

潤・網膜変性を認めるのに対し、3 欠損型では炎症細胞浸潤が少なく組織傷害が減弱していた。また炎症性サイトカイン・NK 活性の低下を認め、3 欠損型で初期免疫応答の減弱が示唆された。しかし 3 欠損型を用いても SeV 特異的 CTL 活性・抗体価は上昇し、導入後 14 日目には遺伝子発現は消失した。

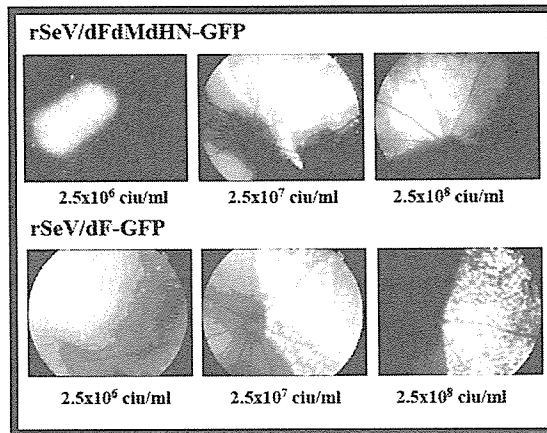


図1 全膜蛋白欠損型センダイウイルスベクターによる遺伝子導入効率

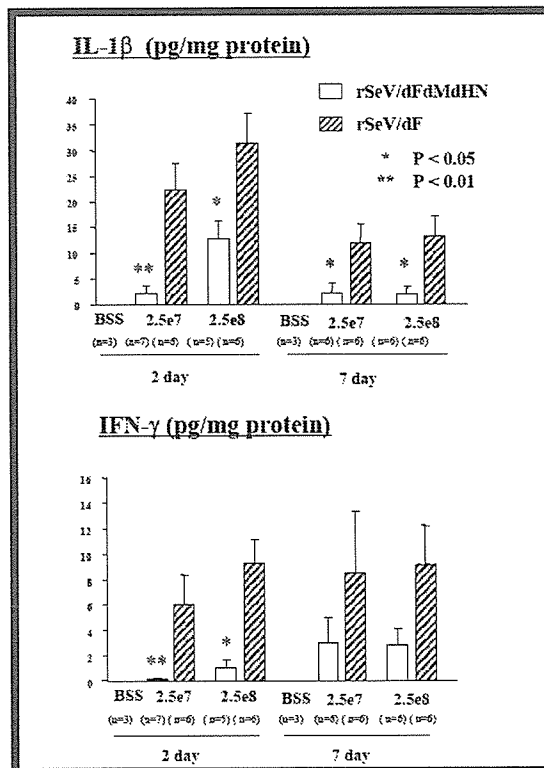


図2 遺伝子導入後の炎症性サイトカイン

D. 考察

膜蛋白遺伝子を欠損した 3 欠損型ベクターを用いることで、局所炎症細胞浸潤・炎症性サイトカインの産生・NK 細胞活性が減弱し、これらの膜蛋白が SeV に対する初期免疫応答に深く関与していることが示された。一方、獲得免疫は 3 欠損型ベクターを用いた場合でも F 欠損型と同様に上昇した。CTL の誘導には NP 遺伝子が深く関与していることが報告されており、獲得免疫の制御には NP の改変など今後の研究が必要と考えられた。

E. 結論

膜蛋白遺伝子をすべて欠損することで、SeV に対する初期免疫応答が減弱し、遺伝子導入後の組織傷害が軽減され、より安全性の高いベクターへと改善された。網膜における遺伝子の長期発現には、獲得免疫の制御が重要と考えられた。

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. Yonemitsu Y et al: Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus. Nat

- Biotechnol 18: 970-973, 2000.
2. Ikeda Y et al: Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer into adult rat retinal tissue: efficient gene transfer by brief exposure. *Exp Eye Res* 75: 39-48, 2002.
 3. Yoshizaki M et al: Naked Sendai virus vector lacking all of the envelope-related genes: reduced cytopathogenicity and immunogenicity. *J Gene Med* 2006.

