比べ長いから、視細胞の分化は筆者らの方法では得られなかった (未発表データ)。これらの結果にはいくつかの理由が考えられる。1 つは、もともと neurosphere はさまざまな分化段階の細胞の集合であるので、培養早期には視細胞の前駆細胞が混在しており視細胞がたくさん分化してくる。しかし、培養を続けると視細胞の前駆細胞が全部分化を終えるので、視細胞が生まれてこない neurosphere となるという可能性がある。あるいは、bFGF を加えて培養を続けると bFGF により細胞がより未分化な状態になり、網膜細胞という組織特異性を失うということも考えられる。また、遺伝子レベルで考えると、例えば Taga らが報告しているように、発生が進むにつれ、あるいは培養を続けることによって、神経幹細胞の GFAP プロモーター領域の STAT3 結合部位のメチレーションが解除されグリアに分化するようになる¹²⁾、という結果と似たような現象から説明がつくかもしれない。

IV. 成体由来網膜幹細胞

成体は乳類脳からの神経幹細胞を未分化なままで培養することに成功したのが、1990 年代前半 Weiss らのグループである¹³⁾。網膜にお

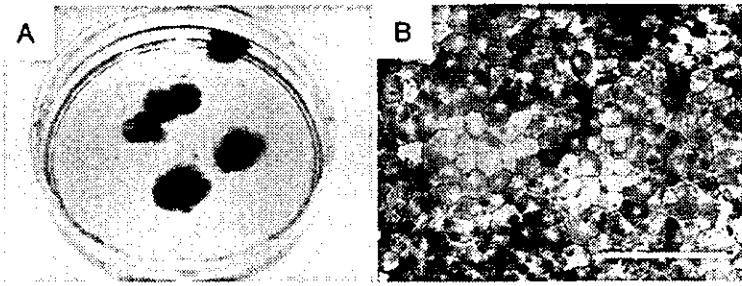


第3図 虹彩由来ロドプシン陽性細胞
成体ラット虹彩培養細胞に *Crx* 遺伝子を導入した。遺伝子が導入されていない細胞 (左半分) は細長くロドプシン陰性であるのに対し、導入された細胞 (右半分) はほぼすべての細胞が小型でロドプシン陽性の細胞となる。青: DAPI による核染色, 緑: ロドプシン染色 (日本再生医療学会雑誌, 3:91 から引用)。

いては Weiss らの開発した neurosphere 法を用いて、2000 年に Van der Kooy らのグループが成体マウスの毛様体上皮細胞に neurosphere を形成する網膜幹細胞が存在することを報告した¹⁴⁾。成体毛様体上皮細胞由来の網膜幹細胞は、胎仔網膜由来幹細胞と同様に分化誘導によって視細胞を含む多種類の網膜細胞に分化させることが可能である。ただし、その分化の割合は非常に低く、やはりそのままでは移植に使える量ではない。

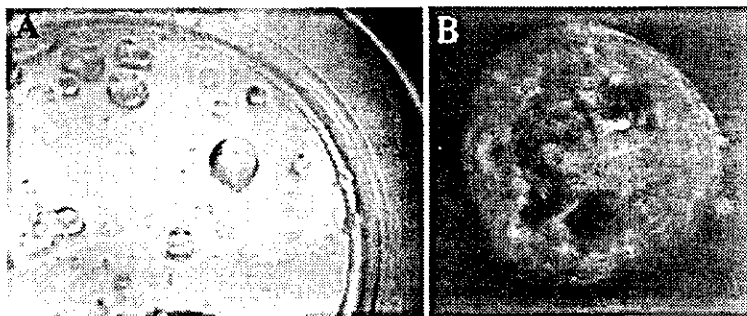
一方、筆者らは成体ラットの虹彩細胞に注目し、神経への分化を検討した¹⁵⁾。虹彩上皮細胞は発生学的に神経管由来の眼杯の内層から分化する。つまり、神経網膜や毛様体上皮と同じ発生起源を持つのである。

