

Title	ヒトES/iPS細胞由来網膜組織を用いた視機能再生医療 の開発
Author(s)	山﨑, 優
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/88004
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

## 博士学位論文

ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織を用いた

視機能再生医療の開発



目次

要旨		1
緒論		2
第一章	Feeder free ヒト ES/iPS 細胞の網膜分化誘導法開発と免疫学的な解析	6
第 <b>1</b> 節	緒言	7
第 <b>2</b> 節	結果	8
第 <b>3</b> 節	考察	27
第二章	有効性向上を目的とした <i>Islet-1</i> KO ヒト ES 細胞由来網膜組織の評価	30
第 <b>1</b> 節	緒言	31
第 <b>2</b> 節	結果	32
第 <b>3</b> 節	考察	50
方法		52
総括		62
引用文南		63
謝辞		66

本論文中には、以下の略語を使用した。

- ESCs : Embryonic stem cells
- iPSCs: Induced pluripotent stem cells
- NR : Neural retina
- RPE : Retinal pigment epithelium
- RGC : Retinal ganglion cell
- GCL : Ganglion cell layer
- INL : Inner nuclear layer
- IPL : Inner plexiform layer
- ONL: Outer nuclear layer
- MEA : Multi-electrode array
- SFEBq : Serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation

## 要旨

網膜色素変性は、網膜の視細胞が変性死する進行性の遺伝性疾患の総称であり、進行すると 中心視野を担う錐体視細胞も2次的に障害されることで視力低下や失明に至る。ヒトの網膜は 一度障害を受けると再生能の低さのため、修復は極めて限定的であることが知られており、変 性した視細胞を補い、残存している網膜内層の神経回路を利用して光応答能を回復させる視細 胞移植治療が期待されている。1990年代に米国やインド中絶胎児網膜組織を移植する臨床研 究が行われたが、効果について十分な検証までには至らず、適切な発生段階の網膜組織を安定 的に用意することは容易ではないことに加え、倫理的な観点から普及には至らなかった。

このような状況の中、2つの技術的な革新から視細胞移植治療がより脚光を浴びるようになった。1つは京都大学のYamanakaらが開発した iPS 細胞の樹立技術であり、もう1つは理化 学研究所のSasaiらが開発した中枢神経組織の分化誘導法「SFEBq法」を用いた立体網膜組 織の作製技術である。SFEBq法では多能性幹細胞から細胞塊を形成させ、適切な条件を整え て培養すると、細胞集団が自律的に複雑な構造を作り出す自己組織化が起こり、胎児網膜と似 た多層構造を形成しながら、視細胞を含む網膜を構成する様々な細胞が生み出される。理化学 研究所のTakahashi・Mandai らは ES/iPS 細胞由来網膜組織から切り出した網膜シートを末期 網膜変性モデル動物に移植し、視細胞の生着や成熟、ホスト双極細胞とのシナプス接続、そし てホスト網膜の光応答能の回復を確認したことから、ヒト iPS 細胞由来網膜組織を用いた視細 胞移植治療の実現化に向けた研究が本格的に始まった。

このように理化学研究所を中心とした網膜組織の分化誘導法の改良や移植研究と並行して、 私たちはこれらの先駆的な研究成果を臨床に応用するための研究に取り組んだ。まず、臨床用 途の網膜組織の分化誘導法を検討したところ、フィーダーフリー培養したヒト ES/iPS 細胞か らでは網膜組織を作製することができないという問題に直面し、改良研究を行った。改良分化 法によって安定して網膜組織を作製できるようになったことから、次に移植免疫の基盤となる 情報を得るために網膜組織の免疫学的な特性解析を行った。さらに、移植研究から見えてきた 網膜組織移植特有の課題を解決した新たな視機能再生技術開発を行った。これらの研究により、 網膜色素変性に対する視細胞移植治療開発を推進しただけでなく、ヒト ES/iPS 細胞由来網膜 組織の新たな有用性と将来性を示すことができた。

本研究成果を含めた POC 研究において、ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の細胞治療におけ る安全性と有効性が示唆されたことから、2020 年にヒト iPS 細胞由来網膜シート移植によ る、視機能の再生医療の臨床研究が開始され、患者への投与が行われた。本論文が網膜組織だ けでなく、様々な多能性幹細胞を用いた細胞医薬の臨床応用に向けた研究開発の一助となるこ とを期待する。

1

## 緒論

## 網膜の構造と網膜色素変性に対する網膜移植研究

ヒトの視細胞は、円錐形の外節を形成して明るい所で色情報等を担う錐体視細胞と、円柱形 の外節を形成して暗い所での明暗情報等を担う桿体視細胞の2種類存在する。眼の中に入って きた光は外層に位置する視細胞が受け取り、光情報を神経活動に変換し、内層の細胞(水平細 胞・双極細胞・アマクリン細胞)に伝える。内層に伝わった視覚情報はさらに修飾・抽出され、 最終的に網膜神経節細胞が神経発火パターンとして脳に伝える(図1-1)。網膜色素変性は、視 細胞が変性死する進行性の遺伝性疾患の総称であり、網膜の周辺部に多い桿体視細胞が徐々に 失われて夜盲や視野狭窄をきたし、進行すると中心視野や視力を担う錐体視細胞も2次的に障 害されることで視力低下や失明に至る。

網膜色素変性に対する治療候補の一つである視細胞移植は、1990 年代に米国やインドにお いて中絶胎児網膜を用いた臨床研究が行われた(Das et al., 1999; Humayun et al., 2000; Radtke et al., 2008)。これらの臨床研究では、移植した網膜の生着が確認され、網膜移植治療の安全 性の一部が示されたが、視機能回復効果についても十分な検証までには至らなかった。さらに、 安定的に適切な発生段階の胎児網膜を用意することが容易ではなく、中絶胎児を用いていたこ とから倫理的な面においても大きな課題が残り、普及には至らなかった。



図 1-1. 網膜の構造および網膜色素変性について

網膜の外側に単層の上皮組織 RPE が局在。RPE の内側に位置する網膜組織は、神経網膜前駆 細胞から視細胞や双極細胞、網膜神経節細胞等が生み出され、多層の複雑な組織を形成する。

#### SFEBq 法による網膜組織の分化誘導法

多能性幹細胞は「体を構成する大部分の細胞に分化できる多分化能」と、「ほぼ無限に分裂 増殖できる自己複製能」の二つの性質を併せ持つ細胞である。1998 年、Wisconsin 大の Thomson 博士らによって胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたヒト ES 細胞の報告以来、ヒト ES 細胞を用いた分化誘導研究が盛んに行われるようになった(Thomson, 1998)。さらに京都大 学の Yamanaka らによるマウス iPS 細胞、及びヒト iPS 細胞の樹立の報告により、ヒト ES 細 胞を用いる倫理・運用上の問題が回避されたことから、ヒト iPS 細胞を用いた再生医療への期 待が高まった(Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007)。

理化学研究所の Sasai らは神経組織の発生の知見を用いて、中枢神経組織へ分化誘導に適す る無血清凝集浮遊培養法「SFEBq法」を開発し、2011 年にマウス ES 細胞から、2012 年にヒ ト ES 細胞から胎児網膜組織と似た多層構造を有する立体網膜組織の作製を報告した(Eiraku et al., 2011; Nakano et al., 2012)。SFEBq法では、細胞低接着の V 底の容器に適切な細胞数の多 能性幹細胞を播種して細胞塊を形成させると、細胞集団が自律的に複雑な構造を生み出す自己 組織化が誘導され、網膜組織が作製される。2015 年には無血清培地中に BMP4 を加える事で 飛躍的に網膜組織の分化誘導効率を向上させる方法を見出したことから、網膜組織を用いた臨 床応用への期待がより一層高まった(図 1-2) (Kuwahara et al., 2015)。



図 1-2. SFEBq 法を用いたヒト ES 細胞から網膜組織の分化誘導法の概略 Kuwahara らによって報告された SFEBq 法に BMP4 を添加する網膜組織の分化誘導法

### ES/iPS 細胞由来網膜組織から切り出した網膜シート移植

理化学研究所の Takahashi・Mandai らは、ES/iPS 細胞由来網膜組織の一部を切り出した網 膜シート移植に取り組んできた。2014年のマウス ES 細胞由来網膜シート移植の報告を皮切り に、ヒト ES/iPS 細胞由来網膜シートを末期視細胞変性モデル動物に移植し、視細胞層 ONL 様 構造を形成して生着し、視細胞外節を形成して成熟すること、ホスト双極細胞とのシナプス接 続、そしてホスト網膜の光応答能の回復を報告してきた(Akiba et al., 2019; Assawachananont et al., 2014; Iraha et al., 2018; Mandai et al., 2017a; Shirai et al., 2016)。さらに、レーザーで視 細胞を変性させたサルにヒト iPS 細胞由来網膜シートを移植し、異常増殖なく、2 年以上視細胞の生着を確認した(Tu et al., 2019)。これらの POC 研究より、ヒト ES/iPS 細胞由来網膜シートの安全性が示唆され、治療コンセプトが確認されたことから、ヒト iPS 細胞由来網膜シート移植による視機能再生を目指す臨床応用研究が本格的に進められている(図 1-3)。



図 1-3. 網膜色素変性に対するヒト ES/iPS 細胞由来網膜シートを用いた治療戦略

## 網膜の免疫特権と免疫抑制

網膜色素変性は遺伝性の疾患であることから、病気の原因遺伝子を有する患者由来の iPS 細胞を用いた自家移植治療は適切ではなく、健常者由来の iPS 細胞を用いた他家移植治療が現実 的である。他家移植治療を行うのであれば、免疫拒絶反応を抑える必要があるため、移植環境 や移植する細胞の免疫学的な性質を理解することは非常に重要である。移植する眼球・網膜 は、視覚を保つために免疫特権領域といわれる過剰な炎症が起きにくい特徴を有することが知 られており、2 つの血液網膜関門(blood retinal barriers: BRB)によるバリア形成や、免疫抑 制因子の分泌によって免疫特権が維持されていると言われている(Mochizuki et al., 2013; Streilein, 2003)。BRB は、RPE 層による網膜とコロイド層を隔てる outer BRB と、網膜内血 管による血流と網膜を隔てる inner BRB があり、バリアを構成する細胞が Tight junction を形 成して外界から隔離し、免疫細胞やサイトカインの侵入を制限している(Cunha-Vaz, 2004; Streilein, 2003; Sugita, 2009)。また、バリア機能に加え、RPE や光彩、毛様体上皮細胞によ る免疫抑制因子の分泌も免疫特権の維持に貢献していると報告されている(Sugita, 2009; Sugita et al., 2006)。

ヒト ES/iPS 細胞由来網膜シートと同じ箇所に移植するヒト ES/iPS 細胞由来 RPE について は、既に加齢黄斑変性(age-related macular degeneration: AMD)や Stargardt 病を対象に臨 床段階のフェーズに入っており、様々な免疫学的な解析が行われている(Fujii et al., 2020; Kashani et al., 2018; Sugita et al., 2016a, 2020)。ヒト ES/iPS 細胞由来 RPE は生体の RPE と 同様に免疫抑制能を有するが、HLA 分子の発現は比較的高い傾向にあり、移植時にシクロス ポリンやタクロリムス等の免疫抑制剤の投与が行われている。一方で、ヒト ES/iPS 細胞由来 網膜組織については安定して高品質なサンプルを用意することが難しかったこともあり、免疫 学的な解析は進んでおらず、不明なことが多い。胎児の網膜組織移植を実施した臨床研究で は、拒絶の所見が見られなかったものの、拒絶されなかったのは眼球の免疫特権の環境のおか げなのか、移植した神経網膜組織の免疫学的な特徴であるのかは不明である(Das et al., 1999; Humayun et al., 2000; Radtke et al., 2008)。

#### 本研究の目的

これまで理化学研究所を中心に ES/iPS 細胞から網膜組織を分化誘導する方法や、作製され た網膜シートの移植研究は進められており、これらの先駆的な研究成果を臨床に応用すること を目標に、私たちはまず臨床用途のフィーダーフリー培養したヒト ES/iPS 細胞による網膜組 織の分化誘導検討を行った。安定的に分化誘導できるようになった網膜組織を用いて、移植免 疫の基盤となる情報を得るため免疫学的な特性解析を行った。さらに、移植研究の中で見えて きた課題を解決する将来の次世代網膜として、ゲノム編集を用いたより視機能回復効果が期待 できる新規視機能再生技術の開発を行った。本研究を通して、網膜色素変性に対する視細胞移 植治療開発を推進し、ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の有用性と将来性を示すことを目的とし た。

## 第一章

Feeder free ヒト ES/iPS 細胞の網膜分化誘導法開発と 免疫学的な解析

## 第1節 緒言

細胞は培養環境によって性質を大きく変化させることが知られており、特に培地や足場マト リックスによる影響は大きい。細胞の性質を維持したまま安定的に培養するには、最適な培養 環境を整えることが重要である。初めてヒト iPS 細胞が樹立された際に用いられていた未分化 維持培養法は、ヒト ES 細胞の培養法を転用したフィーダー細胞を用いた共培養系であった (Takahashi et al., 2007)。フィーダー細胞は一般にマウス胎児繊維芽細胞(Mouse Embryonic Fibroblast: MEF)やネオマイシン抵抗性ベクターと LIF 発現ベクターが組み込まれた STO

(SNL)細胞が用いられており、液性因子の分泌や細胞接着の足場の提供により、多能性幹細胞の未分化維持に貢献している。

将来を見据えた細胞医薬の大量培養を想定した際、フィーダー細胞を用いた共培養系では、 様々な課題が考えられる。臨床応用では培養に用いる培地や分化因子等が生物由来原料基準に 適合している必要があり、フィーダー細胞を用いるのであれば最終産物のフィーダー細胞の混 入否定試験や、場合によっては異種移植として異種移植指針に従う必要性がでてくる。また、 ヒト由来のフィーダー細胞であっても、フィーダー細胞に由来する病原体の感染リスクも排除 しきれない。製造面においても、フィーダー細胞のバンクを整える必要があることに加え、事 前にフィーダー細胞を播種する手間や、細胞のコロニーを小さい細胞塊に断片化して継代する 手技的な課題もあった。

近年、味の素株式会社が開発した未分化維持培地 StemFit、及び大阪大学の Sekiguchi らが
開発した Laminin 511 E8 断片(iMatrix511)を組み合わせ、ヒト ES/iPS 細胞のフィーダーフ
リー培養法が開発された(Miyazaki et al., 2012; Nakagawa et al., 2014)。この方法では、継代
時にアポトーシスを阻害する ROCK 阻害剤を用いると、シングルセル継代が可能となり、作
業が簡略化され、容易に大量培養ができるようになった(図 2-1)(Watanabe et al., 2007)。
フィーダーフリー培養法



図 2-1. ヒト ES/iPS 細胞の培養方法の比較

2015年に報告された BMP4 を加える網膜組織の分化誘導法では、MEF を用いて未分化維持 培養したヒト ES 細胞を出発細胞としていた(Kuwahara et al., 2015)。そこで本章では、まず 臨床応用に向け、フィーダーフリー培養したヒト ES/iPS 細胞を用いて分化誘導検討を行っ た。また、さらなる分化誘導効率の向上や生産コストを意識し、BMP4 を低分子化合物で置き 換えられないか、もしくは併用して使用する BMP4 の濃度を減らせられないか検討した。良 質な網膜組織を安定的に分化誘導できるようになったことから、ヒト投与時の免疫抑制プロト コールの参考情報にすることや、移植免疫を理解するための基盤となる情報を取得する事を目 的に、ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の免疫学的な特性解析を行った。

## 第2節 結果

## 2-1. フィーダーフリー培養したヒト iPS 細胞を用いた網膜組織の分化誘導検討

2015年に報告された網膜組織の分化誘導法を用いて、フィーダーフリー培養した 1231A3 ヒト iPS 細胞から分化誘導を行い、網膜組織が作製できるのか評価した。ヒト iPS 細胞を酵素 処理して分散後、アポトーシス抑制のために ROCK 阻害剤 Y-27632 添加して 96 well V 底プレ ートに播種し、分化 3 日に BMP4 を添加することで網膜組織への分化誘導を行った。分化 6 日の凝集塊を観察したところ、通常形成されるはずの凝集塊が確認されず、細胞が死んでいる ことが観察された(図 2-2 Control)。よって、現状の分化誘導法はそのまま適応できず、改良 する必要があることが示された。

少なくとも MEF を用いて培養したヒト iPS 細胞では分化誘導が成功していたことから、分 化開始時の MEF の混入が凝集塊形成に良い影響を与えているのではないかと考え、フィーダ ーフリー培養したヒト iPS 細胞に 5% MEF を混入させて分化誘導検討を行った。その結果、 分化 6 日において、良好な凝集塊が形成された(図 2-2 MEF addition)。さらに、MEF の Conditioned medium を分化開始時に加えたところ、同様に凝集塊形成促進効果が確認され た。よって、フィーダーフリー培養したヒト iPS 細胞においても、分化開始時に何らかのシグ ナルを与える事で、良好な凝集塊が形成できることが明らかとなった。