52. 毛様体網膜幹細胞による視細胞の分化と周辺網膜の形成

西口康二、兼子裕規、中村 誠、加地 秀、寺崎浩子
(名古屋大)

研究要旨 魚類や両生類では、網膜周辺部に存在する ciliary marginal zone (CMZ) に神経幹細胞が多数存在し、生涯を通じて網膜神経細胞が再生される。哺乳類においては、網膜内に CMZ は存在しない。一方、網膜に隣接した毛様体の上皮には網膜神経細胞に分化する可能性を持った幹細胞が存在することが知られている。しかし、これらの細胞が網膜の形成・再生にどのように関与するかは分かっていない。我々は、生後間もないマウスの毛様体において杆体・錐体視細胞前駆細胞が存在することを確認した。それらの細胞は網膜の発達に伴い激減した。このことは、これらの細胞が周辺網膜の形成に関与していることを示唆している。本研究の結果は、毛様体内に存在する網膜神経幹細胞を利用した網膜疾患に対する神経再生治療の可能性を提起するものである。

A. 研究目的

毛様体網膜幹細胞の網膜神経細胞への分化及びそれらの周辺網膜の形成への関与を検討する。

B. 研究方法

生後 3 日から生後 60 日までのマウスに BrdU150mg/kg を腹腔内に投与し、その 3 時間後に眼球を採取した。眼球より作成した網膜凍結切片、eye cup に対し抗 rhodopsin 抗体、抗 recoverin 抗体、PNA を用いて毛様体・網膜境界部における BrdU 陽性細胞、視細胞前駆細胞の性質、形態、分布を組織学的に解析した。

(倫理面への配慮)

マウスを使ったすべての実験は名古屋大学医学部動物実験センターにその研究計画の承認を得て行っている。また本研究は動物を用いた眼研究に関する ARVO のガイドラインに沿うものである。

C. 研究結果

生後 6 日までの眼の凍結切片では、網膜・毛様体境界部において毛様体の BrdU 陽性細胞の一部が網膜内の BrdU 陽性神経前駆細胞よりなる neuroblast layer と連続していた。その後、網膜の neuroblast layer は

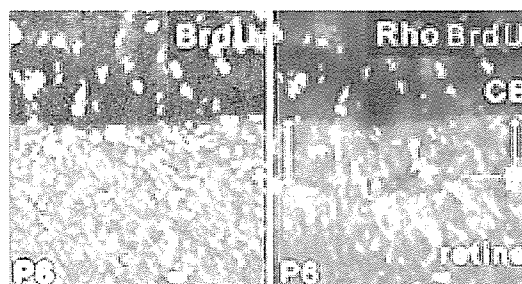


図 1 毛様体と網膜の分裂細胞の分布

生後 9 日までにほぼ消失したが、毛様体の BrdU 陽性細胞は網膜に隣接した部位を中心に生後 30 日まで残存した。次に、毛様体の flat-mount を用いて再解析すると、生後 6 日のマウスにおいては、毛様体と網膜の BrdU 陽性細胞はやはり連続しており、これらが発生学的に同一である可能性が示唆さ