成体ラットから取り出した虹彩細胞を神経幹細胞と同様の条件で培養すると、色素を持った細胞が増殖してくる。数日間の分裂で色素細胞は徐々に色素を失い、nestin 陽性の未熟な細胞となる。その細胞を今度は分化誘導条件で培養



第4図 サル ES 細胞由来網膜色素上皮細胞

A: 10 cm ディッシュの中の網膜色素上皮。B: 拡大写真。ほぼ均一な敷石状の形状を示している。色素は薄い細胞と濃い細胞が混在している (文献 20) から引用。



第5図 サル ES 細胞由来水晶体細胞様組織

A: 10 cm ディッシュの中の水晶体様細胞。周りの細胞に比べ透明度が高い。B: 拡大像。αクリスタリン陽性 (文献 19) から引用。

すると、200 K neurofilament 陽性の神経や GFAP 陽性のグリア細胞が分化してくる。しかし、視細胞のマーカーであるロドプシン陽性細胞はなかった。

そこで、Furukawa らが発見した視細胞の分化に重要な役割を果たすホメオボックス遺伝子 *Crx*¹⁶ を、レトロウイルスを用いて分裂している虹彩細胞に導入したところ、*Crx* 導入細胞は殆どがロドプシン陽性となり、細胞形態も平坦で大型の虹彩細胞から小型で球形の細胞に変化した。さらに、さまざまな視細胞特異蛋白の mRNA を RT-PCR で確認したところ、調べたすべての蛋白 (7 種類) の mRNA を確認でき、電気生理学的にも光刺激に対して視細胞様反応を示したことから、かなり視細胞に近い機能を持つ細胞になったと考えている (投稿中)。また、遺伝子を導入した虹彩細胞は 98% がロド

プシン陽性となることから、自家移植であれば量的にも条件を満たすと思われる。問題は遺伝子を導入することの危険性である。現在までに遺伝子導入による腫瘍化などの変化は観察していないが、レトロウイルスで導入する限り random integration による危険性が残る。今後、遺伝子導入の方法、あるいは遺伝子導入によらない方法を開発する必要がある。

V. ES 細胞

ES 細胞はあらゆる種類の細胞を生み出すことができる細胞であり、当然網膜幹細胞にも分化するはずである。実際、Kunisada らのグループはマウス ES 細胞からレンズ、網膜色素上皮細胞、網膜神経細胞のすべてをつくり出すことに成功している¹⁷⁾。

筆者らは、中辻らが樹立したサル ES 細胞を笹井らの開発した SDIA 法 (stromal derived inducing activity: マウス PA 6 細胞との共培養) を用いて培養すると、網膜色素上皮細胞 (第 4 図) と水晶体細胞 (第 5 図) が分化してくることを報告し¹⁸⁾¹⁹⁾、網膜色素上皮細胞については移植後 *in vivo* で機能することを確認した²⁰⁾。

網膜色素上皮細胞に関しては、ES 細胞由来細胞の欠点である未分化細胞の混在という問題は解決されているように見える。すなわち、SDIA 法において、PA 6 と ES 細胞をフィルターで分離し、接着しない状態で分化させ、色素を発現ようになった細胞 (細胞塊) のみを直視下にピックアップして分裂増殖させる。得られた細胞シートは観察するかぎり、一様な敷石状の形態を示し、今までに 1 年以上の *in vitro*、*in vivo* の観察でも腫瘍の形成を認めない。

ただし、この方法でも分化の最初の過程でマウス細胞から分泌された物質を必要とするために異種蛋白が寄与しているわけである。異種の feeder 細胞をまったく必要としない方法を開発する必要がある。

一方、網膜神経細胞の移植源としては、未だ発展段階である。視細胞に分化させることはできるであろうが、選別して移植するだけの量が得られていない。今後、効率よく網膜幹細胞を分化誘導する方法が必要である。