3D-differentiat	ion culture (day 6)
Control	MEF addition
8	
N	_

図 2-2. フィーダーフリー培養したヒト iPS 細胞を用いた網膜組織の分化誘導 フィーダーフリー培養したヒト iPS 細胞の分化誘導開始時に MEF を添加(MEF addtion)、非 添加(Control)した条件における、分化 6 日の顕微鏡観察像。スケールバー:200 µm

### 2-2. 分化誘導開始時の SAG 添加の検討

臨床用途の分化誘導法において MEF の使用は避けたいことから、MEF の代わりとなる分化 因子の探索を行った。神経の発生に重要なシグナルを調節する低分子化合物を用いて分化誘導 検討を行ったところ、細胞の増殖や分化に関わる Sonic Hedgehog (Shh) シグナルの活性化 剤 SAG (Smoothened Agonist)を分化開始時 (Day0)に添加(以降、Day0 SAG 添加)する と、凝集塊の形成が促進された (図 2-3)。よって、MEF 非存在下のフィーダーフリー培養し たヒト iPS 細胞においても、良好な凝集塊形成できることが示された。



図 2-3. 分化開始時の SAG 添加による凝集塊の形成促進効果

分化開始時に SAG 添加した際の分化 6 日の顕微鏡観察像(d0-SAG)。スケールバー: 200 µm

## 2-3. 分化開始1日前のプレコンディショニング処理の検討

Day0 SAG 添加による凝集塊の形成促進効果が確認されたが、複数回分化誘導すると分化ロットによっては凝集塊が形成されない事があった。安定的に分化誘導できるようにするため、別の切り口の改良検討として、分化開始1日前の未分化維持培養中のヒト iPS 細胞の状態を変化させるプレコンディショニング処理を実施した。プレコンディショニング処理として、神経系に分化促進させることで知られるTGF-β/Nodal シグナル阻害剤 SB431542 (SB) や BMP シグナル阻害剤 LDN 193189 (LDN)を加え、翌日に分化誘導を行ったところ、SB (Pre SB)や LDN (Pre LDN)添加した条件では、凝集塊の形成促進効果が確認された(図 2-4)。よって、フィーダーフリー培養したヒト iPS 細胞に対し、Day0 SAG 添加だけでなく、プレコンディショニング処理も凝集塊形成に有効であることが示された。



図 2-4. 分化開始 1 日前の SB、又は LDN 添加による凝集塊の形成促進効果 プレコンディショニング処理検討した際の分化 9 日の顕微鏡観察像。スケールバー:200 µm

### 2-4. プレコンディショニング処理と Day0 SAG 添加の組み合わせ検討

更なる分化誘導効率の向上を目指し、プレコンディショニング処理と Day0 SAG 添加を組み 合わせた検討を行った。その結果、Control では分化 3 日の BMP4 添加以降、凝集塊が徐々に 崩れていったのに対し、SB と SAG をプレコンディショニング処理(Pre SB+SAG)し、さら に Day0 SAG 添加を行うと凝集塊は崩れずに増殖し、凝集塊が形成された(図 2-5)。



図 2-5. プレコンディショニング処理と Day0 SAG 添加を組み合わせた分化誘導 上段:プレコンディショニング処理と Day0 SAG 添加の組み合わせの継時的な顕微鏡観察 像。下段:分化 17 日の神経上皮構造を有する凝集塊の割合。スケールバー:200 µm

次にプレコンディショニング処理と Day0 SAG 添加を組み合わせて作製した凝集塊が網膜に 分化しているか確認するため、分化 23 日の凝集塊を PFA 固定し、切片を作製後、網膜前駆細 胞マーカーChx10 と Rx に対する抗体を用いて免疫組織染色を行った。蛍光顕微鏡観察の結果、 図 2-6 に示す 4 つの条件で分化誘導した凝集塊は Chx10 と Rx を発現しており、網膜前駆細胞 に分化していることが観察された(図2-6)。さらに、凝集塊の外周に神経上皮構造が形成され ており、自己組織化による層構造の形成も観察された。

よって、プレコンディショニング処理と Day0 SAG 添加の組み合わせは有効であり、複数回の分化ロットにおいて、ロット内・ロット間でばらつきが小さく、安定的に網膜組織を分化誘導させることができることを確認した。



図 2-6. 免疫組織染色による網膜組織への分化の確認 凝集体の Chx10、Rx に対する免疫組織染色の蛍光顕微鏡観察像。スケールバー:200 µm

## 2-5. 複数の多能性幹細胞株や異なる未分化維持培養法における有用性の確認

一般に再現性や頑健性のある有用な分化誘導法は、多能性幹細胞株や未分化維持培養法を選 ばず、安定して目的の細胞へ分化誘導できることが求められる。上記、分化誘導検討に用いた 1231A3 ヒト iPS 細胞は Episomal ベクターを用いて樹立された研究用株であり、将来的には臨 床用 iPS 細胞株に切り替える必要があることから、改良分化誘導法が様々な多能性幹細胞株に おいても有効である必要がある。そこで、プレコンディショニング処理と DayO SAG 添加が 1231A3 ヒト iPS 細胞株のみではなく、複数株においても有効か確認するため、臨床用 iPS 細 胞の樹立方法に近い Sendai ウイルスを用いて樹立されたヒト iPS 細胞 C3 株と、ヒト ES 細胞 KhES1 株 (*Rx::*Venus レポーター株)を用いて分化誘導検討を行った。その結果、C3 株、 KhES1 株共にプレコンディショニング処理と DayO SAG 添加による凝集塊の形成促進効果が 観察され、免疫組織染色により Chx10 陽性の網膜組織への分化を確認した(図 2-7A-D)。

さらに、改良分化誘導法が Stem Fit 未分化維持培地以外の培地においても有効であるか確認 するため、未分化維持培地 Essential 8(Thermo 社)で培養した 1231A3 ヒト iPS 細胞におい て改良分化誘導法を用いた検討を行った。その結果、Stem Fit 培地と同様に Essential 8 で未分 化維持培養したヒト iPS 細胞においてもプレコンディショニング処理と Day0 SAG 添加によっ て凝集塊の形成が促進され、網膜組織へ分化させることを確認した(図 2-7E-F)。

よって、複数の多能性幹細胞株、異なる未分化維持培養条件においても、プレコンディショ ニング処理と Day0 SAG 添加による網膜組織への分化誘導法は有効であることが示された。

Α	C3 (Sendai-iPS) StemFit medium	в	Control	Pre: SB+SAG	Pre: SB+SAG	Pre: LDN+SAG
	d0		d22	d22	DAPI Chx10	DAPI Chx10 _
с	KhES1 (hESC)	D				





図 2-7. 複数の多能性幹細胞株、異なる未分化維持培養条件における網膜分化誘導検討 A, C, E フィーダーフリー培養したヒト ES/iPS 細胞のコロニーの顕微鏡観察像。 B, D, F プレコンディショニング処理と Day0 SAG 添加検討した際の分化 18、22 日の顕微鏡 観察像、及び Chx10、Rx に対する免疫組織染色の蛍光顕微鏡観察像。 スケールバー: A, C, E 100 µm、B, D, F 200 µm

## 2-6. プレコンディショニング処理と Day0 SAG 添加に対する mRNA の発現変動の解析

新たに開発したプレコンディショニング処理と Day0 SAG 添加がヒト ES/iPS 細胞に対して どのような影響を与えて網膜組織への分化誘導を促進させているのか知るため、各分化誘導条 件における mRNA 発現解析を行った。

まず、プレコンディショニング処理の影響を調べるため、フィーダーフリー培養中の LPF11 ヒト iPS 細胞に対して①Control (非添加)、②Pre SB、③Pre LDN、④Pre SAG、⑤ Pre SB+SAG、⑥Pre LDN+SAG を添加し、翌日 RNA を回収して、qPCR 解析を行った。 TGF-β/Nodal/Activin/BMP シグナルの下流の因子 ID1 の発現量を解析したところ、TGFβ/Nodal シグナル阻害剤 SB と、BMP シグナル阻害剤 LDN を添加した②SB、③LDN、⑤ SB+SAG、⑥LDN+SAG の条件では、ID1 の発現が減少していた(図 2-8)。また、Nodal の発 現量については、TGF-β/Nodal シグナル阻害剤 SB を加えた②SB と⑤SB+SAG において発現 が減少していた。さらに、Shh シグナルの下流の因子 Gli1 と Patched-1 については、Shh を 活性化させる SAG を添加した④SAG、⑤SAG+SB、⑥SAG+LDN の条件で、発現が上昇して いた。これらの結果から、プレコンディショニング処理は予想通りのシグナルをヒト iPS 細胞 に与えていることが確認された。また、全条件において、多能性幹細胞マーカーOct3/4 の発 現量は大きく変わっていなかったことから、多能性に関してはプレコンディショニング処理 1 日間では大きな影響を与えない可能性が考えられた。また、興味深いことに②SB、③LDN、 ⑤SB + SAG、⑥LDN + SAG 処理では神経分化の初期マーカーSox1 の発現が上昇していた。 よって、SB や LDN の添加によって多能性幹細胞の性質は維持しつつも、神経系への分化の準 備が行われている状態であると示唆された。



図 2-8. プレコンディショニング処理した iPS 細胞における mRNA 発現解析 プレコンディショニング処理条件は左から Control (黒)、Pre SB(緑)、Pre LDN(赤)、Pre SAG(青)、Pre SB+SAG(緑)、Pre LDN+SAG(赤)。ヒト iPS 細胞 LPF11 株を使用。 平均値 ±SEM で示した。\*p < 0.05、\*\*p < 0.01、\*\*\*p < 0.001(Kuwahara et al., 2019)。

さらに、プレコンディショニング処理と Day0 SAG 添加による分化誘導開始後の継時的な mRNA 発現解析を行った。分化開始日、3 日、6 日、10 日、14 日の RNA を回収し、qPCR を 行った。多能性幹細胞マーカー(Oct3/4、Sox2)、神経系マーカー(Sox2、Sox1)、網膜系マ ーカー(Pax6、 Rx、Chx10)、中内胚葉マーカー(Gata4、Gata6、Hand1)の発現を GAPDH の発現を指標に解析した。分化 3 日では、多能性幹細胞マーカーOct3/4 の発現レベル がプレコンディショニング処理に関係なく減少していた(図 2-9)。多能性幹細胞マーカーでか つ神経系マーカーの Sox2 は Control では減少していたが、Pre SB + SAG, d0 SAG と Pre LDN + SAG, d0 SAG の条件では減少していなかった。さらに、神経系マーカーSox1 や網膜系マー カーPax6、Rx、Chx10 は分化 10 日以降、Pre SB + SAG, d0 SAG と Pre LDN + SAG, d0 SAG の条件で発現が上昇していた。興味深いことに、Control においては、分化 10 日から中内胚葉 系マーカーGata4、Gata6、Hand1 の発現レベルが上昇していた。これらの結果より、Pre SB + SAG, d0 SAG と Pre LDN + SAG, d0 SAG の条件では神経系への分化が促進されていること が確認された。一方で Control では神経系への分化が進まず、中内胚葉系に分化する傾向が示 された。よって、プレコンディショニング処理と Day0 SAG 添加は、フィーダーフリー培養し たヒト iPS 細胞を神経系に分化が進むようなバイアスを高めていることが示唆された。



図 2-9. プレコンディショニング処理と DayO SAG 添加後の継時的な mRNA 発現解析 プレコンディショニング処理条件は Control (黒)、Pre SB+SAG (緑)、Pre LDN+SAG (赤)。ヒト iPS 細胞 LPF11 株を使用。平均値 ±SEM で示した(Kuwahara et al., 2019)。

#### 2-7. 網膜分化誘導時における BMP4 の代替化合物の探索

リコンビナントタンパク質は一般にコストがかかる事が知られており、分化誘導でよく用い られるような低分子化合物は安定性が高く、安価で使い勝手が良い。現在、SFEBq法による 網膜分化誘導には BMP4 の添加が必須であることから、BMP4 を低分子化合物で置き換えら れないか、もしくは低分子化合物と併用して BMP4 の使用する濃度を減らせられないか検討 した。 網膜前駆細胞に分化すると Venus を発現する *Rx::*Venus レポーターヒト ES 細胞を用いて、 BMP シグナルを活性化させると報告されている 3 つの低分子化合物 SB-4、SJ000286237、 PD407824 (Checkpoint kinase 1 阻害剤: Chk1i) を分化 3 日に BMP4 の代わりに添加し、網 膜分化促進効果を評価した(Bradford et al., 2019; Feng et al., 2016; Genthe et al., 2017)。分化 9 日の凝集塊を観察したところ、どの化合物においても *Rx::*Venus の蛍光は観察されず、網膜 への分化促進効果は確認されなかった (図 2-10A)。

Feng らはヒト ES 細胞において PD407824 (PD) は BMP に対する感受性を向上させる効 果があり、BMP4 と併用で加えると低濃度の BMP4 においても BMP シグナルが入ることで中 胚葉や栄養外胚葉の分化を促進させる事を報告している(Feng et al., 2016)。Feng らの報告を 参考に、分化 3 日に BMP4 と併用で PD を添加したところ、通常使用する濃度 1.5 nM BMP4 と比べ、1/10 の濃度 0.15 nM BMP4 と 1 μM PD を加えた際、凝集塊全体で *Rx::* Venus が強く 観察された (図 2-10B)。



図 2-10. BMP4 を代替する網膜分化促進剤の探索

A. BMP4 代替候補化合物の単剤での網膜分化促進検討における分化9日の顕微鏡観察像。

## SJ: SJ000286237、PD: PD407824。

B. BMP4 と併用で PD を添加することによる網膜分化促進検討における分化 9 日の顕微鏡観察 像。スケールバー:200 μm

## 2-8.低濃度 0.15nM BMP4 と Chk1 阻害剤 PD を組み合わせた網膜分化誘導検討

0.15 nM BMP4 と 1 μM PD の同時添加によって *Rx::*Venus の蛍光が強く観察されたことか ら、従来の 1.5 nM BMP4 添加と比べて網膜分化誘導効率が向上しているか評価した。分化 14 日の凝集塊を観察したところ、1.5 nM BMP4 の条件と 0.15 nM BMP4 + 1 μM PD の条件、ど ちらも大多数の凝集塊において *Rx::*Venus 陽性の網膜組織が分化されていた(図 2-11A)。よ く観察すると、1.5 nM BMP4 の条件では *Rx::*Venus 陰性の網膜ではない細胞の塊が網膜組織 に付随していることが観察された。一方で、0.15 nM BMP4 + 1 μM PD の条件では *Rx::*Venus 陰性の細胞の塊はほとんど観察されず、全体が Rx::Venus 陽性の網膜組織に分化していた。 Rx::Venus 陰性の細胞塊が接着していない良好な網膜組織の割合を定量解析したところ、0.15 nM BMP4 + 1 µM PD では Rx::Venus 陰性の細胞の塊がほとんど付随していないことが確認で きた (図 2-11B)。よって、PD を BMP4 と同時に添加することで、使用する BMP4 の濃度を 減らすことができ、かつ目的外の非網膜細胞の分化を抑制することができた。PD を用いた分 化誘導法は将来の製造を考えた際のオプションの一つとして有用であると考えられる。



図 2-11. 低濃度 0.15 nM BMP4 と Chk1 阻害剤 PD の組み合わせた分化誘導検討 A. 分化 14 日の顕微鏡観察像。上段は 96 well V 底 plate の状態の写真、下段は回収して 90 cm ディッシュに移した後の写真。

B. 良好な網膜組織の割合の定量解析。平均値 ±SEM で示した。スケールバー:500 µm

## 2-9. プレコンディショニング処理と Day0 SAG 添加で分化誘導した網膜組織の長期培養評価

網膜シート移植は、長期培養して視細胞がある程度分化した分化 60~90 日の多層構造を形成した網膜組織を用いる。そこで次に、2-4 で示したプレコンディショニング処理と Day0 SAG 添加による改良網膜分化誘導法で作製した網膜組織を長期培養した際、網膜前駆細胞から視細胞等の網膜を構成する細胞が分化して、正確な位置に局在するか評価した。長期培養時、 層構造が良く維持された良好な網膜組織を作製するため、揺り戻し培養工程を行った。揺り戻し培養工程では分化 18 日の Pax6、Rx、Chx10 が全体に発現している網膜前駆細胞に対し、 GSK3β 阻害剤 CHIR99021 と FGF 受容体阻害剤 SU5402 を添加する RPE 誘導工程(網膜前駆細胞を一度 RPE に分化圧をかける)を3日間実施する(図2-12A-B) (Kuwahara et al., 2015)。 その後、Retina Mediumを用いて長期成熟培養を行った。このようにして長期培養した分化91 日の網膜組織を観察したところ、SB+SAG プレコンディショニング処理して分化誘導した網 膜組織では黒い色素をもった RPE が含まれる良好な網膜組織が形成された(図 2-12C-E 矢印)。 このような RPE が共存する網膜組織では、連続上皮で繋がっている網膜組織と RPE の境界面 に、網膜幹細胞のニッチ環境 Ciliary margin zone (CMZ) が形成され、良好な網膜組織が維持 されやすいことがわかっている(Kuwahara et al., 2015)。一方で LDN+SAG プレコンディショ ニング処理して分化誘導した網膜組織には RPE がほとんど含まれておらず、全体が網膜組織 に分化していた。