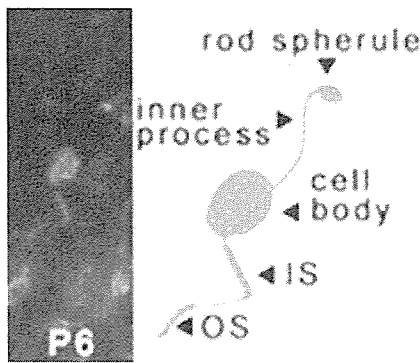


図2 杆体視細胞前駆細胞

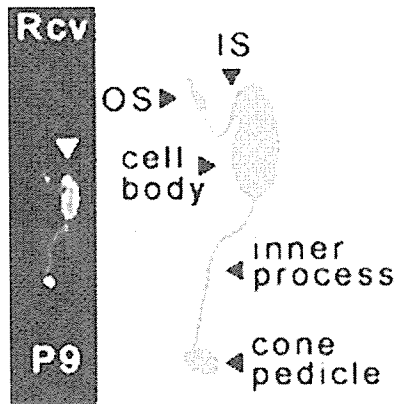


図3 錐体視細胞前駆細胞

れた。これらの毛様体 BrdU 陽性細胞の間には、神経突起や視細胞内節・外節様の構造物を持った BrdU 陰性・ロドプシン陽性の杆体視細胞前駆細胞が多数存在した。しかし、これらの細胞は生後 12 日目までに消失した。これは、網膜の組織学的な完成時期とほぼ一致していた。

一方、毛様体には PNA 陽性の小突起をもった錐体視細胞前駆細胞も存在した。これらの細胞は網膜の組織学的な完成時期をはるかに過ぎた生後 60 日においても確認された。

D. 考察

我々の知る限りでは哺乳類において毛様体を flat-mount にて組織学的に解析した研究は稀である。本研究は、この方法を用いて生後間もないマウスの毛様体内に BrdU 陰性の杆体・錐体視細胞前駆細胞が存在す

ることを確認した。その後、網膜の組織学的な成熟に伴い毛様体内の杆体視細胞前駆細胞は消失したが、錐体視細胞前駆細胞は毛様体扁平部に生後 60 日においても残存した。このことは、哺乳類において、同部位が下等脊椎動物における CMZ と analogous である可能性を示唆している。

E. 結論

生後まもないマウス毛様体において多数の視細胞前駆細胞が形成される。これらの細胞は周辺網膜の形成に関与していると推察される。

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. Moshiri A., Close J. Reh T. A: Retinal stem cells and regeneration. *Int. J Dev. Biol.* 48: 1003-1014, 2004.
2. Reh, T. A, Fischer, A. J: Stem cells in the vertebrate retina. *Brain Behav. Evol.* 58: 296-305, 2001.
3. Tropepe, V. et al: Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287: 2032-2036, 2000.
4. Haruta, M. et al: Induction of

photoreceptor-specific phenotypes in
adult mammalian iris tissue. *Nat.*
Neurosci. 4: 1163-1164, 2001.

53. 骨髄間葉系幹細胞網膜下移植による杆体細胞、 錐体細胞への効果

井上裕治、柳靖雄、入山 彩、玉置泰裕、新家 眞
(東京大)

研究要旨 我々は、骨髄間葉系幹細胞を網膜変性モデルラット (RCS rat)網膜下に移植することにより、網膜変性に対する網膜変性抑制効果が認められたことを報告した。今回、その変性抑制効果が錐体細胞、杆体細胞いずれにみられるかを検討した。RCS rat (4週齢)の左眼網膜下腔に、マウスよりDexter法で取得した骨髄間葉系幹細胞の細胞懸濁液を、経強膜的に移植した。移植後8週の網脈絡膜からRNAを抽出し、RT-PCR法を用いて、錐体杆体視細胞両方に発現が認められるCrx、recoverinのmRNA発現量を定量し、細胞移植眼とPBSのみ注入した対照眼を比較した。Crxおよびrecoverinの発現は、対照眼に比べて細胞移植眼はそれぞれ3.3倍、4.2倍多く認められた。また同様に、移植後8週に眼球摘出し、免疫組織学的に錐体細胞の残存を検討した。細胞移植眼では錐体細胞の残存が認められ、対照眼よりも錐体細胞の残存数が多い傾向があった。以上より網膜変性症モデルラットに対する骨髄間葉系幹細胞網膜下移植により、錐体細胞変性抑制効果があると示唆された。