VI. 臨床応用

既に幹細胞を臨床に応用しているのは、古くから研究されている血液疾患、口腔外科的疾患そして角膜である。血管を新生させるために骨髓細胞を移植することは、最近の進歩であり、動脈閉塞症の下肢に対して行われ、さらに心筋梗塞後の心臓血管にも行われている。臨床応用ではないが、2002年、網膜でも骨髓細胞を移植すると移植細胞が網膜内に侵入し、必要な場合に血管を形成することが報告され話題を集めた²¹⁾。

再生医療の場合、障害された細胞を移植細胞で置き換えるという概念の治療で要するのは分化した細胞あるいは最終分化する前の前駆細胞であり、幹細胞ではない。多分化能を持つ幹細胞を移植すれば、必要としない細胞が多数移植されることになり、腫瘍を形成する恐れも高い。つまり幹細胞を大量に得ても、必要とする細胞への分化頻度が低ければ使えない。幹細胞からいかに必要とする細胞を純度高く十分量得るかということが最大のポイントとなる。網膜色素上皮細胞については、筆者らを含めいくつかのグループが材料をそろえ、加工の段階に入っているが、視細胞に関してはまだこの点が克服されていない。

ただし、一方で、純化されていない神経幹細胞や骨髄間質細胞の移植で脊髄損傷の症状が軽

快するという結果も出ている。これらは幹細胞から分泌される細胞の栄養因子によって細胞のダメージを軽減したり、回復を促進するためと思われる。このような DDS (drug delivery system) としての働きをねらうという方法も幹細胞移植では考えられる。

いずれにしても、幹細胞という概念と培養法が確立されたことは、あらゆる臓器の分野で再生医療への期待を生んでおり、幹細胞の研究は多くの研究者が参入している分野である。今後、眼科医である利点を生かした幹細胞の利用研究を押し進めることが望まれる。

文 献

- 1) Alison MR: Tissue-based stem cells: ABC transporter proteins take centre stage. *J Pathol* 200: 547~550, 2003
- 2) Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J et al: Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol Cell Neurosci* 12: 340~348, 1998
- 3) Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA et al: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283: 534~537, 1999
- 4) Mezey E, Chandross KJ et al: Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290: 1779~1782, 2000
- 5) Amy JW, Irving LW: Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell* 116: 639~648, 2004
- 6) Turner DL, Cepko CL: A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328: 131~136, 1987
- 7) Cepko CL, Austin CP, Yang X et al: Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 589~595, 1996
- 8) Ling TL, Mitrofanis J, Stone J: Origin of

- retinal astrocytes in the rat : evidence of migration from the optic nerve. *J Comp Neurol* 286 : 345~352, 1989
- 9) Kim M, Morshead CM : Distinct populations of forebrain neural stem and progenitor cells can be isolated using side-population analysis. *J Neurosci* 23 : 10703~10709, 2003
- 10) Bhattacharya S, Jackson JD, Das AV et al : Direct identification and enrichment of retinal stem cells/progenitors by Hoechst dye efflux assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 2764~2773, 2003
- 11) Akagi T, Haruta M, Akita J et al : Different characteristics of rat retinal progenitor cells from different culture periods. *Neurosci Lett* 341 : 213~216, 2003
- 12) Takizawa T, Nakashima K, Namihira M et al : DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell* 1 : 749~758, 2001
- 13) Reynolds BA, Weiss S : Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255 : 1707~1710, 1992
- 14) Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ et al : Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287 : 2032~2036, 2000
- 15) Haruta M, Kosaka M, Kanegae Y et al : Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nat Neurosci* 4 : 1163~1164, 2001
- 16) Furukawa T, Morrow EM, Cepko CL : *Crx*, a novel *otx*-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91 : 531~541, 1997
- 17) Hirano M, Yamamoto A, Yoshimura N et al : Generation of structures formed by lens and retinal cells differentiating from embryonic stem cells. *Dev Dyn* 228 : 664~671, 2003
- 18) Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K et al : Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 1580~1585, 2002
- 19) Ooto S, Haruta M, Honda Y et al : Induction of the differentiation of lentoids from primate embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 2689~2693, 2003
- 20) Haruta M, Sasai Y, Kawasaki H et al : In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 1021~1025, 2004
- 21) Otani A, Kinder K, Ewalt K et al : Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. *Nat Med* 8 : 1004~1010, 2002