SB+SAG、LDN+SAG プレコンディショニング処理を行って分化誘導した網膜組織において、 視細胞等の神経細胞が分化していることを評価するため、各種マーカーに対する抗体を用いた 免疫組織染色を行い、共焦点顕微鏡で観察したところ、視細胞マーカーCrx や Recoverin、桿 体視細胞マーカーNRL、錐体視細胞マーカーRXRG 陽性の視細胞が最外層(Apical)に局在し、 視細胞層(ONL)様構造を形成して分化していることが観察された(図 2-12E-F)。また、 Chx10 と Pax6 共陽性の網膜前駆細胞は視細胞層の内側に局在しており、Chx10 陰性/Pax6 陽性の網膜神経節細胞やアマクリン細胞はさらに内側の基底膜(Basal)側に分化しているこ とが観察された。これらは生体の網膜の発生と同様の位置関係であり、プレコンディショニン グ処理と Day0 SAG 添加によって分化誘導した網膜組織においても、網膜を構成する細胞へ正 確に分化・局在することが確認できた。2 つのプレコンディショニング条件のうち、長期培養 時に良好な神経網膜上皮の形態を維持しやすい SB+SAG のプレコンディショニング処理を今 後用いることにした(以下、プレコンディショニング処理/Day0 SAG 添加法)。

Α	Preconditionin	AG	RPE-induction		NR-reversal		
	d-1	d0	d3	d18	d21		
	Maintenance culture	BMP met	BMP method		Induction-reversal method		
	StemFit, LM511-E8	gfCDM +	KSR	DME	DMEM/F12 + N2		
	SB or LDN	Y27632	hBMP4	CHIR	R+SU FBS	S + RA + taurine	
	SAG	SAG	1				







図 2-12. プレコンディショニング処理と DayO SAG 添加により作製した網膜の長期培養評価 A. プレコンディショニング処理、DayO SAG 添加、揺り戻し培養、長期成熟培養法の概略図。 B. 揺り戻し培養前の網膜組織の網膜系マーカーに対する免疫組織染色した蛍光顕微鏡観察像。 C. 分化 91 日の網膜組織の顕微鏡観察像。矢印は網膜組織と RPE が共存する網膜組織を示す。 D. 分化 91 日の 3 種類の網膜組織の形態の割合の定量解析結果。緑は神経網膜組織(Neural retina:NR)のみ、オレンジ色は神経網膜組織と RPE 共存型、グレーは小さな神経網膜組織 歯科形成されていないことを表す。平均値 ±SEM で示した。

E. 分化 91 日の網膜組織の蛍光顕微鏡観察像。視細胞前駆細胞マーカーCrx と Chx10 で免疫組 織染色。矢印は神経網膜組織と RPE が共存する網膜組織を示す。F. 複数の網膜のマーカーに 対する免疫組織染色後の共焦点顕微鏡観察像。スケールバー:F100 µm、B, C, E 200 µm

以上の結果よりフィーダーフリー培養したヒト ES/iPS 細胞に対するプレコンディショニン グ処理/Day0 SAG 添加法は、MEF で未分化維持培養したヒト ES 細胞と同等の網膜組織を安 定的に分化させることができ、臨床応用に向けた製法としての有用性を示すことができた。

#### 2-10. ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の HLA 分子の発現解析

フィーダーフリー培養したヒト ES/iPS 細胞から安定的に網膜組織を分化させることができ るようになったことから、次にヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の免疫学的な特徴を調べた。

HLA 分子は自分と他人を見分ける指標であり、細胞移植治療において移植細胞の HLA 分子 の発現が高いことは免疫細胞に認識されやすくなり、拒絶リスクが高くなるため移植治療の大 きな障壁となる。そこでまず、移植時期である分化 80 日前後のヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織 における HLA 分子の発現レベルをフローサイトメトリー解析で測定した。比較対象としてヒ ト iPS 細胞由来 RPE(hiPSC-RPE)を用いた。また、通常の培養条件に加え、2 日間 INF-γ添 加することで炎症を模倣した HLA 分子の発現上昇のポテンシャルについても評価した。その 結果、TLHD2 ヒト iPS 細胞由来網膜組織(hiPSC-retina)は、通常培養条件下では HLA Class I の発現は低く、HLA class II は発現していなかった(図 2-13A)。INF-γ を添加すると、HLA class I の発現が強く上昇し、INF-γ 添加したヒト iPS 細胞由来 RPE と同程度になった。一方で、HLA class II に関してはわずかな発現の上昇にとどまり、ヒト iPS 細胞由来 RPE と比較すると発現の上昇の度合いは低いレベルであった。ヒト ES 細胞由来網膜組織(hESC-retina)についても同様の解析を行い、同じ傾向を示すことを確認した(図 2-13B)。また、Crx::Venus 陽性の視細胞に着目して解析すると、HLA class I の発現が網膜組織全体と比較して低いレベル であった。よって、ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織は HLA 分子の発現レベルは低く、ヒト iPS 細胞由来 RPE よりも拒絶リスクが低いことが示唆された。



図 2-13. ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の HLA 分子の発現評価

A. ヒト iPS 細胞由来網膜組織とヒト iPS 細胞由来 RPE の HLA 分子に対するフローサイトメ トリー解析。

B. ヒト ES 細胞由来網膜組織の HLA 分子に対するフローサイトメトリー解析。

右半分は網膜組織中の Crx:: Venus 陽性視細胞前駆細胞集団をゲーティングして表示。

## 2-11. 免疫細胞との共培養によるヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の免疫原性の評価

眼球は免疫特権を有する組織ではあるが、病態による炎症や、移植時の侵襲による免疫特権の部分的な破綻によって、移植されたヒト ES/iPS 細胞由来網膜シートが免疫細胞と接触し認識・拒絶されるリスクがある。そこで、免疫細胞とヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の共培養による免疫応答を測定し、免疫原性について評価した。

視細胞移植治療の形態として、網膜シート移植と視細胞懸濁液移植の2つのアプローチがある。今回の免疫細胞と共培養による網膜組織の免疫原性の評価では、移植形態における差があるのか知ることも目的として、以下の3つの形態の網膜を用いて共培養した(図2-14A)。

- ① Single cells:網膜組織を酵素処理後、完全に分散にした状態。
- ② Semi-dissociate:網膜組織を酵素処理後、弱くピペッティングして少し崩れた状態。

### ③ Whole retina:網膜組織そのままの状態。

これら3つの形態の網膜を用意して、HLA が一致していない健常ドナー由来免疫細胞と4~5 日間共培養した後、各免疫細胞マーカーと免疫細胞の活性化の指標となる細胞増殖マーカー Ki67 に対して免疫染色して、フローサイトメトリー解析を行った(図2-14B)。Control として、 網膜組織を加えず、免疫細胞のみ培養したものをおいた。その結果、Single cell の状態で共培 養すると、Ki67 陽性の活性化 CD4 陽性ヘルパーT 細胞、CD8 陽性細胞障害性 T 細胞、CD11b 陽性単球/マクロファージの割合が Control と比べて上昇していた。NKG2A 陽性 Natural killer (NK)細胞に関しては差が見られなかった。一方で、Semi-dissociated や Whole retina では逆

に活性化している免疫細胞の割合がコントロールと比較して減少していた。特に Whole retina では減少の度合いが大きかった。さらに、T 細胞等から分泌され、炎症状態の指標となる INFγについても、Whole retina では共培養液中の濃度が大きく低下していることが ELISA の解析 から確認された。図 2-14 はヒト ES 細胞由来網膜組織の結果を示しているが、ヒト iPS 細胞由 来網膜組織においても同様の傾向を示すことを確認している。よって、ヒト ES/iPS 細胞由来 網膜において Single cell の形態では免疫原性が高い傾向にあったが、Whole retina では免疫原 性が低く、免疫抑制効果も有している可能性が示唆された。



図 2-14. ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織と免疫細胞との共培養による免疫応答の評価

A.3つの形態の網膜の顕微鏡観察像。

B. ヒト ES 細胞由来網膜組織と免疫細胞との共培養後のフローサイトメトリー解析。下の数値 は培養液中の IFN-γ の ELISA 測定の濃度を示す。Ki67 と各免疫細胞マーカー共陽性の活性化 細胞の割合を各プロットの右上に示した。同様の傾向について、ヒト iPS 細胞由来網膜組織で も確認をしている。

スケールバー:500 µm

#### 2-12. 免疫細胞との共培養によるヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の免疫抑制能の評価

生体において網膜組織の隣に位置する RPE は、免疫抑制能を有している事が知られている が、網膜組織について免疫抑制能を有するという報告は現在のところない(Sugita et al., 2006, 2016b, 2016c)。2-11 の結果より、ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の Whole retina の状態で共培 養すると活性化している免疫細胞の割合大きくが減少しており、免疫抑制効果が示唆された。 そこで、ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織が免疫抑制能を有するか調べるため、ヒト CD3/CD28 agonistic 抗体を用いて活性化させた免疫細胞に対して共培養を行い、フローサイトメトリー解 析によって免疫抑制能を調べた。その結果、免疫細胞のみ培養した Control と比較して、CD4、 CD8、CD11b、CD19、NKG2A 陽性の各種免疫細胞の活性化を強く抑えられ、ヒト iPS 細胞由 来 RPE と同様に免疫抑制効果が確認された (図 2-15A)。また、共培養後に顕微鏡観察したと ころ、Control では免疫細胞が増殖して細胞塊を形成していたが、ヒト ES 細胞由来網膜組織と 共培養した場合、細胞塊は小さい傾向にあり、網膜組織の近くでは細胞塊がほとんど確認され なかった (図 2-15B)。さらに、ヒト ES 細胞由来網膜組織の数を変えて免疫細胞と共培養させ たところ、網膜組織の数依存的に免疫抑制効果が高まることも確認された (図 2-15C)。これ らの結果より、ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織が免疫抑制能を有することが示された。



図 2-15. ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の免疫抑制能の評価

A. CD3/CD28 agonistic 抗体を加えて活性化させた免疫細胞に対するヒト iPS 細胞由来網膜との共培養後のフローサイトメトリー解析。比較対象として、ヒト iPS 細胞由来 RPE を用いた。 B. ヒト ES 細胞由来網膜組織と免疫細胞との共培養後の顕微鏡観察像。

C. ヒト ES 細胞由来網膜組織 5 個、10 個、15 個、20 個に対して免疫細胞を共培養させた後の フローサイトメトリー解析。Ki67 と各免疫細胞マーカー共陽性の活性化細胞の割合を各プロ ットの右上に示した。スケールバー:500 µm

## 2-13. ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の免疫抑制経路の探索

ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織が免疫抑制能を有することが示されたことから、次に免疫抑 制メカニズムの探索を行った。ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の免疫抑制が網膜組織と免疫細 胞の直接接触によるものか、それとも間接的な液性因子の分泌によるものか調べるため、細胞 は移動できないが液性因子は通過できるポアサイズ 0.3 µm の Transwell を用いて、ヒト ES 細 胞由来網膜組織をインサートの外側、免疫細胞をインサート内側で培養し、免疫抑制経路を調 べた。Control では接触できる Normal well 中で免疫細胞のみ培養したものを用いた。その結 果、接触できる Normal well と同等レベルの免疫抑制が Transwell を用いた共培養時において も観察された (図 2-16)。よって、免疫抑制はヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織と免疫細胞が直 接接触するのではなく、何らかの分泌される因子によって行われることが示唆された。



図 2-16. Transwell を用いたヒト ES 細胞由来網膜組織の免疫抑制メカニズムの探索 Transwell を用いたヒト ES 細胞由来網膜組織と免疫細胞共培養後のフローサイトメトリー解 析。Ki67 と各免疫細胞マーカー共陽性の活性化細胞の割合を各プロットの右上に示した。

## 2-14. ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の免疫抑制因子の探索

ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織による免疫抑制には何らかの分泌因子が関与していることが示された。そこで、RPE 等で免疫抑制に関わる遺伝子発現をヒト ES 細胞由来網膜組織において qPCR 解析して評価したところ、ヒト ES 細胞と比較して TGF- $\beta$ 2 の発現が非常に高い事が示された(図 2-17A)。同様にヒト iPS 細胞由来網膜組織も TGF- $\beta$ 2 が高発現していることが確認された(図 2-17B)。TGF- $\beta$ 2 はヒト iPS 細胞由来 RPE においても発現しており、免疫抑制に関与している事が知られていることから、TGF- $\beta$ 2 に着目して検討を進めた。ヒト ES 細胞由来網膜組織が TGF- $\beta$ 2 を実際に分泌しているか確認するため、ヒト ES 細胞由来網膜組織の培養上清中の TGF- $\beta$ 2 の分泌量を ELISA で測定したところ、網膜組織の数依存的に検出した(図 2-17C)。また、ヒト ES 細胞由来網膜組織1個当たり 29.6±2.8 pg/mL、ヒト iPS 細胞由来網膜組織では 32.4±2.0 pg/mL と同レベルの分泌量が検出された(図 2-17D)。

ヒトES細胞由来網膜組織は未熟な段階で移植され、移植後に成熟化する。成熟化後もTGFβ2を分泌しているか調べるため、長期成熟培養した網膜組織のTGF-β2の分泌量を測定したと ころ、TGF-β2 は分化 50 日から 240 日まで一貫して分泌していることが確認された(図 2-17E)。その中でも分化 100 日から 160 日までが多く分泌していた。網膜組織の大きさは分化 100 日から 160 日程度をピークに、長期培養すると小さくなる傾向があることから、網膜組織 1 個あたりの細胞数が分泌量に影響していると考えられる。



図 2-17. 免疫抑制因子の探索と TGF-β の発現解析・培養上清中の分泌量の測定 A. qPCR によるヒト ES 細胞由来網膜組織の免疫抑制関連因子の発現解析。ヒト ES 細胞と比 較した発現量を比較。

B. ヒト iPS 細胞、ヒト iPS 細胞由来 RPE、ヒト iPS 細胞由来網膜組織の TGF-β1, 2, 3 の発現 解析。ヒト iPS 細胞の発現を 1 とした際の ΔΔCt 値を示す。

C-E. ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織 TGF-β2 の培養上清中の分泌量を ELISA で測定。平均値 ±SEM で示した。

#### 2-15.ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織が分泌する TGF-β の免疫抑制への関与

実際にヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織が分泌する TGF- $\beta$  が免疫細胞に対する免疫抑制に関与 しているか調べるため、共培養中に TGF- $\beta$  中和抗体、又は TGF- $\beta$  受容体阻害剤 SB431542 を 添加することで、免疫抑制が減弱するか調べた。今回、5 人の健常ドナー由来 PBMCs を混合 する mixed lymphocyte reaction (MLR) 反応により活性化させた免疫細胞に対し、ヒト ES 細胞 胞由来網膜組織を共培養した。まず、免疫細胞のみ培養した Control と比較し、ヒト ES 細胞 由来網膜組織を共培養すると活性化 CD4、CD8 陽性 T 細胞の割合が 1/3 程度減少しており、 免疫抑制が確認された。また、比較対象としてヒト ES 細胞由来網膜組織に加えて mouse lgG 抗体を添加した場合も同様の免疫抑制が確認された。その上で、TGF- $\beta$  中和抗体を添加した条 件では免疫抑制効果が少し減弱し、TGF- $\beta$  受容体阻害剤 SB431542 を添加した条件ではさらに 減弱して Control と同程度となっていた (図 2-18)。これらの結果より、ヒト ES 細胞由来網膜 組織から分泌される TGF- $\beta$  は、免疫抑制に重要な因子であることが示唆された。



図 2-18. TGF-β 中和抗体、TGF-β 受容体阻害剤 SB を添加した際の免疫抑制効果の減弱 ヒト ES 細胞由来網膜組織と免疫細胞の共培養後のフローサイトメトリー解析。Ki67 と各免疫 細胞マーカー共陽性の活性化細胞の割合を各プロットの右上に示した。

#### 第3節 考察

## フィーダーフリー培養したヒト ES/iPS 細胞を用いた網膜分化誘導検討

2015 年に理化学研究所を中心とした Takahashi · Mandai らが実施した「滲出型加齢黄斑変 性に対する自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮シート移植に関する臨床研究」では、患者の皮膚由 来の繊維芽細胞をフィーダー細胞として用いて患者 iPS 細胞を樹立し、RPE に分化させて移植 した(Mandai et al., 2017b)。この臨床研究から、フィーダー細胞を用いて培養したヒト iPS 細 胞においても、少数の患者に対して製造することができることがわかる。しかし、将来の製造 を考えた場合、StemFit と iMatrix511 を用いたフィーダーフリー培養法は、臨床応用の観点で メリットが非常に大きい。そこで今回、フィーダーフリー培養したヒト ES/iPS 細胞を用いた 網膜分化誘導検討を行い、プレコンディショニング処理と Day0 SAG 添加による改良分化誘導 法を開発した。