A. 研究目的

我々は、骨髄間葉系幹細胞を網膜変性モデルラット (RCS rat)網膜下に移植することにより、網膜変性に対する網膜変性抑制効果が認められたことを報告した¹⁾。今回、その変性抑制効果が錐体細胞、杆体細胞いずれにみられるかを検討した。

B. 研究方法

RCS rat (4週齢)の左眼網膜下腔に、マウスより Dexter²⁾法で取得した骨髄間葉系幹細胞の細胞懸濁液を、経強膜的に移植した。右眼には対照として、PBSを同様に網膜下腔に注入した。

移植後8週に眼球摘出し、網脈絡膜よりRNAを抽出した。抽出したRNAより

RT-PCR法を用いて、錐体杆体視細胞両方に発現が認められるCrxおよびrecoverinの発現量を定量した。定量するためにPCRにはReal Time PCR[®]を用いた。細胞移植眼と対照眼の発現量をそれぞれ比較した。

また同様に、移植後8週に眼球を摘出し、組織切片を作成し、抗M cone opsin抗体および抗S cone opsin抗体(大阪バイオサイエンス研究所 古川博士より寄贈)を用いて、免疫組織学的に錐体細胞の残存を検討した。

(倫理面への配慮)

すべての実験における動物の取り扱いは、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)で決められたガイドラインおよび東京大学の動物実験施設

のガイドラインに準じて行った。

C. 研究結果

RT-PCR法では、Crxおよびreorverinの mRNA発現が、対照眼に比べて細胞移植眼ではそれぞれ3.3倍、4.2倍認められた。

また、免疫組織学的検討においては、抗 M cone opsin抗体および抗S cone opsin抗体ともに、細胞移植眼および対照眼にて染色が認められた(図1)。M cone opsin陽性細胞の数を計測すると、移植眼において対照眼より2倍多く認められた。

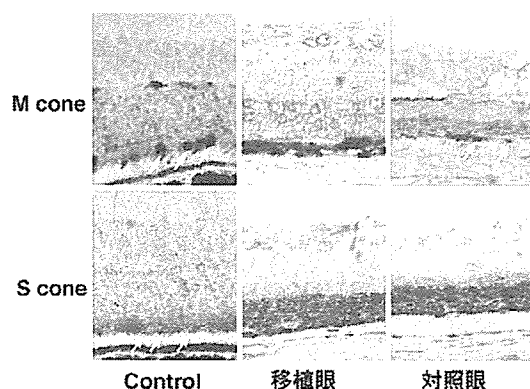


図1 抗cone opsin抗体による免疫染色

D. 考察

我々は、骨髄間葉系幹細胞を RCS rat 網膜下に移植することにより、組織学的および電気生理学的に、網膜変性に対する網膜変性抑制効果が認められたことを報告した。同様に、Arnhold ら³は、ロドプシンノックアウトマウスに対して骨髄間葉系幹細胞を網膜下に移植し、視細胞に対して網膜変性抑制作用があることを報告している。また、Sauve ら⁴は、RCS rat 網膜下にヒト由来の網膜色素上皮細胞を移植することにより、杆体細胞、錐体細胞両方の変性を抑制したと報告している。

今回我々は、骨髄間葉系幹細胞移植により変性が抑制される細胞が杆体細胞、錐体細胞のいずれであるかを検討したが、免疫組織学的検討により、少なくとも錐体細胞に関しては変性が抑制されと考えられたが、杆体細胞に関しては更なる検討が必要であると考えられた。

E. 結論

網膜変性症モデルラットに対し、骨髄間葉系幹細胞を網膜下移植は、錐体細胞変性抑制効果を認めた。

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. 井上裕治 他：網膜変性症モデルラットに対する骨髄間葉系幹細胞網膜下移植による網膜変性抑制効果. 平成17年度網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班班会議 福岡市, 2006.
- 2. Dexter TM: Stromal cell associated haemopoiesis. J Cell Physiol Suppl 1: 87-94, 1982.
- 3. Arnhold S et al: Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells

in the dystrophic retina of the
rhodopsin knockout mouse. Graefes
Arch Clin Exp Ophthalmol 2006 Aug
4, Epub ahead of print

4. Sauve Y et al: Partial preservation of
rod and cone ERG function following
subretinal injection of ARPE-19 cells
in RCS rats. Vision Res 46:
1459-1472, 2006.