*

*

In Vitro and In Vivo Characterization of Pigment Epithelial Cells Differentiated from Primate Embryonic Stem Cells

Masatoshi Haruta,^{1,2} Yoshiki Sasai,^{3,4} Hiroshi Kawasaki,⁴ Kaori Amemiya,² Sotaro Ooto,² Masaaki Kitada,⁵ Hirofumi Suemori,^{6,7} Norio Nakatsuji,^{6,7} Chizuka Ide,⁵ Yoshihito Honda,² and Masayo Takahashi^{1,2}

PURPOSE. To determine whether primate embryonic stem (ES) cell-derived pigment epithelial cells (ESPEs) have the properties and functions of retinal pigment epithelial (RPE) cells in vitro and in vivo.

METHODS. Cynomolgus monkey ES cells were induced to differentiate into pigment epithelial cells by coculturing them with PA6 stromal cells in a differentiating medium. The expanded, single-layer ESPEs were examined by light and electron microscopy. The expression of standard RPE markers by the ESPEs was determined by RT-PCR, Western blot, and immunocytochemical analyses. The ESPEs were transplanted into the subretinal space of 4-week-old Royal College of Surgeons (RCS) rats, and the eyes were analyzed immunohistochemically at 8 weeks after grafting. The effect of the ESPE graft on the visual function of RCS rats was estimated by optokinetic reflex.

RESULTS. The expanded ESPEs were hexagonal and contained significant amounts of pigment. The ESPEs expressed typical RPE markers: ZO-1, RPE65, CRALBP, and Mertk. They had extensive microvilli and were able to phagocytose latex beads. When transplanted into the subretinal space of RCS rats, the grafted ESPEs enhanced the survival of the host photoreceptors. The effects of the transplanted ESPEs were confirmed by histologic analyses and behavioral tests.

CONCLUSIONS. The ESPEs had morphologic and physiological properties of normal RPE cells, and these findings suggest that

these cells may provide an unlimited source of primate cells to be used for the study of pathogenesis, drug development, and cell-replacement therapy in eyes with retinal degenerative diseases due to primary RPE dysfunction. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:1020-1025) DOI:10.1167/iovs.03-1034

The retinal pigment epithelium (RPE) forms a single layer of highly specialized pigmented cells located distal to the photoreceptor cells that performs critical functions in the maintenance of the physiology of the photoreceptors. These functions include the absorption of stray light by its melanin granules, formation of the blood-retinal barrier, regeneration of visual pigments, and phagocytosis of shed outer segments of photoreceptors.¹ RPE cell dysfunction caused by environmental and/or genetic mutations can lead to ocular diseases such as age-related macular degeneration and some forms of retinitis pigmentosa. At present, transplantation of the fetal RPE cells is performed in eyes with ocular diseases with primary RPE dysfunction²; however, obtaining a sufficient number of suitable donor cells remains a problem.

Embryonic stem (ES) cells retain significant developmental potential and replicative capability and are expected to alleviate the problem of the shortage of donor cells for cell-replacement therapy. The isolation and use of human ES cells^{3,4} has drawn much attention because of their potential clinical applications in patients with degenerative diseases. However, the use of human ES cells for cell-replacement therapy is questionable at the moment because their differentiation is poorly controlled. Compared with the extensive potential demonstrated by mouse ES cells,^{5,6} there is no reported case showing that primate ES cells can be successfully applied to animal disease models. As the characteristics of rodent ES cells differ considerably from those of primate ES cells,^{3,4,7,8} it is necessary to develop methods to induce primate ES cells to differentiate into a homogeneous population of functional cells that can be used for cell-replacement therapy.