ヒト ES/iPS 細胞において未分化を維持するためには FGF2 の添加が必須である事が知られ ている。一般にフィーダーフリー培養用の未分化維持培地には高度に未分化を維持しながら大 量に増殖させるために高濃度の FGF2 が含まれている事が多い。ヒト ES/iPS 細胞はフィーダ ー培養と比べ、フィーダーフリー培養した場合にどのような性質の変化が起こるのか詳細は不 明ではあるが、少なくともフィーダーフリー培養では、高濃度の FGF2 添加による強い未分化 維持圧がかかっている事が想定される。一つの可能性として、強い未分化維持圧がかかった状 態から、突然 SFEBq 法による網膜組織への分化培養に切り替えると細胞は適応できずに死ん でしまう事が考えられる。今回の qPCR 解析より、プレコンディショニング処理されたヒト ES/iPS 細胞は、TGF-β シグナルのターゲット遺伝子 ID1 や神経分化の初期マーカーである Sox1 の発現が上昇していたことから、プレコンディショニング処理はフィーダーフリー培養 中の強い未分化維持の圧から、緩やかに神経系への分化しやすいような状態の変化を引き起こ しているのではないかと推測される。

さらに、プレコンディショニング処理時にSBかLDNを用いるかによって、神経網膜とRPE が共存する網膜組織か、全体が網膜組織になっているかといった作り分けも可能であることも 示すことができた。分化開始前1日間のみの処理によって、その後の細胞の運命や形態をコン トロールできることは、非常に興味深いと考えている。今回は、SBやLDN、SAGを用いた分 化誘導検討を行ったが、その他の発生に関与するシグナルを調節する化合物をプレコンディシ ョニング処理することで、今まで作り出せなかった組織を作り出すことも可能になるかもしれ ない。

#### 低濃度の BMP4 と Chk1 阻害剤を組み合わせた網膜分化誘導法検討

今回、BMP4 の代替となる化合物を探索したところ、Chk1i である PD を通常使用する 1/10 の濃度の BMP4 と同時に加えることで、網膜組織の分化促進に加え、目的外細胞の分化を抑制 することを見出した。Feng らが報告するように、PD による BMP シグナルの感受性が高まっ たことで、1/10 の濃度の BMP4 においても、効率よく BMP シグナルが入るようになったので はないかと推測される(Feng et al., 2016)。

細胞医薬は一般的に高額になる傾向にあり、製造ステップにおいてコストのかかる試薬の使 用量を減らすことは重要である。特にリコンビナントタンパク質は高価な試薬の一つとして知 られており、低分子化合物に置き換えることができれば、理想的である。BMP シグナルの制 御に用いられる低分子化合物の多くは阻害剤であり、LDN193189 や Dorsomorphin、DMH1 等 がよく用いられている。一方で活性化剤は Feng らが報告しているように現在見いだされてい るものについては活性が弱く、BMP4 の追加の添加がなければ効果は限定的である(Feng et al., 2016)。今回の 3 つの低分子化合物単剤での BMP4 代替検討した際、網膜分化促進効果は確認 されなかったことからも、BMP シグナルを強く活性化させるには低分子単体では難しい可能 性が考えられる。本章で示したように、低分子化合物を併用で添加し、使用する BMP の濃度 を減らすることが、現実的ではないかと考えられる。

### ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の免疫学的な特性の解析

眼球は免疫特権領域として知られているが、網膜組織の免疫学的な特性についてはよく解析 されていなかった。今回、ヒトES/iPS細胞由来網膜組織の免疫学的な特徴について調べたと ころ、HLA分子の発現は低いレベルにあり、免疫原性が低いことがわかった。さらに、ヒト ES/iPS細胞由来網膜組織から分泌されたTGF-β による免疫抑制能も確認された。これらの性 質から、ヒトES/iPS細胞由来網膜組織の拒絶リスクは低いことが示唆され、ヒトiPS細胞由来 RPE移植時のようなステロイドに加えてシクロスポリンやタクロリムス等の免疫抑制剤の投与 については必要がない可能性も考えられる(Kashani et al., 2018)。このように今回の免疫学的 な特性の解析を通して、ヒトES/iPS細胞由来網膜組織の新たな有用性を示すことができた。

一般的に神経系の細胞・組織は、HLA分子の発現レベルが低いことが知られており、ヒト ES/iPS細胞から分化させた細胞であれば、神経幹/前駆細胞や神経堤細胞、ドパミン神経等、 複数の神経細胞においてHLA分子の発現レベルは低いことが報告されている(Fujii et al., 2019; Itakura et al., 2017; Morizane et al., 2017; Ozaki et al., 2017)。HLA分子の発現の程度が低い神 経系の細胞を用いた移植治療は、それだけでアドバンテージになると考えられる。さらに、中 枢神経系のように免疫特権領域に細胞移植する場合、移植の侵襲等で一時的にバリア機能が破 綻して免疫特権が損なわれる可能性があるが、移植数週間・数か月後に回復すれば、免疫抑制 剤の投与を中止しても問題ないことも想定される。

今回、ヒトES/iPS細胞由来網膜組織は低い免疫原性に加え、活性化した免疫細胞に対する 免疫抑制能を有していること、TGF-βが免疫抑制において重要な役割を果たしていることを示 してきた。網膜色素変性やAMDなどの疾患において、病態の背景として炎症がおきているこ とが知られている(Ambati et al., 2003; Edwards et al., 2005; Mandai et al., 2012; Wooff et al., 2019)。さらに移植による侵襲によっても炎症が引き起こされるが、その際にヒトES/iPS細胞 由来網膜組織は、免疫拒絶反応が起きにくいだけでなく、移植箇所の炎症を抑制し、免疫環境 の再構築や、場合によっては免疫特権の回復に貢献できる可能性も期待できる。今後、実際に ES/iPS細胞由来網膜組織の移植実験を通して、免疫拒絶反応の起きやすさの程度や、どのよ うにすれば免疫拒絶を回避できるのかといった研究に期待したい。

## 第二章

# 有効性向上を目的とした *Islet-1* KO ヒト ES 細胞由来

網膜組織の評価

#### 第1節 緒言

視細胞の移植方法として、ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織から視細胞のみをセルソーター等 で純化・濃縮した「視細胞懸濁液移植」と、網膜組織の一部を切り出した「網膜シート移植」 の2つアプローチがある。懸濁液移植では、視細胞の純化工程を経るため、不要な細胞を持ち 込まないことから、効率的に移植した視細胞がホスト双極細胞とコンタクトできる利点がある。 しかし、長期生着や視細胞外節の形成、視細胞層(Outer Nuclear Layer:ONL)構造の形成が なされにくいなど、生着や成熟に関して課題がある。一方で、網膜シート移植は多層の網膜組 織の状態で移植するため、長期間生着する傾向にあり、上記懸濁液移植の課題である成熟につ いても利点がある。さらに、第一章で述べたように網膜シート移植では低い免疫原性に加え、 免疫抑制能が期待できる(Yamasaki et al., 2021)。しかし、理化学研究所の Takahashi、Mandai らの臨床に向けた移植研究を通して、網膜シート移植ならではの課題が見つかってきた。網膜 シート移植では視細胞を純化していないことから、不要な双極細胞が同時に移植されてしまい、 ホストーグラフトのコンタクトが阻害され、グラフト内の視細胞ー双極細胞間でシナプス接続 することで、ホスト双極細胞とのシナプス接続を競合してしまう事が見出されてきた(図 3-1)



網膜組織移植の課題



そこで、シート移植の生着・成熟が良い利点は維持しながらも、ホスト双極細胞とグラフト 視細胞のコンタクトを促進させるために、移植時に持ち込む双極細胞を減らすことが重要と考 え、双極細胞の分化や成熟に関わる転写因子 *Islet-1*(*ISL1*)遺伝子を欠損させるアプローチを 考えた。既報の *ISL1* コンディショナル KO マウスの解析から、*ISL1* を KO させると桿体双極 細胞を含む ON 型双極細胞等、視細胞移植治療という観点で不要な細胞が減少するということ が報告されている(Elshatory et al., 2007)。そこで、Mandai らは先行して、*ISL1* を KO させた *ISL1*-\*マウス ES/iPS 細胞由来網膜組織を分化誘導して移植したところ、ホストーグラフトの コンタクトやシナプス接続が向上し、視機能回復効果が向上したことを報告した(Matsuyama et al., 2021)。しかし、ヒトにおいては *ISL1* が双極細胞の分化を制御しているのかは詳しく調 べられていない。また、*ISL1* を KO させた際、網膜組織の作製の影響や、視細胞分化の影響も 詳しく知っておく必要がある。本章では、より有効性が期待される新規視機能再生技術開発と して、臨床応用を前提に *ISL1*-\*ヒト ES 細胞由来網膜組織を作製し、網膜分化の影響や双極細 胞の分化抑制、移植後の視機能回復について解析を行った(図 3-2)。

## Islet-1 KO ES/iPS細胞由来網膜組織の作製



図 3-2. ISL1 を KO した ES/iPS 細胞由来網膜シート移植のイメージ

## 第2節 結果

## 2-1. ISL1 KO ヒト ES 細胞株の樹立

まず初めに CRISPR/Cas9 システムを用いて *ISL1*<sup>+</sup>ヒト ES 細胞株 (*Crx:*:Venus レポーター 株)の樹立を行った。*ISL1* 遺伝子のスタートコドン上流と LIM1 ドメイン下流をターゲットと した gRNA をデザインし、Cas9 と同時に発現させる All in one vector を構築した (図 3-3A-B)。エレクトロポレーション法でヒト ES 細胞に導入し、Puromycin で選別を行った。選別下 で増殖したコロニーをピックアップし、電気泳動及びシークエンス解析により、目的箇所で切 断された *ISL1*<sup>+</sup>ヒト ES 細胞株を 2株 (330A16 株と 330A19 株)樹立した (図 3-3C)。樹立後 も良好なコロニーの形態を維持しており、免疫細胞化学染色により Oct3/4 と Nanog の発現も 確認できたことから、未分化を維持したまま培養できる事を確認した (図 3-3D)。


C. 電気泳動及びシークエンス解析による *ISL1* KO の確認。矢印の No.16 と 19 の株で *ISL1* KO を確認し、シークエンス解析を行った。

D. 樹立した *ISL1*<sup>-/</sup>ヒト ES 細胞のコロニーの形態、多能性幹細胞マーカーOct3/4 と Nanog に 対する免疫細胞化学染色(ICC)を行った蛍光顕微鏡観察像。スケールバー:500 μm

# 2-2. ISL1<sup>-/-</sup>ヒト ES 細胞からの網膜組織分化の確認

樹立した *ISL1*<sup>-/-</sup>ヒト ES 細胞をプレコンディショニング処理/Day0 SAG 添加法を用いて網 膜組織への分化誘導を行った。分化 15 日において、WT(野生型)ヒト ES 細胞と遜色なく、 *ISL1*<sup>-/-</sup>ヒト ES 細胞においても凝集塊が形成され、網膜前駆細胞マーカーChx10 の発現を確認 した(図 3-4A-B)。さらに、移植時期である分化 60 日に観察すると、WT ヒト ES 細胞由来網 膜組織(以降、WT 網膜)と同様に、*ISL1*<sup>-/-</sup>ヒト ES 細胞由来網膜組織(以降、*ISL1*<sup>-/-</sup>網膜)に おいても、層構造を有する自己組織化した網膜組織が作製されており、*Crx::*Venus 陽性の視細 胞前駆細胞も分化していることも観察した(図 **3-4C**)。よって、*ISL1* を KO させても WT と同様の網膜組織を作製できることを確認した。

次に*ISL1*<sup>-</sup>網膜において、ISL1の発現が消失しているか免疫組織染色、及びフローサイトメトリー解析で評価した。網膜発生初期に分化する Brn3 陽性の網膜神経節細胞も、双極細胞と同様に ISL1 を発現していることが知られている。そこで、Brn3 と ISL1 を免疫組織染色して観察したところ、WT 網膜は基底膜(Basal)側に Brn3 と ISL1 共陽性の網膜神経節細胞が分化していることが確認された(図 3-4D)。一方で、*ISL1*<sup>-</sup>網膜では、Brn3 陽性の網膜神経節細胞の存在は確認されたが、ISL1 の発現は確認されなかった。さらに、フローサイトメトリー解析で ISL1 発現細胞を評価したところ、WT 網膜において確認されていた Crx 陰性/ISL1 陽性の細胞集団が、*ISL1*<sup>-</sup>網膜では消失していることが観察された(図 3-4E 赤枠)。よって、目的通り *ISL1*<sup>-</sup>網膜において ISL1 の発現を消失させることができていることを確認した。



図 3-4. ISL1<sup>--</sup>ヒト ES 細胞から網膜分化、及び ISL1 発現の消失の確認

A. 分化 15 日の凝集塊の顕微鏡観察像。

B. 分化 15 日の凝集塊の Chx10 に対する免疫組織染色した蛍光顕微鏡観察像。

C. 分化 60 日の網膜組織の顕微鏡観察像、及び Crx:: Venus の蛍光観察像。

D. ISL1、網膜神経節細マーカーBrn3 に対する免疫組織染色後の共焦点顕微鏡観察像。

E. 分化 54 日の網膜組織に対して、ISL1 と Crx に対する抗体を用いたフローサイトメトリー

解析。ISL1 は PE conjugate、Crx は Alexa 647 conjugate された抗体を使用。

スケールバー: A, C 500 µm、B 100 µm、D 20 µm

# 2-3. ISL1<sup>-</sup> ヒト ES 細胞由来網膜組織の網膜神経節細胞と視細胞分化への影響

ヒトの網膜組織における ISL1 の機能について、これまで詳細に調べられていないことから、 *ISL1*を KO させることで網膜組織構造の乱れや各種網膜の細胞への分化について何らかの影響 が懸念される。そこで、*ISL1*の KO による網膜発生の前半に生み出される Brn3 陽性の網膜神 経節細胞と Crx::Venus 陽性の錐体視細胞の分化の影響を調べるため、継時的なフローサイト メトリー解析を行った。その結果、WT 網膜・*ISL1*<sup>--</sup>網膜共に分化 40 日頃から Brn3 陽性網膜 神経節細胞が分化した後、急激に減少し、分化 110 日には 5%程度にまで減っていた(図 3-5A)。一方で、Crx::Venus 陽性の視細胞前駆細胞の割合も WT 網膜も *ISL1*<sup>--</sup>網膜も共に分化 40 日頃から急激に増加し、その後も徐々に増えていることが確認された(図 3-5 B)。よって、網 膜神経節細胞と視細胞前駆細胞の分化に関して *ISL1* を KO させることによる大きな影響は確 認されなかった。さらに、分化 60 日の網膜組織を構成する細胞の組成をフローサイトメトリ ー解析によって評価したところ、WT 網膜と *ISL1<sup>--</sup>*網膜共に Chx10 陽性 / Crx 陰性の神経網膜 前駆細胞(Retinal Progenitor cell : RPC)が 30-40%、Pax6 強陽性(Pax6<sup>++</sup>)の網膜神経節細 胞(RGC)及びアマクリン細胞(amacrine cells : AC)が 20-30%、Crx::Venus 陽性 / Rxrγ 陽 性の錐体視細胞(Cone)が 20%程度であり、大きな差は確認されなかった(図 3-5C)。よっ て、*ISL1*を KO しても網膜組織の発生の前半に関して大きな影響がないことを確認した。



A. Brn3 に対する抗体を用いたフローサイトメトリー解析による継時的な網膜神経節細胞の割 合の測定。B. Crx::Venus を指標としたフローサイトメトリー解析による継時的な視細胞の割 合の測定。C. 分化 60 日の網膜組織のフローサイトメトリー解析による、神経網膜前駆細胞 (RPC)、網膜神経節細胞(RGC)、網膜神経節細胞とアマクリン細胞(RGC, AC)、錐体。視 細胞(Cone)の割合の測定。平均値 ±SEM で示した。

#### 2-4. ISL1<sup>-</sup>・ヒト ES 細胞由来網膜組織の長期培養時の視細胞と双極細胞への分化の影響

生体における網膜組織の発生の後半では、桿体視細胞や双極細胞が分化する。*ISL1* KO した 網膜組織の視細胞分化に対する影響と、本研究の目的である双極細胞の分化抑制という Phenotype を確認するため、WT 網膜と *ISL1*<sup>-/</sup>網膜を分化 240 日まで長期培養して、免疫組織 染色解析、及びフローサイトメトリー解析を行った。分化 240 日になると、網膜組織の外 (Apical)側表面に繊毛様組織が出現していることが確認され、*Crx::*Venus の発現も強くなり、 視細胞の成熟が観察された(図 3-6A 矢印)。視細胞マーカーRecvoverinを免疫組織染色して観 察したところ、WT 網膜と *ISL1<sup>-/</sup>*網膜共に *Crx::*Venus / Recoverin 共陽性の視細胞が Apical 側 に局在して、視細胞層(ONL)様構造を形成していた(図 3-6B)。フローサイトメトリー解析 において、*Crx::*Venus 強陽性 / Recoverin 陽性の視細胞全体の割合、*Crx::*Venus 強陽性 / Cone arrestin 陽性の錐体視細胞の割合を解析したところ、WT 網膜と *ISL1<sup>-/</sup>*網膜では大きな差はな く、むしろ *ISL1<sup>-/</sup>*網膜の方が少し多い傾向にあった(図 3-6C-D)。よって、*ISL1*をKO した網 膜組織においても、長期培養による視細胞分化には大きな影響がないことが確認できた。