54. ヒトおよびサル ES 細胞からの網膜色素上皮細胞

及び視細胞分化誘導

万代道子¹⁾、小坂田文隆²⁾、池田華子³⁾、高橋政代¹⁾

(¹⁾ 理化学研究所発生再生科学総合科学センター、²⁾ 京大薬学研究科

³⁾ 滋賀県成人病センター)

研究要旨 我々は、網膜再生医療の臨床応用を前提とし、霊長類（ヒト及びサル）の ES 細胞から SFEB-DL 法を用いて網膜前駆細胞を得る方法を確立し、更にそこから成分明瞭な化学物を添加することにより、効率よく視細胞及び色素上皮細胞と思われる細胞を得ることができた。これは今後の移植による網膜再生医療の臨床応用に重要と思われる。

A. 研究目的

網膜色素変性などの変性疾患において網膜神経細胞は非可逆的な変性に陥るが、現在のところ治療方法はなく、移植等による網膜再生医療が将来的な治療のひとつとして期待される。網膜色素変性においては健全な視細胞の移植が一つの治療手段候補となるが、そのためには、十分量のかつ健全、安全な移植細胞が必要となる。我々は臨床応用のための研究ツールとしてのサル ES 細胞及び臨床応用を前提としたヒト ES 細胞を用いて効率よく視細胞及び色素上皮細胞を分化誘導することができたのでここに報告する。

B. 研究方法

サル (cynomolgus monkey) ES 細胞 2 ライン、ヒト ES 細胞 3 ラインを用いてマウスでの経験をもとに分化実験を行った(1)。feeder 細胞除去後、サル ES 細胞で 18 日間、ヒト ES 細胞で 20 日間の浮遊培養を行い、その後 poly-D lysine/laminine/fibronectin

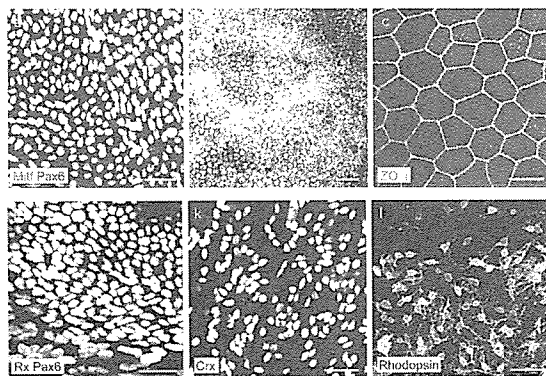
コーティングしたスライドチャンバーを用いて接着培養を行った(SFEB 法)(2)。初期の浮遊培養中に、発生時の脳神経前方化作用のみられる Wnt antagonist である Dkk-1 (100ng/ml)及び nodal antagonist である Lefty-A(500ng/ml)を添加し、網膜幹細胞 (Mitf, Rx, Pax6 陽性細胞) 及び幼若視細胞 (Crx 陽性細胞) が増加するか検討した。その後、視細胞分化因子としてレチノイン酸 (1 μ M), taurine (100 μ M), N2 supplement をサル細胞では分化 90 日目以降、ヒト細胞では分化 120 日目以降に添加し、それぞれ 130 日目、200 日目において視細胞 (ロドプシン陽性細胞) への分化を検討した。

(倫理面への配慮) ヒト ES 細胞の扱いに関しては、厚労省大臣承認のもと「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」にのっとり十分に注意して行っている。