The purpose of the study was to determine whether primate embryonic stem-cell-derived pigment epithelial cells (ESPEs) develop the well-known characteristics of RPE cells and have functional properties that would be of value in treating diseases when transplanted in an animal model of RPE dysfunction.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

A cynomolgus monkey ES cell line was obtained from Asahi Techno Glass Co. (Tokyo, Japan), and the undifferentiated ES cells were maintained as described.⁸ The methods used to induce undifferentiated ES cells to differentiate into ESPEs have been described in detail.⁹⁻¹² In brief, undifferentiated primate ES cells were plated on PA6 stromal cells and cultured in the differentiation medium for 3 weeks. For the expansion of ESPEs, the dishes were coated with thin synthetic matrix

From the ¹Department of Experimental Therapeutics, Translational Research Center, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan; the Departments of ²Ophthalmology and Visual Sciences and ³Anatomy and Neurobiology, Graduate School of Medicine, and the Departments of ⁴Medical Embryology and Neurobiology and ⁶Development and Differentiation and the ⁷Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan; and the ⁵Organogenesis and Neurogenesis Group, Center for Developmental Biology, RIKEN, Kobe, Japan.

Supported by a Grant-in-Aid for the Advanced and Innovative Research Program in Life Sciences (MT), Scientific Research on Priority Areas (C) Advanced Brain Science Project (MT), Scientific Research on Priority Areas (C) (MH), the Organization of Pharmaceutical Safety and Research (YS), and the Japan Society for the Promotion of Science (NN), from Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

Submitted for publication September 20, 2003; revised November 8 and 28, 2003; accepted December 3, 2003.

Disclosure: M. Haruta, None; Y. Sasai, None; H. Kawasaki, None; K. Amemiya, None; S. Ooto, None; M. Kitada, None; H. Suemori, None; N. Nakatsuji, None; C. Ide, None; Y. Honda, None; M. Takahashi, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Masayo Takahashi, Department of Experimental Therapeutics, Translational Research Center, Kyoto University Hospital, Kyoto 606-8507, Japan; masataka@kuhp.kyoto-u.ac.jp.

(dilution of 1:20; Matrigel) according to the manufacturer's protocol (BD Biosciences, Bedford, MA). The ESPEs were selectively removed with disposable scalpels and plated on the matrix-coated dishes in DMEM supplemented with 10% FBS and 20 ng/mL bFGF.

RT-PCR Analysis

Total RNA was isolated (RNeasy Protect Mini Kit with RNase-Free DNase Set; Qiagen, Chatsworth, CA) and first-strand cDNA was synthesized (First-Strand cDNA Synthesis Kit; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) according to the manufacturer's protocol. The PCR reaction was performed with the following primers: for RPE65, 5'-TG-GAGTCTTTGGGGAGCCAA-3' and 5'-CTCACCACCACACTCAGAAC-3'; for cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP), 5'-GTGGACAT-GCTCCAGGATTC-3' and 5'-CCAAAGAGCTGCTCAGCAAC-3'; for Merk, 5'-GGGAGATCGAGGAGTTTCTC-3' and 5'-CGGCCTTGGCGG-TAATAATC-3'; for β -actin, 5'-CTTCAACACCCAGCCATGT-3' and 5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'.

Western Blot Analysis

Western Blot Analysis was performed as described.¹¹ Rabbit polyclonal anti-CRALBP antibody (1:40,000, kindly provided by John C. Saari, University of Washington, Seattle, WA) was used as the primary antibody.

Animals

All animal experiments were conducted in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and were approved by the Animal Research Committee, Graduate School of Medicine, Kyoto University. Pink-eyed dystrophic Royal College of Surgeons (RCS) rats and congenic nondystrophic rats were obtained from CLEA Japan (Tokyo, Japan).

Transplantation Procedures

Patches of ESPEs were collected by carefully cutting the peripheral margins with disposable scalpels. The patches of ESPEs were gently dissociated with the Papain Dissociation System (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) according to the manufacturer's protocol. Dissociated ESPEs were incubated in the CM-Dil (chloromethylbenzamide derivatives of 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes, Eugene, OR) solution at a concentration of 5 μ g/mL for 20 minutes at 37°C. Labeled ESPEs were then washed three times with PBS. The viability of the ESPEs after these procedures was more than 95%, as assessed by trypan blue exclusion. The cells were centrifuged and then concentrated to approximately 10,000 cells/ μ L in PBS.