図 3-6. 長期培養時の視細胞の分化の評価

A. 分化 240 日の網膜組織の顕微鏡観察像、及び Crx:: Venus の蛍光観察像。

B. 分化 240 日の網膜組織の Recoverin に対する免疫組織染色した共焦点顕微鏡観察像。
C. 分化 240 日の網膜組織の Recoverin に対する抗体を用いたフローサイトメトリー解析。
D. 分化 240 日の網膜組織のフローサイトメトリー解析による、Recoverin 陽性/Crx::Venus 強陽性の全視細胞の割合、Cone arrestin 陽性/Crx::Venus 強陽性の錐体視細胞の割合の測定。平均値 ±SEM で示した。スケールバー: A 500 μm、B 20 μm

次に分化を抑制したい双極細胞について評価した。分化 240 日の網膜組織に対し、ON 型双 極細胞マーカーGoa と桿体双極細胞マーカーPKCa を免疫組織染色して観察した。その結果、 WT 網膜では Goa 陽性 ON 型双極細胞、PKCa 陽性桿体双極細胞が視細胞層のすぐ内側(基底 膜側)に分化・局在していることが確認された(図 3-7A-B)。フローサイトメトリー解析では *Crx::*Venus 弱陽性の集団において Goα や PKCα、L7 陽性の双極細胞集団が確認された(図 3-7C)。一方で *ISL1*<sup>→</sup>網膜では、免疫組織染色及びフローサイトメトリー解析どちらにおいても、 これらの双極細胞の集団が消失していることが確認された。よって、*ISL1*をKOさせることに よって、狙い通り ON 型双極細胞や桿体双極細胞の分化が抑制されていることを確認できた。





B. 分化 240 日の網膜組織の PKCα 陽性桿体双極細胞の共焦点顕微鏡観察像。

C. 分化 240 日の網膜組織の Goa、及び PKCa に対する抗体を用いたフローサイトメトリー解析。D. 分化 240 日の網膜組織のフローサイトメトリー解析による、Goa 陽性/Crx::Venus 弱陽性の ON 型双極細胞の割合、PKCa 陽性/Crx::Venus 弱陽性桿体双極細胞の割合、L7 陽性/Crx::Venus 弱陽性の桿体双極細胞の割合の測定。平均値 ±SEM で示した。スケールバー: 20 μm

### 2-5. ISL1<sup>-</sup>・ヒト ES 細胞由来網膜シート移植後の生着、双極細胞の分化の評価

上記のように、in vitro で培養した網膜組織の解析では ISL1 KO による視細胞分化に大きな 影響はなく、ON 型双極細胞の分化は抑制されるという目的通りの Phenotype を確認してきた。 次に ISL1<sup>+</sup>網膜の移植後の生着や成熟、双極細胞の分化の影響について評価するため、生後 16~25 週の RD-nude ラットに対して、分化 60 日前後の WT 網膜シート、及び ISL1<sup>+</sup>網膜シー トを移植した (図 3-8A)。移植する網膜シートは網膜組織から Crx::Venus が発現している領域 を Microscissors で切り出して準備した (図 3-8B)。移植後 2 週、4 週、24 週に ISL1<sup>-</sup>網膜を 移植したラットの眼底を蛍光観察したところ、Crx::Venus 陽性の視細胞が生着していることが 観察できた。さらに、移植後 24 週になると Crx::Venus の蛍光が強くなり、視細胞ロゼット (球状)構造がはっきりと確認できるようになった (図 3-8C)。



図 3-8. RD-nude ラットへ網膜シート移植

A. ヒト ES 細胞由来網膜網膜シートの用意、及び RD-nude rat へ移植するイメージ

B. Crx::Venus 陽性領域を指標に、移植する網膜シートの切り出し。

C. 移植後 2 週間、4 週間、24 週間後の蛍光眼底観察像。スケールバー: B 500 µm

ISL1<sup>-</sup>網膜の移植後の生着・成熟を詳細に評価するため、移植 180 日(分化 240 日相当)以降の RD-nude ラット網膜を PFA 固定し、切片を作製後、免疫組織染色して、共焦点顕微鏡観察を行った。WT 網膜・ISL1<sup>-</sup>網膜共に ONL 様構造有する視細胞ロゼットが多数観察され、視細胞の生着を確認した(図 3-9)。さらに、視細胞ロゼット内に、Rhodopsin 陽性の桿体視細胞、S-opsin や L/M-opsin 陽性の錐体視細胞が分化しており、視細胞が成熟していることも観察した。よって、ISL1<sup>-</sup>網膜移植において、WT 網膜移植と同様の視細胞の生着・成熟を確認できた。



図 3-9. *ISL1*<sup>-/</sup>ヒト ES 細胞由来網膜シートの移植後の生着・成熟の評価 移植後の RD-nude ラット網膜における Rhodopsin, S-opsin、L/M-opsin 陽性の桿体視細胞・ 錐体視細胞の共焦点顕微鏡観察像。スケールバー:上段 100 μm、下段 20 μm

次に *ISL1*→網膜の移植後に ISL1 陽性細胞が存在しないことを確認するため、ISL1 抗体とヒ ト特異的 Ku80 抗体を用いてヒトとラットの核を区別させた状態で、ヒト Ku80 と ISL1 共陽性 細胞を観察した。その結果、WT 網膜では移植した視細胞ロゼットを取り囲むようにヒト Ku80/ISL1 共陽性細胞が存在しており、ホストーグラフトのコンタクトを阻害している様子 が観察された(図 3-10 白矢印)。一方で、*ISL1*→網膜では、ヒト Ku80/ISL1 共陽性細胞は確 認されず、視細胞ロゼットとヒト Ku80 陰性のホスト ISL1 陽性細胞(主に ON 型双極細胞)と の距離が近くなっており、コンタクトが改善している像を多数確認できた。



図 3-10. *ISL1*<sup>≁</sup>ヒト ES 細胞由来網膜シートの移植後のヒト由来 ISL1 陽性細胞の評価 移植後の RD-nude rat 網膜における ISL1 及びヒト Ku80 陽性のヒト由来 ISL1 陽性細胞の共焦 点顕微鏡観察像。スケールバー:上段 100 μm、下段 20 μm

*in vitro* 長期培養時と同様に、移植後も *ISL1*<sup>-</sup>網膜では Goα や PKCα 陽性の双極細胞が分化 していないか確認するため、ヒト Ku80 と Goα、PKCα に対する免疫組織染色を行い、共焦点 顕微鏡観察を行った。WT 網膜では視細胞ロゼットを取り囲むようにヒト Ku80/Goα、PKCα 陽性の双極細胞が観察され、場所によってはグラフト内で双極細胞層が確認された(図 3-11)。 一方で、*ISL1*<sup>-</sup>網膜ではヒト Ku80 陽性領域には Goα、PKCα 陽性の双極細胞は確認されず、 むしろホストの双極細胞の樹状突起がグラフト側に伸びてきている像が確認された。よって、 移植後においても *ISL1* を KO したことによる、双極細胞の分化抑制を確認できた。よって、 *ISL1<sup>-/</sup>網膜の移植後においても、目的の* Phenotype を発揮する事を確認できた。



図 3-11. *ISL1*<sup>-</sup>ヒト ES 細胞由来網膜シートの移植後の双極細胞の分化評価 移植後の RD-nude ラット網膜における Goα 陽性 ON 型双極細胞、PKCα 陽性桿体双極細胞の 共焦点顕微鏡観察像。スケールバー: 100 μm

## 2-6. ISL1<sup>-+</sup>ヒト ES 細胞由来視細胞の移植後の機能的な成熟の評価

視細胞は Phototransduction 経路を介して眼の中に入ってきた光情報を化学情報に変換し、 最終的に電気情報に変えて情報伝達する(Yau and Hardie, 2009)。外節に局在する視物質 (Opsin)が光受容することによって活性化され、Transducin を活性化する。それに伴い PDE (Phosphodiesterase)が活性化し、cGMPを分解され、最終的に CNG チャネルが閉じること で、カリウムイオンとナトリウムイオンの電位差を生じさせて電気シグナルに変換する。これ らの一連の Phototransduction 経路によって、視細胞は神経伝達物質の放出の制御を行い、水 平細胞と双極細胞に情報伝達する(図 3-12)。



図 3-12. 視細胞における Phototransduction 経路

桿体視細胞の Phototransduction 経路に関わるタンパク質を青字、錐体視細胞のタンパク質名 を赤字、共通で関わるタンパク質を緑字で示す。

移植後の *ISL1*<sup>-/</sup>ヒト ES 細胞由来視細胞について、光情報を化学・電気シグナルに変換する ポテンシャルを有しているかという機能的な成熟に至っているか評価するため、 Phototransduction 経路に関わるタンパク質の発現を観察した。まず、*ISL1*<sup>-/</sup>網膜移植後に視細胞外節マーカーPRPH2 を免疫組織染色して観察したところ *Crx::*Venus 陽性の視細胞ロゼットの内部空間に発現していることを観察した(図 3-13A)。その内部空間に、桿体視細胞のPhototransduction 経路に関わる Rhodopsin, GRK1, S-arrestin, GNAT1, PDE6 $\alpha$ /6 $\beta$ , CNGB1 が発現していることを観察した(図 3-13B-H)。また、錐体視細胞のPhototransduction 経路に関わる S-Opsin, L/M-Opsin, cone-arrestin, GNAT2, PDE6H, CNGB3 の発現も観察した(図 3-13I-M)。さらに、桿体視細胞と錐体視細胞両方に関与する GUCY2D, GUCY2F, GUCA1A, GUCA1B についても発現を観察した(図 3-13O-R)。これらの結果、移植した *ISL1*<sup>-/</sup>網膜由来 視細胞は外節の形成だけでなく、Phototransduction 経路に関わる一連のタンパク質群を発現しており、視細胞ロゼットの中で機能的な成熟が進んでいることが示唆された。



図 3-13. *ISL1*<sup>-</sup>網膜移植後の Phototransduction 経路に関与するタンパク質の発現解析 *ISL1*<sup>-</sup>網膜移植後の Phototransduction 経路のタンパク質群に対する共焦点顕微鏡観察像。 スケールバー:20 µm

Interphotoreceptor matrix (IPM) は生体網膜において、RPE と視細胞の間の空間に存在する 微小環境を構成する因子であり、網膜組織と RPE の接着や視細胞の整列、レチノイドの輸送 等、重要な機能を有する(Ishikawa et al., 2015)。そこで次に、IPM を構成する因子の免疫組織 染色を行い、移植後の視細胞ロゼット内の状況や微小環境が整えられているのか評価を行った。 その結果、視細胞ロゼットの内部において、IPM の重要な構成因子である IMPG1 (SPACR), IMPG2 (SPARCAN), IRBP, CD44, Versican, Brevican の発現が確認された(図 3-14)。RPE と隔離された視細胞ロゼット内部において IPM の発現が確認されたことから、IPM は視細胞や ミュラーグリアが発現して分泌している事が示唆された。また、視細胞ロゼット内部に視細胞 が機能する微小環境が整っている可能性が示された。



図 3-14. *ISL1*<sup>-</sup>網膜移植後の Interphotoreceptor matrix 関連タンパク質の発現解析 *ISL1*<sup>-</sup>網膜移植後の Interphotoreceptor matrix を構成するタンパク質群に対する共焦点顕微鏡 観察像。スケールバー:20 µm

#### 2-7. 移植した視細胞とホスト双極細胞のコンタクト率の評価

2-5 において、*ISL1*<sup>-</sup>網膜を移植した際、ON 型双極細胞や桿体双極細胞が観察されず、移植 した視細胞とホスト双極細胞のコンタクトが改善されている像が観察された。そこで、*ISL1*<sup>-/</sup> 網膜由来視細胞とホスト双極細胞とのコンタクトについて、詳細に定量解析を行った。定量化 の方法として、ヒト Ku80、Recoverin、PKCα に対して免疫組織染色を行い、ヒト Ku80 と PKCα によるホスト/グラフトの桿体双極細胞を区別した状態で、Recoverin 陽性の視細胞と のコンタクトを評価した(図 3-15A)。定量解析の基準として以下の 3 タイプのコンタクトに 分類して解析した(図 3-15B)。

Poor: グラフト双極細胞がホスト双極細胞と視細胞ロゼットの間に存在しており、明らかな コンタクトがない像。

Fair: グラフト双極細胞がホスト双極細胞と視細胞ロゼットの間に存在しているが、ホスト双 極細胞が視細胞側に伸びてきて、わずかにコンタクトできていそうな像。

Good:ホスト双極細胞と移植した視細胞の間にはグラフト双極細胞がほとんどおらず、複数の双極細胞と視細胞がコンタクトしている像。

各眼において 1~7 枚の切片を観察し、6~67 個の視細胞ロゼットを Poor、Fair、Good で分 類して定量化した。その結果、WT 網膜の約半数の視細胞ロゼットは Poor 型であり、Good 型 のコンタクトはほとんど観察されなかった(図 3-15C)。一方で、*ISL1*<sup>-/</sup>網膜では、半数の視細 胞ロゼットが Fair であり、残り半分が Good 型であった。Poor についてはほとんど観察され なかった。よって、*ISL1*を KO させると、移植した視細胞とホスト双極細胞のコンタクト率が 大幅に向上することが示された。





図 3-15. 移植した視細胞とホスト双極細胞のコンタクトの定量化

A. WT 網膜、*ISL1*<sup>-</sup>網膜移植後の Recoverin、PKCα、ヒト特異的 Ku80 染色による定量評価の ための共焦点顕微鏡観察像。

B. 移植した視細胞とホスト双極細胞のコンタクトの定量解析の基準。

C. 定量評価した平均値の解析。平均値±SEM で示した。

С

スケールバー:100 µm

# 2-8. ISL1<sup>-</sup>/-ヒト ES 細胞由来視細胞の移植後のシナプスマーカーの発現の評価

*ISL1*<sup>-</sup>網膜において、桿体双極細胞が分化しないことを確認していることから、移植後の PKCα 陽性の桿体双極細胞は全てホスト由来と特定できる。そこで、PKCα 染色像をよく観察 することで、移植した視細胞とホスト双極細胞のシナプス接続評価を行った。まず、視細胞特 有の Ribbon シナプスの重要な構成因子である CtBP2 に関して評価したところ、Crx::Venus 陽 性の視細胞とホスト双極細胞の間の領域において発現が観察され、PKCα 陽性の桿体双極細胞 の樹状突起終末近くに局在していることが確認された(図 3-16A)。生着場所によっては、 Ku80 陽性/Recoverin 陰性のグラフト由来の内層の細胞(主にアマクリン細胞やミュラーグ リア)が存在することがあるが、PKCα 陽性ホスト桿体双極細胞の樹状突起が視細胞に伸びて きて、その先端に CtBP2 が発現していることが観察された(図 3-16B)。また、シナプス小胞 のタンパク質 Synaptophysin は移植した視細胞ロゼットを取り囲むように発現しており、シナ プス接続の場が形成されていることが示唆された(図 3-16C)。さらに、移植した視細胞と双 極細胞の間において、シナプス間隙を構成する因子 Pikachrin が、馬蹄形状に発現する CtBP2 の中に包まれるように発現していることが観察された(図 3-16D) (Sato et al., 2008)。その他、 視細胞側の Presynaptic マーカーPSD95 や LRIT3 においても視細胞末端に Pikachrin と共局在 している像が観察された(図 3-16E-F) (Hasan et al., 2019)。

さらに、双極細胞側の Postsynaptic マーカーCACNA1S と mGluR6 について評価したところ、 Presynaptic マーカーPikachurin や CtBP2、Peanut agglutinin(PNA)(cone pedicle marker) と共局在していることが観察された(図 3-16G-J)。よって、*ISL1*<sup>+</sup>ヒト ES 細胞由来視細胞は ホスト双極細胞とシナプス接続している可能性が示唆された。





図 3-16. ISL1<sup>-</sup>網膜移植後のシナプスマーカーの発現評価

A-B. ISL1<sup>-/-</sup>網膜移植後のラット網膜における CtBP2 染色した共焦点顕微鏡観察像。

**C-F.** 視細胞側 **Pre-synaptic** マーカーの **Synaptophysin** (**Syn**)、**Pikachurin**、**PSD95**、**LRIT3** に 対して染色した共焦点顕微鏡観察像。

G. 視細胞側 Pre-synaptic マーカーPikachurin と双極細胞側 Post-synaptic マーカーCacna1s に 対して染色した共焦点顕微鏡観察像。

H. 染色して評価した Pre-、Post-synaptic マーカーの局在のモデル。

I-J. 視細胞側 Pre-synaptic マーカーCtBP2 と PNA と双極細胞側 Post-synaptic マーカーmGluR6 に対して染色した共焦点顕微鏡観察像。スケールバー:それぞれの写真内に表示。