C. 研究結果

サル ES 細胞において SFEB 法に Dkk-1,

Lefty-A を加えることにより（以下 SFEB/DL 法）、分化 30 日目において Mitf 陽性コロニー率 50%以上、Rx 陽性コロニー率 42%に増加した。Mitf 陽性細胞からは色素上皮細胞の分化がみられ、また SFEB/DL 法により、後の Crx, ロドプシンコロニー陽性率も増加した。さらにレチノイン酸、taurine, N2 supplement を加えることにより、これらのコロニー内での Crx, ロドプシン陽性細胞は Crx で 70%以上、ロドプシンで 40%以上に増加した。ヒト ES 細胞においても同様に効率よく色素上皮細胞、視細胞と思われる細胞を得ることが出来た。また、サル、ヒト、両者とも複数ラインにおいて再現性を確認した。



ヒト ES 細胞からの色素上皮細胞及び視細胞分化誘導

色素上皮細胞（上段）左より Mitf/Pax6 陽性細胞、六角形の有色素細胞、ZO-1 染色視細胞（下段）左より Rx/Pax6 陽性細胞、Crx 陽性細胞、ロドプシン陽性細胞)

D. 考察

これまでにも網膜との共培養などでロドプシン陽性細胞の分化誘導を示した報告はあるが、今回のように純粋な培養系で明確な外的因子の添加により効率よく視細胞を誘導したという報告は初めてである。今後さ

らにこれらの細胞を用いて移植用細胞の選別と移植における細胞の安全性、効率よい移植条件等について検討が必要となる。

E. 結論

ヒト ES 細胞を用いて効率よく視細胞を分化誘導する方法を得た。今後の移植による網膜再生治療に有用な手段となると思われる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki T, et al: The simultaneous treatment of MMP-2 stimulants in retinal transplantation enhances grafted cell migration into the host retina. Stem Cells. 24: 2406-2411, 2006.

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

1. 特許取得

「視細胞への分化誘導方法」高橋政代、小坂田文隆、池田華子、万代道子
平成 19 年 1 月 18 日出願

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

1. 参考文献

1. Ikeda, H et al: Generation of Rx+/Pax6 neural precursors from embryonic stem cells. Proc.Natl.Acad.Sci USA 102:

- 11331-11336, 2005.
2. Watanabe, K et al: Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. Nat. Neurosci. 8: 288-296, 2005.

55. 骨髄由来幹細胞と網膜色素変性

大谷篤史、佐々原学、亀田隆範、淀井有子、大石明生、鄒賀、吉村長久
(京都大)

研究要旨 網膜色素変性患者において末梢血中骨髄由来幹細胞が何らかの影響を及ぼしているのか、その可能性を調べた。

A. 研究目的

骨髄由来幹細胞を硝子体内投与することにより、網膜色素変性の神経変性の進行を抑えられることを動物モデルで示してきた (Otani, JCI 2004)。今回、内因性の骨髄由来幹細胞が網膜色素変性の変性過程に関与しているかどうかを検討した。

B. 研究方法

網膜色素変性マウス (rd1) 生後 15 日目に致死量放射線照射後、GFP マウス由来骨髄の移植を行った。生後 30 日目に網膜伸展標本を作成し蛍光顕微鏡下に観察した。対照として BL6 マウスを同様に処置した。さらに骨髄由来細胞の果たす役割を明らかにするべく、当院倫理委員会承認後、50 歳未満の網膜色素変性患者から末梢血を採取し、培養系にて骨髄由来幹細胞の機能測定を行った。

C. 研究結果

網膜色素変性マウスでは対照に比較し、多数の GFP 陽性細胞を網膜内に認めた。骨髄由来幹細胞は主に血管周囲細胞、マイクログリアに分化していることが示唆された。さらに網膜色素変性患者の末梢血中骨髄由来幹細胞の機能は同年齢正常人と比較し低