The surgical and grafting procedures have been described in detail.^{13,14} ESPE cells, suspended in 3 μ L of PBS, were injected transclerally into the dorsotemporal subretinal space of anesthetized 4-week-old RCS rats. All transplantations were made into the left eye. Sham-treated RCS rats received the same amount of carrier medium. A total of 41 RCS rats received ESPE grafts, and 21 had sham injection. Transplantation into the subretinal space was confirmed by direct observation of the rat fundus with a contact lens (Kyocon, Kyoto, Japan), and those that had successful transplantation were selected for histologic analyses and behavioral tests. All the animals were maintained on oral cyclosporine (200 mg/L in drinking water; Calbiochem, Darmstadt, Germany) from 2 days before transplantation until they were killed. The blood cyclosporine levels in these animals were measured by SRL Inc. (Tokyo, Japan).

Immunostaining

Standard immunocytochemical techniques were used for the *in vitro* studies.¹⁵ The working dilution of the rabbit polyclonal anti-ZO-1 antibody (Zymed, South San Francisco, CA) was 1:50. Eyes ($n = 4$ for each group) were harvested 8 weeks after transplantation at age 12 weeks and fixed in 4% paraformaldehyde. Sixteen-micrometer sections

were cut with a cryostat, stained, and processed for light or transmission electron microscopy as described.¹⁶

The working dilution of the mouse monoclonal anti-rhodopsin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was 1:2000. The nuclei were stained with Cytos blue (1:500 in distilled water; Molecular Probes) and the specimens were observed and photographed with a laser-scanning confocal microscopy (TCS SP2; Leica, Heidelberg, Germany). The maximum thickness of the outer nuclear layer (ONL) in the dorsotemporal and ventronasal retina ($n = 4$ animals for each group) was measured, and the differences were analyzed with the Mann-Whitney test.

Transmission Electron Microscopy and Phagocytosis of Latex Beads

ESPEs grown on 60 mm synthetic-matrix-coated dishes (Matrigel; BD Biosciences) were processed for transmission electron microscopy as described.¹⁶ To examine phagocytotic ability,¹⁷ the ESPEs were incubated with 1- μ m latex beads (Sigma-Aldrich) at a concentration of 1.0×10^9 beads/mL for 6 hours at 37°C. The ESPEs were washed five times with PBS and then processed for transmission electron microscopy.

Behavioral Assessment

For behavioral assessment, a head-tracking apparatus (Hayashi Seisakusho, Kyoto, Japan) that consisted of a circular drum rotating around a stationary holding chamber containing the animal was used.¹³ The speed of rotation of the drum with vertical black-and-white stripes (10° each) was set at 2, 4, and 8 rpm. Animals ($n = 4$ animals for each group) were tested at 8 weeks after transplantation at 12 weeks of age before they were killed. A video camera mounted above the apparatus recorded the head movements. The total amount of head-tracking time was determined at speeds of 2, 4, and 8 rpm during a 4-minute test period for each speed. A single operator, masked to the type of animals being tested, conducted all assessments, and the code was broken after the completion of all data acquisition. Behavioral data were analyzed with the Mann-Whitney test.

RESULTS

In Vitro Characterization of ESPEs Differentiated from Primate ES Cells

We have reported an efficient method to induce differentiation of cynomolgus monkey ES cells into pigment epithelial cells *in vitro*.⁹ To determine whether these primate ESPEs possessed the characteristics of RPE cells, clusters of ESPEs were selected and expanded into a uniform single cell layer on matrix-coated dishes (Fig. 1A). These ESPEs reproducibly exhibited a hexagonal shape, and each cell contained a significant amount of melanin pigments (Fig. 1B). Transmission electron microscopy of ESPEs showed that these cells had the typical structures of the RPE such as extensive apical microvilli and numerous pigment granules (Fig. 2A). These findings indicated that the ESPEs have the morphologic appearance of RPE cells.