視細胞は、双極細胞に加えて、水平細胞も含めた 3 者の triad シナプスを形成することで、 効率的かつ複雑な情報処理を行っている。そこで、*ISL1*<sup>--</sup>網膜由来視細胞が triad シナプスを形 成している可能性について評価した。まず、*ISL1*<sup>--</sup>網膜の移植後における水平細胞の生着につ いて評価するため、水平細胞マーカーCalbindin とヒト特異的 Ku80 抗体を用いて免疫組織染色 したところ、視細胞ロゼットの下半分では Ku80 と Calbindin 共陽性の *ISL1*<sup>--</sup>網膜由来水平細 胞が確認された(図 3-17A)。また、視細胞ロゼットの上半分は Ku80 陰性 Calbindin 陽性のホ スト由来の水平細胞が視細胞ロゼットを取り囲むように存在していた。さらに、PKCα と Calbindin、CtBP2 で桿体双極細胞、水平細胞、視細胞シナプスを染色して詳細に観察したと ころ、CtBP2 陽性の視細胞シナプスの領域に PKCα 陽性桿体双極細胞と Calbindin 陽性水平細 胞の神経突起が入り込んでいることが確認された(図 3-17B)。よって、移植された視細胞は ホスト双極細胞だけでなく、ホスト水平細胞ともコンタクトしており、Triad シナプスを形成 している可能性が示唆された。



図 3-17. 移植した水平細胞の生着確認と桿体双極細胞と合わせた Triad シナプス評価 A. *ISL1*<sup>-</sup>網膜移植後のラット網膜におけるヒト Ku80、Calbindin の共焦点顕微鏡観察像。 B. *ISL1*<sup>-</sup>網膜移植後の PKCα、Calbindin、CtBP2 の共焦点顕微鏡観察像。 スケールバー: A-B 20 µm、B' 10 µm、B" 2 µm

# 2-9. ISL1<sup>-</sup>・ヒト ES 細胞由来視細胞移植後のラット網膜神経節細胞の光応答評価

これまで *ISL1* を KO することで、網膜シートの移植後にホスト双極細胞ーグラフト視細胞 のコンタクト率が向上し、機能的な成熟やシナプス接続の可能性を示してきた。次に、移植後 の視機能回復効果を評価するため、ホスト網膜神経節細胞の光応答能を多電極アレイ(multielectrode array: MEA)を用いた電気生理学的な解析を行った。

移植 8~10 カ月後のラット眼球から神経網膜組織を回収して、ホスト網膜神経節細胞が多電 極上に乗るような形で MEA チャンバーに置いた (図 3-18A)。MEA 測定後には Crx::Venus の 蛍光を観察し、視細胞ロゼットと各電極の位置関係を確かめた (図 3-18A-C)。ISL1<sup>+</sup>網膜移植 後の代表的な発火パターン peri-stimulus time histograms と raster plots で示しているように、 視細胞がカバーされている領域に一致して、ホスト網膜神経節細胞の光応答が確認された (図 3-18C-D)。黄色バーは、光照射している時間を示しており、図 3-18C の黒枠の電極が D の黒 色プロット、赤枠が赤色プロットと対応している。視細胞ロゼットが観察される黒枠や緑枠の 電極では、光刺激においてスパイクが確認されるものの、赤枠のように移植片が確認されない 電極では光刺激に対して反応せず、ホスト網膜神経節細胞の自発発火が見られた。





図 3-18. 移植後ラット網膜における MEA 測定

- A. MEA チャンバーに乗せたラット網膜の写真。
- B. MEA チャンバー上に Crx:: Venus 陽性の視細胞が乗っている事を確認した蛍光観察像。
- C. Crx::Venus 陽性視細胞ロゼットの観察像と 60 電極の網膜神経節細胞の発火パターンを重 ね合わせた画像。黄色バーは光照射している時間を示す。
- D. 網膜神経節細胞の発火頻度を示した raster plots。スケールバー:A-B 1mm (Yamasaki et al., 2022)

今回、正確に視細胞からの光応答を評価するため、視細胞と双極細胞の情報伝達に必須の mGluR6 に対するブロッカーL-AP4 を用いた(Matsuyama et al., 2021; Nakajima et al., 1993)。 すなわち、L-AP4 添加中に光刺激をした際、網膜神経節細胞の光応答が消えると、その光応答 は移植した視細胞由来と考えることができる(図 3-19A)。ホスト網膜神経節細胞のスパイク の集団平均値(population averages)を解析したところ、WT と *ISL1*<sup>-+</sup>網膜共に before や after では光照射時にスパイクが測定され、L-AP4 添加時は消失していたことから、移植した視細胞 由来の光応答が確認された(図 3-19A)。また、control 網膜(未移植の反対眼)ではベースの 自発発火の頻度が高いのに対し、WT 網膜と *ISL1*<sup>-+</sup>網膜移植では抑えられていた。さらに、詳 細な比較を行うため、個々の検出されたホスト網膜神経節細胞の光応答様式やL-AP4 による入 力の遮断、L-AP4 洗浄後の発火回復・増加の解析から無反応(unresponsive)、onXoff 型、on 型、adapted on 型(L-AP4 添加後に反応するようになる)の4つに分類して、発火の詳細な解 析を進めた(Matsuyama et al., 2021)。その結果、移植後の網膜において光応答反応が確認され た網膜神経節細胞のうち、大部分は on 型か adapted on 型であり、on 型と adapted on 型の網 膜神経節細胞の割合は同等であった(図 3-19B)。また、WT 網膜と比べ *ISL1*<sup>-+</sup>網膜では、反応 している on 型と adapted on 型の割合が weak、medium、strong 全ての光照射条件において増 えていることが確認された。

Α



図 3-19. MEA 測定による網膜神経節細胞の光応答と反応タイプの分類

A. 網膜神経節細胞の発火様式。L-AP4 添加前(before)、添加中(L-AP4)、添加後の Washout (after)の一連の条件における、3種の強度(weak、medium、strong)の光照射による MEA 測定。

B. 光応答した網膜神経節細胞の分類・内訳。非応答型(unresponsive)、onXoff 型、on 型、 adapted on 型(L-AP4 添加後に反応するようになる)と分類 (Yamasaki et al., 2022)

最後に、測定したラット眼(control 反対眼 16 眼、WT 網膜移植 13 眼、*ISL1*→網膜移植 18 眼)ごとのホスト網膜神経節細胞の光反応率を解析した(図 3-20)。その結果、全体として光 強度が強くなるほど、反応する割合は増加している傾向にあった。control、WT 網膜、*ISL1*→ 網膜で比較したところ、medium や strong の光強度では control ではほとんど反応は認められ

49

ず、WT網膜では半数程度の光応答率であった(図 3-20)。一方で、*ISL1*→網膜では大部分の網 膜において反応が確認された。weak の光照射強度においても *ISL1*→網膜では反応できている 眼が複数確認できた。以上の結果から、*ISL1*をKOしたことによって、光応答能を向上させる ことができることが確認できた。



図 3-20. MEA 測定の移植眼ごとにおける反応率のまとめ 1つのプロットが1眼(網膜)に相当。縦軸の Rate は無反応(Unlesponsive)ではない細胞 の割合を示す(Yamasaki et al., 2022)。

#### 第3節 考察

本章では、移植した視細胞とホスト双極細胞のコンタクトの向上を目的に、*ISL1*をKOする ことで視機能回復効果を向上させる検討を行い、*ISL1*<sup>+</sup>網膜は視細胞や水平細胞に分化するが、 不要な ON 型双極細胞には分化しないことを確認、ホストーグラフトのコンタクト率の向上や シナプス接続が示唆され、電気生理学的解析による光応答率の向上を確認した。今回、先行し て実施していた *ISL1<sup>+</sup>*マウス ES/iPS 細胞と同様の双極細胞の分化抑制の再現性を確認したが、 喜ばしいことに MEA 測定ではマウスよりもヒトの方が光応答率の向上幅が大きかった (Matsuyama et al., 2021)。分化誘導条件の違いからか、もしくはヒト ES 細胞由来網膜組織の 方が、持ち込みの双極細胞によるシナプス接続の競合が大きかったことが考えられる。また、 今回のヒト ES 細胞を用いた *ISL1* KO の検討は臨床応用前提であることから、マウス ES/iPS 細胞由来網膜組織において解析しきれなかった視細胞の分化への影響や機能的な成熟を詳細に 評価し、大きな問題がないことを確認できた。本研究成果は、網膜色素変性において、より視 機能回復効果が期待できる次世代の網膜組織として有望である可能性を示している。コンタク ト率がよく、シナプス接続の頻度が高い事は、移植後の視機能回復において、解像度や見え方 がさらに改善される事が想定される。ゲノム編集技術を用いていることから、今後オフターゲットや安全性について詳細に解析する必要はあるが、将来の患者の需要に応えるべく、臨床応 用に向けて研究を進めていきたい。

今回、移植後の視細胞について、詳細に免疫組織染色で解析したところ、移植した視細胞は 移植環境下においてロゼット構造を形成して成熟しているだけでなく、生体における視細胞-RPEの間に存在する Interphotoreceptor matrix が発現しており、微小環境を形成している可能 性が示唆された。さらに視細胞の光受容に必須な視物質である 11-cis retinal の回復に関わる Retinoid transporter の IRBP の発現がロゼット内で確認された(Palczewski et al., 1999)。ロゼ ット内部に送られた 11-cis retinal の量がレチノイドサイクルを回すために十分な量があるかど うかは今回の解析では調べ切れていないが、MEA の結果から少なくとも RPE から分離した状 態で、繰り返し光に反応することができていることを確認した。よって、移植された視細胞ロ ゼット内で、何らかの継続して光応答するための経路が存在することが考えられる。今後、ヒ トに移植した際、継続的に光に反応し続けられるのかといった事や、明暗の識別、色情報、コ ントラスト等どのような見え方をするのか研究が進むことを期待したい。

私たちが取り組んでいる網膜組織移植のように、未熟な段階の幹細胞/前駆細胞を移植する アプローチでは、移植後の細胞の分化は移植環境に依存し、介入することは難しい。こういっ た幹細胞/前駆細胞移植に対して、今回 *ISL1* を KO したように、ゲノム編集等で分化できる 細胞種を限定させるように工夫をしておけば、目的の細胞集団のみを移植後に生着させること が可能である。今後、オルガノイドや複数の細胞種から構成される立体臓器の細胞移植治療が 行われていく中で、今回実施したゲノム編集により移植後の生着像を改良するアプローチは新 たなコンセプトとして有用であると考えられる。

### ヒト ES/iPS 細胞のフィーダーフリー培養

本章において、ヒト ES 細胞は京都大学で樹立され、3 継代以上フィーダーフリー培養した KhES-1を使用した。また、ヒト iPS 細胞は episomal ベクターを用いて樹立された 1231A3 株 とTLHD2株、Sendai ウイルスを用いて樹立された C3株・LPF11株を用いた(Nakagawa et al., 2014)。ヒト ES 細胞は Nakano らによって作製された網膜前駆細胞マーカーRx や視細胞前駆 マーカーCrx のプロモーター下に Venus を Knock in した *Rx::*Venus レポーター株、*Crx::*Venus レポーター株(ヘテロ型,片アリルは野生型)を用いた(Nakano et al., 2012)。

フィーダーフリー培養は、Nakagawa らが開発した方法に従い、未分化維持培地 StemFit (味の素株式会社) 及び iMatrix511 (Nippi 社) を用いた(Nakagawa et al., 2014)。継代操作と して iMatrix511 を Tissue culture 用 6 well plate (Iwaki 社) に添加し、37°C で 1 時間以上イン キュベートしてコーティングした。その後、ヒト ES/iPS 細胞を PBS で洗浄し、TrypLE Select (Thermo 社)を加えて 37°C で 4~7 分酵素処理した。酵素処理後、ピペッティングすること でシングルセル化し、回収した。細胞数を Countess (Thermo 社)を用いてカウントし、ヒト ES/iPS 細胞を 0.8~1.4 x 10<sup>4</sup> cells/ well (6 well plate)の密度で播種した。ヒト ES/iPS 細胞 の培養は、37°C 及び 5% CO<sub>2</sub>条件下で行った。継代時の培養液としては StemFit に 10 µM Y-27632 (ROCK 阻害剤)を添加した培地を使用した。継代 1 日以降、Y-27632 を含まない StemFit を加えて培養し、継代 3 日以降は毎日培地交換した。

### SFEBq 法にプレコンディショニング処理/Day0 SAG 添加を組み合わせた網膜分化誘導法

網膜分化誘導法として SFEBq 法に、分化開始前 SB431542(TGF-β/Nodal シグナル阻害 剤: SB)やLDN193189 (BMP シグナル阻害剤: LDN)、SAG(Shh シグナルの活性化剤)を 添加するプレコンディショニング処理と、分化開始時に SAG を添加する Day0 SAG 法を組み 合わせた方法を示す(図 4-1)。

Preconditio	Preconditioning		d0~ SAG
d-1	d0	d	3
hPSC maintenance me	dium	Differentiatio	on medium (gfCDM)
SB or LI	ON	Y-27632	
SAG		SAG	
			hBMP4

図 4-1. フィーダーフリー培養したヒト ES/iPS 細胞を用いた網膜分化誘導法

具体的な分化誘導法としては、以下のように行った

・分化開始1日前(d-1)

ヒト ES/iPS 細胞に対し、StemFit に 300 nM SAG、及び 5 μM SB、又は 100 nM LDN を添 加するプレコンディショニング処理を行い、1 日間未分化維持培養を行った。

・分化開始日(**d0**)

ヒト ES/iPS 細胞を PBS で洗浄後、TrypLE Select (Thermo 社) を加えて、37°C で 4~7 分 酵素処理した。酵素処理後、ピペッティングすることでシングルセル化し、回収した。細胞数 を Countess (Thermo 社) でカウントし、10~20 µM Y-27432、10~300 nM SAG を添加した無 血清培地に細胞を懸濁後、1.0~1.2x10^4 cells /100 µL/well となるように細胞低接着 96 well V 底の plate (Prime surface V-plate; 住友ベークライト社製) に播種した。分化誘導は、37°C 及 び 5% CO<sub>2</sub>条件下で行った。無血清培地 gfCDM(growth factor-free chemically defined medium) は、F-12 培地 (Thermo 社) と IMDM 培地 (Thermo 社) の 1:1 混合液に 10% KSR (Thermo 社)、1% Chemically defined lipid concentrate (Thermo 社) 及び 450 µM Monothioglycerol (Sigma 社) を添加したものを使用した。

・分化 3 日(d3)

終濃度 1.5 nM (55 ng/ml)となるように Recombinant BMP4 (R&D Systems 社製) を添加 した gfCDM 培地を 50 μL/well 添加した。

·分化6日以降

分化 14~23 日になるまで 3~4 日に一回、培地を半量交換した。

## 揺り戻し培養・長期培養

一度、RPE に分化方向を寄せてから神経網膜に Fate を戻す揺り戻し培養と長期成熟培養は Kuwahara らの方法を用いて行った(Kuwahara et al., 2015)。

・分化 14~23 日(揺り戻し培養)

96 well plate 内で形成された凝集体を、ピペットマンを用いて1つ1つピックアップし、90 mmの低接着培養 Dish (住友ベークライト社製) に移した。凝集塊は DMEM/F12-GlutaMax (Thermo 社) 地に 1% N2 Supplement (Thermo 社)、3 μM CHIR99021 (GSK3β 阻害剤, Stemgent 社: CHIR) 及び5 μM SU5402 (FGF シグナル阻害剤, Sigma 社: SU) を添加した 培地で 37°C、5% CO<sub>2</sub>環境下で、3~4 日間培養した。

・揺り戻し培養3日後(長期成熟培養)

揺り戻し培養に使用した培地を全量除去し、長期成熟培地 Retina Medium を添加した。 Retina Medium として、DMEM/F12-GlutaMax (Thermo社)に 10% FBS (GE Healthcare 社)、 1% N2 Supplement (Thermo社)、 0.5 µM Retinoic acid (Sigma 社, all-trans retinoic acid)、及 び 100 µM Taurin (Sigma 社)を添加した培地を使用した。必要に応じて 100 U/mL penicillin 及び 100 μg/mL streptomycin を添加した。3~4 日に一回、全量培地交換した。

免疫特性解析や *ISL1* KO 検討には Nuakaya らが新たに開発した改良型の長期成熟培養法を 用いて行った (Nukaya et al, in preparation; WO2019017492A1, WO2019054514A1)。

### 免疫組織染色

切片作製

ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織は、4% PFA (Wako 社) で 15~60 分間固定し、凍結保護の ため 20~30% Sucrose に 4°C で一晩以上かけて置換した。その後、クリオモルドにサンプルを 入れ、OCT compound (Sakura 社)を加えて凍結させ、凍結ブロックを作製した。凍結切片 は、クライオスタット (Leica 社)を用いて、10~12 μm の厚みで作製した。

抗体染色・観察

凍結切片は、0.3% Triton X-100/PBS を用いて 15 分間洗浄した後、3% BSA/0.3% Triton X-100/PBS で Blocking 処理を 1 時間以上、室温で行った。その後、Blocking 液で希釈した 1 次 抗体を加え、4°C で一晩以上インキュベートした。その後、0.05% Tween/PBS で洗浄した。 洗浄後、蛍光色素付き 2 次抗体を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。その際、同時に DAPI (Nacalai 社)を添加して、核染色を行った。2 次染色後、0.05% Tween/PBS で洗浄し、 封入して観察した。必要に応じて、Target Retrieval Solution (Dako 社)を用いて抗原賦活化 処理を行った。抗原賦活化はオートクレーブを用いて 105°C、15 分間行った。免疫組織染色 された切片は、倒立型蛍光顕微鏡 (Keyence 社、BIOREVO) または、共焦点顕微鏡 (Olympus 社, FV1200)を用いて観察した。画像解析は ImageJ 1.48 v (NIH)を用いて行っ た。使用した抗体は以下の表の通りである (表 1-1)。