下傾向にあり、特に血管内皮コロニー形成能は有意に低下していた ($P=0.005$)。

D. 考察

骨髄由来幹細胞は網膜色素変性の変性過程に大きな影響を及ぼしている可能性が示唆された。本研究は網膜色素変性の病態進行、治療を考える上で重要な新知見を提示していると思われる。

E. 結論

内因性骨髄由来幹細胞と網膜色素変性との関連を初めて示した。今後の病態解明、新治療の開発につながると考える。

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 なし

56. 網膜色素変性に対する遺伝子治療

～進行状況の報告～

池田康博¹⁾、宮崎勝徳¹⁾、米満吉和²⁾、向野利一郎¹⁾、村上祐介¹⁾
村田敏規³⁾、後藤純信⁴⁾、長谷川護⁵⁾、居石克夫⁶⁾、石橋達朗¹⁾
(¹⁾九州大、²⁾九州大遺伝子治療臨床研究準備室、³⁾信州大、
⁴⁾国際医療福祉大、⁵⁾ディナベック(株)、⁶⁾九州大病理病態学)

研究要旨 これまでに我々は、網膜色素変性に対する遺伝子治療の可能性と臨床応用へ向けた研究を継続してきた。今回は、神経栄養因子搭載サル由来レンチウイルス (SIV) ベクターを用いた視細胞保護遺伝子治療について、臨床応用に向けた準備状況について報告する。

A. 研究目的

網膜色素変性に対する新しい治療法として、神経栄養因子であるヒト色素上皮由来因子 (hPEDF) を用いた遺伝子治療を臨床応用するために、その有効性と安全性について検討する。

B. 研究方法

有効性については、疾患モデル動物 (RCS ラット、rds マウス) を用い、神経保護効果を病理組織学的、ならびに網膜電図を用いた電気生理学的に評価した。安全性に関しては、カニクイサルを用いたベクター網膜下投与に対する安全性試験を施行した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、眼科領域の動物使用に関する ARVO の声明、ならびに日本霊長類学会の定めたサル類を用いる実験遂行のための基本原則を遵守し、所属研究機関による承認を得た動物実験プロトコルに従った。

C. 研究結果

視細胞保護効果については、hPEDF のみではなく、FGF-2 (線維芽細胞増殖因子) でも同様の有効性が確認でき、これら両者による相乗効果も確認できた。安全性に関しては、既に急性期試験は終了し、長期安全性試験が継続中である。2年以上を経過した現在、全身および眼局所での重篤な副作用は観察されていない。以上の成果をもとに臨床研究実施計画書を学内申請し、2006年12月末時点で4回の審議会が終了した。

D・E. 考察・結論

神経栄養因子を用いた網膜色素変性に対する遺伝子治療は有効であり、安全であることが確認された。今後、臨床研究プロトコルが所属機関ならびに厚労省において審議される予定である。

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. Ikeda Y, et al: Long-term histological and functional analysis for Simian Immunodeficiency Virus (SIV)-based lentiviral vector -mediated intraocular gene transfer in adult rats. Gene Ther 10: 1161-1169, 2003.
2. Miyazaki M, et al: 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. 10: 1503-1511, 2003.

厚生労働科学研究研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究
平成18年度 総括・分担研究報告書

(3年計画の2年目)

平成19年3月31日 印刷・発行

発行者 厚生労働省難治性疾患克服研究事業
網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究班

主任研究者 石橋達朗

福岡市東区馬出3-1-1
九州大学医学部 眼科学教室
TEL 092-642-5648 (直通)
FAX 092-642-5663
E-mail fumie@eye.med.kyushu-u.ac.jp

印刷所 (株) 津村愛文堂
福岡市早良区室見2-16-8
TEL 092-821-0173 FAX 092-831-3329
E-mail:t-aibundo@h3.dion.ne.jp