The blood-retinal barrier strictly regulates the microenvironment of the photoreceptors, and the RPE cells contribute to this barrier function by forming tight junctions between adjacent cells. Immunocytochemical analysis showed strong staining of the cell junctions between ESPEs by ZO-1, a tight junction protein, indicating that ESPEs form tight junctions *in vitro* (Figs. 1C-E).

We next examined the expression of specific molecules closely related to the cellular function of normal RPE cells (i.e., RPE65 and CRALBP, both of which are involved in regeneration of visual pigment and are strongly expressed in normal RPE cells).^{18,19} Merk, a tyrosine kinase receptor gene, is essential for the phagocytosis of photoreceptor outer segments

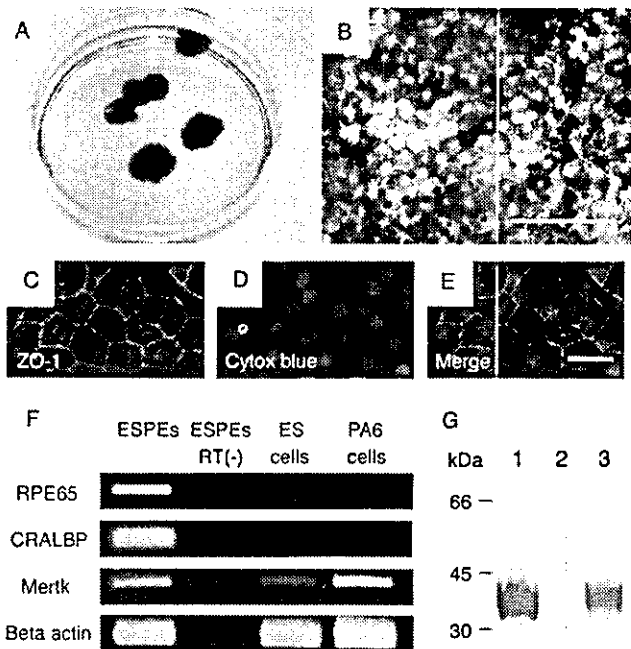


FIGURE 1. Characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate ES cells. (A) Clusters of ESPEs were selected and expanded as patches of a uniform single cell layer on a 60-mm synthetic-matrix-coated dish. (B) The expanded ESPEs had a hexagonal shape with significant amounts of pigment. (C-E) Immunocytochemical staining showed positivity to ZO-1, a tight junction protein, in the ESPEs. ZO-1 (C, green), nuclei in cells stained with Cytos blue (D, blue), and combined (E). (F) RT-PCR analysis of RPE gene expression by differentiated ESPEs, differentiated ESPEs with reverse transcriptase omitted, undifferentiated ES cells, and PA6 stromal cells. (G) Western blot analysis of CRALBP expression in ESPEs. Cell lysates from RPE (lane 1), undifferentiated ES cells (lane 2), and differentiated ESPEs (lane 3) were probed with the anti-CRALBP antibody. Scale bar: (B) 100 μ m; (C-E) 20 μ m.

by RPE cells^{20,21} and is expressed not only in RPE but also in undifferentiated ES cells and in various hematopoietic cell lines.²² RPE65, CRALBP, and Mertk are essential for normal visual functions, because a mutation in any of these three genes in humans causes visual disturbances.²³⁻²⁶ RT-PCR detected the expression of the mRNA of RPE65, CRALBP, and Mertk in the ESPEs. In addition, Western blot analysis confirmed the expression of the CRALBP protein in the ESPEs, which yielded a single band of the appropriate size (Fig. 1G).

To function and be viable, photoreceptor cells require a continuous phagocytosis of their shed outer segments by adjacent RPE cells.¹ There are two separate mechanisms for phagocytosis in RPE cells in vitro: a nonspecific process (as seen with the uptake of latex beads) and a specific uptake of shed outer segment fragments involving a receptor-mediated event. To examine whether ESPEs had phagocytic capability, they were incubated with 1- μ m fluorescent latex beads.¹⁷ When observed by a fluorescence light microscope, the abundant melanin granules in the ESPE cytoplasm obscured the bead-specific fluorescence. However, transmission electron microscopy clearly showed that the ESPEs had ingested the latex beads (Fig. 2B).