抗原	メーカー	型番
Goat Polyclonal anti-Arrestin 3 (Cone arrestin)	Novus Biologicals	NBP1-37003
Mouse monoclonal anti-Brevican	BioLegend	820101
Goat Polyclonal anti-Brn3	Santa Cruz Biotechnology	sc-6026
Mouse monoclonal anti-CACNA1S	Millipore	MAB427
Rabbit polyclonal anti-Calbindin	Abcam	ab108404
Rabbit polyclonal anti-Calretinin	Millipore	AB5054
Rat monoclonal anti-CD44	Abcam	ab119348
Goat polyclonal anti-Choline Acetyltransferase	Millipore	AB144P
Mouse monoclonal anti-Chx10	Santa Cruz Biotechnology	sc-365519
Sheep polyclonal anti-Chx10	Exalpha Biologicals	X1180P

表 1-1. 免疫組織染色に使用した抗体リスト

Mouse monoclonal anti-CNGB1	Millipore	MABN2429
Goat polyclonal anti-CNGB3	Novus Biologicals	NBP2-75087
Rabbit polyclonal anti-Crx	Takara Bio Inc.	M231
Mouse monoclonal anti-CtBP2	BD Bioscience	612044
Rabbit polyclonal anti-GNAT1 (Gα t1)	Santa Cruz Biotechnology	sc-389
Rabbit polyclonal anti-GNAT2 (Gα t2)	Santa Cruz Biotechnology	sc-390
Mouse monoclonal anti-G Protein Goα	Millipore	MAB3073
Rabbit polyclonal anti-GRK1	Novus Biologicals	NBP2-55226
Rabbit polyclonal anti-GUCA1A (GCAP1)	Novus Biologicals	NBP2-55158
Rabbit polyclonal anti-GUCA1B (GCAP2)	Novus Biologicals	NBP2-68721
Rabbit polyclonal anti-GUCY2D	Proteintech	55127-1-AP
Rabbit polyclonal anti-GUCY2F	Proteintech	25252-1-AP
Mouse monoclonal anti-Glutamine Synthetase (GS)	Millipore	MAB302
Mouse monoclonal anti-HLA-ABC	eBioscience	14-9983-82
Rabbit polyclonal anti-IMPG1	Novus Biologicals	NBP2-57461
Rabbit polyclonal anti-IMPG2	Novus Biologicals	NBP2-54954
Rabbit polyclonal anti-IRBP (RBP3)	Proteintech	14352-1-AP
Mouse monoclonal anti-Islet-1	DSHB	40.2D6
Goat polyclonal anti-Islet-1	R&D Systems	AF1837
Sheep polyclonal anti-Islet-2	R&D Systems	AF4244
Rabbit monoclonal anti-Ku80 (human specific)	Cell Signaling Technology	2180
Goat polyclonal anti-Ku80 (human specific)	R&D Systems	AF5619
Rabbit polyclonal anti-L/M Opsin (Opsin, Red/Green)	Millipore	AB5405
Rabbit polyclonal anti-LRIT3	Novus Biologicals	NBP1-83895
Rabbit polyclonal anti-L7/Pcp2	Takara Bio Inc.	M202
Rabbit polyclonal anti-mGluR6	Novus Biologicals	NLS4655
Mouse monoclonal anti-Nanog	Millipore	MABD24
Rabbit polyclonal anti-Oct3/4	Santa Cruz Biotechnology	sc-9081
Mouse monoclonal anti-Pax6	BD Pharmingen	561462
Rabbit polyclonal anti-PDE6α	Novus Biologicals	NBP1-87312
Rabbit polyclonal anti-PDE6β	Novus Biologicals	NB120-5663
Rabbit polyclonal anti-PDE6H	Novus Biologicals	NBP2-68659

Rabbit polyclonal anti-Pikachurin	Abcam	ab91314
Mouse-monoclonal anti-PKCα	Novus Biologicals	NB600-201
Goat polyclonal anti-PKCα	R&D Systems	AF5340
Peanut agglutinin (PNA), Alexa Fluor 647 conjugate	Thermo Fisher Scientific	L32460
Mouse monoclonal anti-Peripherin-2 (PRPH2)	Millipore	MABN293
Rabbit polyclonal anti-Peripherin-2 (PRPH2)	Proteintech	18109-1-AP
Mouse monoclonal anti-PSD95	BioLegend	810401
Mouse monoclonal anti-RBPMS	Novus Biologicals	NBP2-45551
Rabbit polyclonal anti-Recoverin	Proteintech	10073-1-AP
Mouse monoclonal anti-Rhodopsin	Millipore	MABN15
Guinea pig polyclonal anti-Rx	Takara Bio Inc.	M229
Mouse monoclonal anti-Rxry	Santa Cruz Biotechnology	sc-365252
Rabbit polyclonal anti-Rxrγ	Spring Bioscience	E4332
Mouse monoclonal anti-S arrestin	Novus Biologicals	NBP2-25161
Sheep polyclonal anti-Secretagogin	BioVendor	RD184120100
Goat polyclonal anti-S-Opsin (Opsin, Blue)	Santa Cruz Biotechnology	sc-14363
Mouse monoclonal anti-Stem123 (human GFAP)	Takara Bio Inc.	Y40420
Goat polyclonal anti-Synaptophysin	R&D Systems	AF5555
Mouse monoclonal anti-Versican	Millipore	MABT161

# 免疫細胞とヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の共培養による免疫応答解析

ヒト ES/iPS 細胞から分化した網膜組織の免疫原性を評価するため、理化学研究所の Sugita らが確立した RPE と健常者由来 PBMCs の共培養法 (Lymphocytes-grafts immune reaction: LGIR)を改良して、ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織と PBMCs の共培養を実施した(Sugita et al., 2016c)。健常者から回収した PBMCs を細胞低接着 24 well plate (Sumilon Prime surface plate: Sumitomo Bakelite) に 2.0 x 10<sup>6</sup> cells/well の密度で播種し、さらにヒト ES/iPS 細胞由 来網膜組織を加えて 4~5 日間共培養した。共培養の際、PRMI-1640 (Nacalai 社) に 10 %FBS (BioWhittaker 社)、Recombinant Interleukin-2 (IL-2、BD Biosciences 社)、10 mM HEPES (Sigma 社)、0.1 mM Nonessential amino acids (Sigma 社)、1 mM Sodium pyruvate (Sigma 社)、Penicillin-streptomycin (Gibco 社)、2-mercaptoethanol (Sigma 社) を添加した培地を使 用した。免疫細胞を活性化には CD3 抗体 (Ancell 社、144-020) と CD28 抗体 (BD Pharmingen、555725)を用いた。

### フローサイトメトリー解析

ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の表面抗原のフローサイトメトリー解析

ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の表面抗原に対する抗体染色は以下のようにして行った。まず、ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織に対し神経細胞分散液(Wako 社)を添加し 37°C で 15~30 分間インキュベートした。その後、ピペッティングによりシングルセルに分散させた。PBS で洗浄後、蛍光標識された抗体を加え、4°C で 60 分間染色した。洗浄後、FACS Cantoll (BD Biosciences 社) で測定し、FlowJo (BD Biosciences 社) にて解析した。

また、IFN-γ 処理については、培養液中に 100 ng/mL IFN-γ (R&D Systems) を添加し 48 時 間後に上記分散・染色方法にて、フローサイトメトリー解析した。

使用した抗体は以下のリストの通りである(表 1-2)。

抗原	メーカー	型番
HLA-A, B, C, APC conjugate	Bio Legend	311410
HLA-DR, DP, DQ, APC conjugate	Bio Legend	361714
Mouse IgG1κ, APC conjugate	Bio Legend	400120

表 1-2. 表面抗原のフローサイトメトリー解析で使用した抗体リスト

ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織の転写因子に対するフローサイトメトリー解析

ヒト ES 細胞由来網膜組織の転写因子に対するフローサイトメトリー解析は以下のようにし て行った。ヒト ES 細胞由来網膜組織に神経細胞分散液(Wako 社)を添加し、37°C で 15~30 分間インキュベートした。その後、ピペッティングによりシングルセルに分散させた。洗浄後、 Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Biosciences 社)又は Transcription Factor Buffer Kit

(BD Biosciences 社)を用いて、4°C で 20 分間インキュベートすることで固定した。細胞の 透過処理は Perm/Wash buffer を用いて行った。抗体染色は、蛍光標識された抗体を加え、4°C で 60 分間染色した。蛍光標識されていない抗体を使用した場合、その後蛍光標識された 2 次 抗体を用いて染色した。抗体反応後、Perm/Wash buffer で洗浄し、2% FBS/PBS buffer で懸濁 後、FACS Cantoll (BD Biosciences 社)で測定し、FlowJo (BD Biosciences 社)にて解析を 行った。

使用した抗体は以下のリストの通りである(表 1-3)。

表 1-3. 転写因子に対するフローサイトメトリー解析で使用した抗体リスト

Antibodies		
Mouse monoclonal anti-Chx10, Alexa Fluor 647	Santa Cruz Biotechnology	Cat#sc-365519 AF647
Mouse monoclonal anti-Islet-1, PE	BD Pharmingen	Cat#562547

Mouse monoclonal anti-Pax6, Alexa Fluor 647	BD Pharmingen	Cat#562249
Mouse monoclonal anti-RXRγ, Alexa Fluor 647	Santa Cruz Biotechnology	Cat#sc-365252 AF647
Mouse IgG1k Isotype control, APC	BioLegend	Cat#400120
Mouse IgG2ак Isotype control, APC	BioLegend	Cat#400220

### 免疫細胞のフローサイトメトリー解析

ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織と免疫細胞の共培養後、免疫細胞のみ回収し、FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec 社)を添加した。その後、メタノール固定し、PE 標識された Ki67 抗体、及び APC 標識された各種免疫細胞のマーカーに対する抗体を加え、4°C で 60 分間染色 した。PBS で洗浄後、FACS Cantoll (BD Biosciences 社) で測定し、FlowJo (BD Biosciences 社)にて解析した。使用した抗体は以下の表の通りである (表 1-4)。

Antibodies		
CD4, APC conjugate	Miltenyi Biotec	130-113-250
CD8a, APC conjugate	eBioscience	17-0088-42
CD11b, APC conjugate	Miltenyi Biotec	130-091-241
CD19, APC conjugate	BD PharMingen	561742
NKG2A, APC conjugate	Miltenyi Biotec	130-098-809
Ki-67, PE conjugate	Bio Legend	350504
Mouse IgG1κ, PE conjugate	Bio Legend	400112
Mouse IgG1κ, APC conjugate	Miltenyi Biotec	130-113-196

表 1-4. 免疫細胞のフローサイトメトリー解析で使用した抗体リスト

# Quantitative real time PCR

分化 80~100 日のヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織を、神経細胞分散液(Wako 社)を用いて分 散後、High Pure RNA Isolation Kit(Roche 社)を用いて RNA を抽出・精製した。ヒト ES 細 胞については、TrypLE Select(Thermo 社)を用いて分散した。回収した RNA は Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche 社)を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。 その後、Light Cycler 480 Probes Master(Roche)を用いて、PCR 反応を行った。サンプル間 の mRNA 量の補正として β-actin を内部標準として使用した。用いたプライマーとプローブに ついては表 1-5 に示す。

qPCR Primer List					
Name	R:	L:	Universal Probe#	cat.no.	
β <b>-actin</b>	ccaaccgcgagaagatga	ccagaggcgtacagggatag	64	04688635001	
TGF-β1	gcagcacgtggagctgta	cagccggttgctgaggta	72	04688953001	
TGF-β2	ccaaagggtacaatgccaac	cagatgcttctggatttatggtatt	67	04688660001	
TGF-β3	cgcacacagcagttctcc	aagaagcgggctttggac	38	04687965001	
SMAD3	gatgggacacctgcaacc	caccacgcagaacgtcaa	9	04685075001	
HLA-E	agcaatgatgcccacgat	ccgtcaccctgagatgga	23	04686977001	
HLA-G	gtctcggtcagggtcagg	acccacccggactcattc	4	04685016001	
PD-L1	cagaattaccaagtgagtcctttca	ccatacagctgaattggtcatc	88	04689135001	
PD-L2	gcaattccaggctcaacatta	gagctgtggcaagtcctcat	69	04688686001	
CD59	ggcagaagacagccaggac	cagttggtgtaggagttgagacc	66	04688651001	
PEDF	tccaatgcagaggagtagca	gtgtggagctgcagcgtat	57	04688546001	

### 表 1-5. 使用したプライマーとプローブのリスト

# Islet-1KO ヒト ES 細胞の作製

*ISL1* KO ヒト ES 細胞株の樹立は、Cas9 及び guide RNA、puromycin 耐性遺伝子が一つに組 み込まれたプラスミド pSpCas9 (BB) -2A-Puro (Addgene 社) をヒト ES 細胞にトランスフ ェクションして行った。*ISL1* を KO するため、スタートコドンから Exon2 まで欠損させるよ うに上流と下流の gRNA をデザインした (gRNA 配列: CCAACTCCGCCGGCTTAAAT, GGGAGGTTAATACTTCGGAG)。プラスミドは Nucleofector IIb を用いてヒト ES 細胞にエレ クトロポレーションで導入した (program B-016、Lonza)。トランスフェクションしたヒト ES 細胞は iMatrix511 コーティングした 6 well plate の 1 well あたり 1.0 x 10<sup>3</sup> 細胞を 10 µM Y-27632 を添加した Stem Fit 培地に懸濁して播種した。播種翌日以降、Y-27632 を含まない Stem Fit 培地で培地交換した。播種 6 日後、Stem Fit 培地中に 0.5 ng/mL puromycin を添加し、セレ クションを行った。Puromycin 存在下で増殖したコロニーをピックアップし、コロニーの半分 は継代し、残り半分はゲノム DNA を抽出し、ターゲットサイトで切断が起きているか確認す るため PCR を行った。さらにサンガーシークエンスで配列を確認し、目的箇所で切断されて いる 2 つのクローン 330A16 株と 330A19 株を樹立した。

### RD-nude rat への移植

移植に用いた視細胞変性モデルである Rhodopsin mutant RD-nude ラット (SD-Foxn1 Tg (S334ter) 3Lav nude rats、以下 RD-nude ラット) は Rat Resource and Research Center か らいただき Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) statement に従っ て扱った。麻酔は 40-80 mg/kg Ketamine hydrochloride 及び 5-10 mg/kg xylazine、または吸引 麻酔 3~5% isoflurane を用いた。また、0.5% Tropicamide (ミドリンP点眼液, phenylephrine hydrochloride) を用いて瞳孔を拡張させ、移植時の眼球内の移植針を見やすくした。移植は、 分化 60 日程の網膜シートをガラスキャピラリーで吸引し、RD-nude ラットの眼球の切開部位 から挿入して硝子体に侵入させ、網膜下に移植した。

### Multi-electrode array (MEA) recording

ヒト ES 細胞由来網膜シート移植した RD-nude ラットの網膜の光応答について、Multi Channel Systems 社の USB-MEA60-Up-System 多電極アレイ(multi-electrode array: MEA) を用いて測定した。ラット視細胞の大部分が変性死し、暗所視・薄明視程度(scotopic-mesopic、10.56 log photons/cm<sup>2</sup>/s、weak の刺激)の光刺激におけるホスト網膜神経節細胞の 応答がほとんど確認されなくなる 60 週齢前後(移植後 8–10 カ月)の眼球を使用して、残存視 細胞による光応答の反応を可能な限り減らした条件で実施した。

ラットは事前に 1~3 日間暗順応させておき、測定する際も 700 nm の赤色 LED の下行った。 眼摘する直前にイソフルランまたはセボフルランによる吸引麻酔を用いてラットの麻酔と安楽 死を行った。角膜や水晶体を取り除いた後の Eyecup は使用するまで、95% O<sub>2</sub> と 5% CO<sub>2</sub>を 供給している Ames 培地(Sigma 社)で暗所保管した。正確に測定するため、神経網膜を慎重 に強膜・RPE から剥離させ、網膜組織に付いている硝子体を丁寧に取り除いた。移植箇所は、 特徴的な厚みと斑点状の見た目で判別でき、網膜神経節細胞側を電極側に、移植した部分が電 極の中央に来るように乗せた。電極チャンバーには 3-3.5mL/min の速度で酸素入りの Ames 培 地を灌流させて神経網膜に常時供給し、20 分以上回復させてから測定を始めた。白色 LED

(NSPW500C、日亜化学工業株式会社、徳島県)を用いて、異なる強度(weak:10.56、 medium:12.16、strong:12.84 log photons/cm2/s)の全視野(full-field)光刺激を背景照明な しで発生させた。測定は20秒間を1セットとして3回繰り返して行い、20秒間の途中で1秒 間の光刺激を加えることで光応答反応を測定した。視細胞由来のシナプス入力を確認するため 10 µM L-AP4 (mGluR6 agonistic blocker、和光純薬工業)を測定中に Ames 培地に添加し、L-AP4 処理前、処理中、処理後の一連の流れを1クールとして刺激を繰り返した。さらに明るい 光刺激(super-strong:15.48 log photons/cm2/s)は、各サンプルの実験の最後にのみ照射し、 測定したサンプルの生存率や応答能を評価した。また、MEA 測定中のメラノプシン陽性の内 在性光感受細胞による光応答反応を抑制するため、10 µM opsinamide (Opn-4 Antagonist; Sigma 社)を Ames 培地に添加しておいた。