Transplantation into a Rat Model with RPE Dysfunction

RCS rats show a progressive photoreceptor loss, which is mostly marked during the first 3 months after birth.²⁷ Retinal degeneration in the RCS rat is primarily due to the failure of the

RPE cells to phagocytose shed outer segments,²⁸ which is the result of a mutation of the receptor tyrosine kinase gene (*Mertk*).²⁹ Subretinal transplantation of fetal RPE cells into the dystrophic RCS rat at an early age resulted in structural and functional preservation of photoreceptors.^{30,31}

We used this animal model to explore the ability of ESPEs to rescue the function in host animals. The host animals were given cyclosporine to prevent xenograft rejection of the monkey ESPEs. At the termination of the experiments, the mean blood cyclosporine level in these animals was 244 ± 73.0 ng/mL, and there was no histologic evidence of any inflammatory immune reaction at the site of cell injection.

When the animals were 12 weeks old (8 weeks after transplantation), the heavy pigmentation of the ESPEs made it easy to identify them in the pink-eyed host RPE cells phagocytosing pigment debris of donor cells (Fig. 3A). Prelabeling the ESPEs with CM-Dil also confirmed that these heavily pigmented cells in the host subretinal space were derived from the donor cells (Figs. 3A-C).

We also measured the thickness of the ONL to determine whether the photoreceptor cells were rescued by the ESPE transplantation. The normal thickness of photoreceptors in the ONL of the congenic nondystrophic rat retina was 11 to 12 cells thick (Fig. 3D), and in the nonsurgical RCS rat retina, the ONL was reduced to an occasional cell lying at the outer border of the inner nuclear layer (INL). In the sham-surgery RCS rat retina, the thickness of the ONL was two to three cells thick in the small area immediately surrounding the injection site (Fig. 3E). When ESPEs were transplanted into the RCS rat retina, however, the ONL directly above the pigmented ESPEs consisted of photoreceptor cell nuclei up to eight cells thick (Figs. 3B, 3F).

The maximum ONL thickness was significantly greater in the ESPE-grafted RCS rat group than in the sham-treated RCS rat group or in the untreated RCS rat group (Fig. 3G; Mann-Whitney analysis, $P < 0.05$). In every ESPE-grafted eye, the maximum ONL thickness of the dorsotemporal retina (ESPE-grafted quadrant) was greater than that of the ventronasal retina of the same eye (Fig. 3G). In contrast, in the nonsurgical eyes, there was no significant difference in the maximum ONL thickness between the dorsotemporal and the ventronasal retina (Fig. 3G).

Immunohistochemical analysis showed that the preserved photoreceptors expressed rhodopsin, visual pigment used by the rod photoreceptor cells to perform phototransduction (Fig. 3F). Electron microscopy of the grafted ESPEs revealed the presence of lamellar structures within the pigmented ESPEs (Fig. 4). These results indicate that the ESPEs developed a

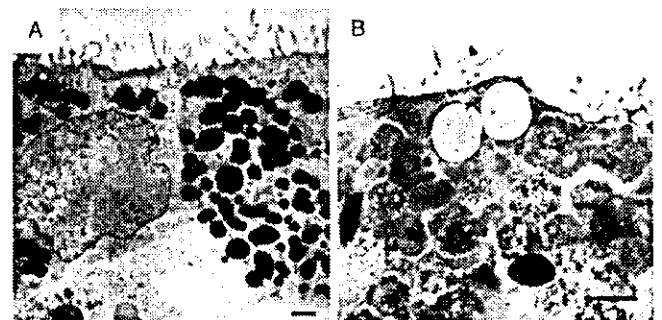


FIGURE 2. Transmission electron microscopy of pigment epithelial cells differentiated from primate ES cells. (A) ESPEs had the typical structures of the RPE, such as extensive apical microvilli and numerous pigment granules. (B) ESPEs had the ability to incorporate 1- μ m latex beads. Scale bars, 1 μ m.