比較対象として Control 網膜(未移植の反対眼)を用いて、光応答反応が検出されないかの 測定を行った。強い光刺激(strong: 12.84 log photons/cm<sup>2</sup>/s)や、さらに強い光刺激(superstrong:15.48 log photons/cm<sup>2</sup>/s)では、残存しているホストの錐体視細胞やメラノプシンを持 つホスト光受容性網膜神経節細胞を評価した。後者の発火にはL-AP4 依存性がないため、区別 することができる。

一連の MEA 測定後、検出された網膜神経節細胞の活動電位スパイクは、Spike 2 (version 7.2、CED) というデータ解析ソフトウェアを用いて解析した。Spike 2 では、スパイクマッチングアルゴリズムを元に、-20 µV の閾値設定、最大振幅変化の±5%の許容、DC オフセットの除去を伴う Butterworth band-pass filter (200-2800Hz)の追加等、いくつかの設定変更を加え

たものを使用して、スパイクソーティング(網膜神経節細胞のスパイクを抽出)を行った (Matsuyama et al., 2021; Tu et al., 2019)。L-AP4 処理前、処理中、処理後に取得した同じ光刺 激強度の測定データを重ね合わせて解析し、各サンプルの 3~4 時間の記録中における同一セッ トの細胞からのスパイクを追跡した。このような解析を通して検出された細胞(スパイク源) の連続的な光反応パターンに応じて、unresponsive(無反応)型、 onXoff 型、on 型、 and adapted on 型(L-AP4 添加後に反応するようになる)に分類した。

### 総括

本研究では、ヒト ES/iPS 細胞由来網膜シート移植による視機能再生を目指す再生医療の臨床 応用に向けた検討を行い、以下の知見を得た。

- フィーダーフリー培養したヒト ES/iPS 細胞の分化開始前に TGF-β/Nodal シグナル阻害剤 SB、及び Shh シグナル活性化剤 SAG を添加してヒト ES/iPS 細胞の初期状態を調整し、 さらに分化開始時に SAG を添加する事で、安定的に網膜組織を分化誘導させることがで きる改良分化誘導法を見出した。
- ヒト ES/iPS 細胞から網膜組織を作製する際、分化誘導効率のさらなる向上、及びコスト を抑えるために Chk1 阻害剤の検討を行ったところ、低濃度の BMP4 と組み合わせて加え ると網膜以外の細胞の塊を減らすことができ、分化誘導効率を向上させることができるこ とを見出した。
- ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織は、RPE と比較し、HLA 分子の発現レベルが低く、免疫原 性も低いことがわかった。さらに、ヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織は活性化した免疫細胞 に対して、免疫抑制能を有することを新たに見出し、TGF-βの分泌が重要な役割を果たし ている可能性が示された。
- 4. 現状のヒト ES/iPS 細胞由来網膜シート移植の課題を解決する ISL1 KO ヒト ES 細胞由来 網膜組織の評価を行い、ISL1<sup>-/</sup>網膜は視機能回復に必要な視細胞や水平細胞に分化する が、不用な双極細胞には分化しないことを確認した。さらに、移植した視細胞とホスト双 極細胞とのコンタクト率の向上やシナプス接続の評価、電気生理学的解析による光応答能 の向上を示し、ISL1<sup>-/</sup>網膜の有用性が確認された。

理化学研究所の Takahashi · Mandai らは、マウスやヒト ES/iPS 細胞由来網膜組織から切り 出した網膜シートを末期視細胞変性モデル動物に移植し、ホスト網膜神経節細胞の発火の回復 や、光依存的な行動回復を確認してきた(Iraha et al., 2018; Mandai et al., 2017a; Tu et al., 2019)。これらの proof-of-concept (POC)研究に加えて、本研究成果も合わさり、2020年に プレコンディショニング処理/Day0 SAG 添加法によって分化誘導されたヒト iPS 細胞由来網 膜組織を用いた臨床研究が開始され、既に網膜色素変性の患者さんに移植されている。現在、 安全性や有効性の検証中であり、並行して治験開始に向けた準備も進めている。さらに、*ISL1* を KO させた次世代型網膜組織を患者に届ける研究も進めており、将来網膜色素変性によって 失明する患者を無くすことを目標に今後も研究開発に取り組んでいきたい。

# 引用文献

Akiba, R., Matsuyama, T., Tu, H.Y., Hashiguchi, T., Sho, J., Yamamoto, S., Takahashi, M., and Mandai, M. (2019). Quantitative and qualitative evaluation of photoreceptor synapses in developing, degenerating and regenerating retinas. Front. Cell. Neurosci. *13*, 1–20.

Ambati, J., Anand, A., Fernandez, S., Sakurai, E., Lynn, B.C., Kuziel, W.A., Rollins, B.J., and Ambati, B.K. (2003). An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. Nat. Med. *9*, 1390–1397.

Assawachananont, J., Mandai, M., Okamoto, S., Yamada, C., Eiraku, M., Yonemura, S., Sasai, Y., and Takahashi, M. (2014). Transplantation of embryonic and induced pluripotent stem cell-derived 3D retinal sheets into retinal degenerative mice. Stem Cell Reports *2*, 662–674.

Bradford, S.T.J., Ranghini, E.J., Grimley, E., Lee, P.H., and Dressler, G.R. (2019). High-throughput screens for agonists of bone morphogenetic protein (BMP) signaling identify potent benzoxazole compounds. J. Biol. Chem. *294*, 3125–3136.

Cunha-Vaz, J.G. (2004). The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. Exp. Eye Res. *78*, 715–721.

Das, T., Del Cerro, M., Jalali, S., Rao, V.S., Gullapalli, V.K., Little, C., Loreto, D.A.D., Sharma, S., Sreedharan, A., Del Cerro, C., et al. (1999). The transplantation of human fetal neuroretinal cells in advanced retinitis pigmentosa patients: Results of a long-term safety study. Exp. Neurol. *157*, 58–68.

Edwards, A.O., Ritter, R., Abel, K.J., Manning, A., Panhuysen, C., and Farrer, L.A. (2005). Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. Science (80-.). *308*, 385–389.

Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T., and Sasai, Y. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. Nature *472*, 51–56.

Elshatory, Y., Everhart, D., Deng, M., Xie, X., Barlow, R.B., and Gan, L. (2007). Islet-1 controls the differentiation of retinal bipolar and cholinergic amacrine cells. J. Neurosci. 27, 12707–12720.

Feng, L., Cook, B., Tsai, S.Y., Zhou, T., LaFlamme, B., Evans, T., and Chen, S. (2016). Discovery of a Small-Molecule BMP Sensitizer for Human Embryonic Stem Cell Differentiation. Cell Rep. *15*, 2063–2075.

Fujii, S., Yoshida, S., Inagaki, E., Hatou, S., Tsubota, K., Takahashi, M., Shimmura, S., and Sugita, S. (2019). Immunological Properties of Neural Crest Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cells Dev. *28*, 28–43.

Fujii, S., Sugita, S., Futatsugi, Y., Ishida, M., Edo, A., Makabe, K., Kamao, H., Iwasaki, Y., Sakaguchi, H., Hirami, Y., et al. (2020). A strategy for personalized treatment of iPS-retinal immune rejections assessed in cynomolgus monkey models. Int. J. Mol. Sci. *21*, 1–16.

Genthe, J.R., Min, J., Farmer, D.M., Shelat, A.A., Grenet, J.A., Lin, W., Finkelstein, D., Vrijens, K., Chen, T., Guy, R.K., et al. (2017). Ventromorphins: A New Class of Small Molecule Activators of the Canonical BMP Signaling Pathway. ACS Chem. Biol. *12*, 2436–2447.

Hasan, N., Pangeni, G., Cobb, C.A., Ray, T.A., Nettesheim, E.R., Ertel, K.J., Lipinski, D.M., McCall, M.A., and Gregg, R.G. (2019). Presynaptic Expression of LRIT3 Transsynaptically Organizes the Postsynaptic Glutamate Signaling Complex Containing TRPM1. Cell Rep. *27*, 3107-3116.e3. Humayun, M.S., De Juan E., J., Del Cerro, M., Dagnelie, G., Radner, W., Sadda, S.R., and Del Cerro, C. (2000). Human neural retinal transplantation. Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. *41*, 3100–3106.

Iraha, S., Tu, H.Y., Yamasaki, S., Kagawa, T., Goto, M., Takahashi, R., Watanabe, T., Sugita, S., Yonemura, S., Sunagawa, G.A., et al. (2018). Establishment of Immunodeficient Retinal Degeneration Model Mice and Functional Maturation of Human ESC-Derived Retinal Sheets after Transplantation. Stem Cell Reports *10*, 1059–1074.

Ishikawa, M., Sawada, Y., and Yoshitomi, T. (2015). Structure and function of the interphotoreceptor matrix surrounding retinal photoreceptor cells. Exp. Eye Res. *133*, 3–18.

Itakura, G., Ozaki, M., Nagoshi, N., Kawabata, S., Nishiyama, Y., Sugai, K., Iida, T., Kashiwagi, R., Ookubo, T., Yastake, K., et al. (2017). Low immunogenicity of mouse induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells. Sci. Rep. *7*, 1–13.

Kashani, A.H., Lebkowski, J.S., Rahhal, F.M., Avery, R.L., Salehi-Had, H., Dang, W., Lin, C.M., Mitra, D., Zhu, D., Thomas, B.B., et al. (2018). A bioengineered retinal pigment epithelial monolayer for advanced, dry age-related macular degeneration. Sci. Transl. Med. *10*, 1–10.

Kuwahara, A., Ozone, C., Nakano, T., Saito, K., Eiraku, M., and Sasai, Y. (2015). Generation of a ciliary margin-like stem cell niche from self-organizing human retinal tissue. Nat. Commun. *6*, 1–15. Kuwahara, A., Yamasaki, S., Mandai, M., Watari, K., Matsushita, K., Fujiwara, M., Hori, Y.,

Hiramine, Y., Nukaya, D., Iwata, M., et al. (2019). Preconditioning the Initial State of Feeder-free Human Pluripotent Stem Cells Promotes Self-formation of Three-dimensional Retinal Tissue. Sci. Rep. *9*, 1–16.

Mandai, M., Homma, K., Okamoto, S., Yamada, C., Nomori, A., and Takahashi, M. (2012). Adequate Time Window and Environmental Factors Supporting Retinal Graft Cell Survival in rd Mice. Cell Med. *4*, 45–54.

Mandai, M., Fujii, M., Hashiguchi, T., Sunagawa, G.A., Ito, S., Sun, J., Kaneko, J., Sho, J., Yamada, C., and Takahashi, M. (2017a). iPSC-Derived Retina Transplants Improve Vision in rd1 End-Stage Retinal-Degeneration Mice. Stem Cell Reports *8*, 69–83.

Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., et al. (2017b). Autologous Induced Stem-Cell–Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. N. Engl. J. Med. *376*, 1038–1046.

Matsuyama, T., Tu, H.-Y., Sun, J., Hashiguchi, T., Akiba, R., Sho, J., Fujii, M., Onishi, A., Takahashi, M., and Mandai, M. (2021). Genetically engineered stem cell derived retinal grafts for improved retinal reconstruction after transplantation. IScience *24*, 102866.

Miyazaki, T., Futaki, S., Suemori, H., Taniguchi, Y., Yamada, M., Kawasaki, M., Hayashi, M., Kumagai, H., Nakatsuji, N., Sekiguchi, K., et al. (2012). Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. Nat. Commun. *3.* Mochizuki, M., Sugita, S., and Kamoi, K. (2013). Immunological homeostasis of the eye. Prog.

Retin. Eye Res. 33, 10–27.

Morizane, A., Kikuchi, T., Hayashi, T., Mizuma, H., Takara, S., Doi, H., Mawatari, A., Glasser, M.F., Shiina, T., Ishigaki, H., et al. (2017). MHC matching improves engraftment of iPSC-derived neurons in non-human primates. Nat. Commun. *8*, 1–12.

Nakagawa, M., Taniguchi, Y., Senda, S., Takizawa, N., Ichisaka, T., Asano, K., Morizane, A., Doi, D., Takahashi, J., Nishizawa, M., et al. (2014). A novel efficient feeder-Free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. Sci. Rep. *4*, 1–7.

Nakajima, Y., Iwakabe, H., Akazawa, C., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N., and Nakanishi, S. (1993). Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4- phosphonobutyrate. J. Biol. Chem. *268*, 11868–11873. Nakano, T., Ando, S., Takata, N., Kawada, M., Muguruma, K., Sekiguchi, K., Saito, K., Yonemura, S., Eiraku, M., and Sasai, Y. (2012). Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. Cell Stem Cell *10*, 771–785.

Ozaki, M., Iwanami, A., Nagoshi, N., Kohyama, J., Itakura, G., Iwai, H., Nishimura, S., Nishiyama, Y., Kawabata, S., Sugai, K., et al. (2017). Evaluation of the immunogenicity of human iPS cellderived neural stem/progenitor cells in vitro. Stem Cell Res. *19*, 128–138.

Palczewski, K., Van Hooser, J.P., Garwin, G.G., Chen, J., Liou, G.I., and Saari, J.C. (1999). Kinetics of visual pigment regeneration in excised mouse eyes and in mice with a targeted disruption of the gene encoding interphotoreceptor retinoid-binding protein or arrestin. Biochemistry *38*, 12012–12019.

Radtke, N.D., Aramant, R.B., Petry, H.M., Green, P.T., Pidwell, D.J., and Seiler, M.J. (2008). Vision Improvement in Retinal Degeneration Patients by Implantation of Retina Together with Retinal Pigment Epithelium. Am. J. Ophthalmol. *146*, 172–182.

Sato, S., Omori, Y., Katoh, K., Kondo, M., Kanagawa, M., Miyata, K., Funabiki, K., Koyasu, T.,

Kajimura, N., Miyoshi, T., et al. (2008). Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. Nat. Neurosci. *11*, 923–931.

Shirai, H., Mandai, M., Matsushita, K., Kuwahara, A., Yonemura, S., Nakano, T., Assawachananont, J., Kimura, T., Saito, K., Terasaki, H., et al. (2016). Transplantation of human embryonic stem cellderived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration. Proc. Natl. Acad. Sci. *113*, E81–E90.

Streilein, J.W. (2003). Ocular immune privilege: Therapeutic opportunities from an experiment of nature. Nat. Rev. Immunol. *3*, 879–889.

Sugita, S. (2009). Role of ocular pigment epithelial cells in immune privilege. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). *57*, 263–268.

Sugita, S., Futagami, Y., Smith, S.B., Naggar, H., and Mochizuki, M. (2006). Retinal and ciliary body pigment epithelium suppress activation of T lymphocytes via transforming growth factor beta. Exp. Eye Res. *83*, 1459–1471.

Sugita, S., Iwasaki, Y., Makabe, K., Kamao, H., Mandai, M., Shiina, T., Ogasawara, K., Hirami, Y., Kurimoto, Y., and Takahashi, M. (2016a). Successful Transplantation of Retinal Pigment Epithelial Cells from MHC Homozygote iPSCs in MHC-Matched Models. Stem Cell Reports *7*, 635–648. Sugita, S., Iwasaki, Y., Makabe, K., Kimura, T., Futagami, T., Suegami, S., and Takahashi, M. (2016b). Lack of T Cell Response to iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells from HLA Homozygous Donors. Stem Cell Reports *7*, 619–634.

Sugita, S., Iwasaki, Y., Makabe, K., Kamao, H., Mandai, M., Shiina, T., Ogasawara, K., Hirami, Y., Kurimoto, Y., and Takahashi, M. (2016c). Successful Transplantation of Retinal Pigment Epithelial Cells from MHC Homozygote iPSCs in MHC-Matched Models. Stem Cell Reports 7, 635–648. Sugita, S., Mandai, M., Hirami, Y., Takagi, S., Maeda, T., Fujihara, M., Matsuzaki, M., Yamamoto, M., Iseki, K., Hayashi, N., et al. (2020). HLA-Matched Allogeneic iPS Cells-Derived RPE

Transplantation for Macular Degeneration. J. Clin. Med. 9, 2217 1-18.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell *126*, 663–676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell *131*, 861–872.

Thomson, J.A. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science (80-.). 282, 1145–1147.

Tu, H.Y., Watanabe, T., Shirai, H., Yamasaki, S., Kinoshita, M., Matsushita, K., Hashiguchi, T., Onoe, H., Matsuyama, T., Kuwahara, A., et al. (2019). Medium- to long-term survival and functional examination of human iPSC-derived retinas in rat and primate models of retinal degeneration. EBioMedicine *39*, 562–574.

Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Nishikawa, S.I., Muguruma, K., et al. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. Nat. Biotechnol. *25*, 681–686.

Wooff, Y., Man, S.M., Aggio-Bruce, R., Natoli, R., and Fernando, N. (2019). IL-1 family members mediate cell death, inflammation and angiogenesis in retinal degenerative diseases. Front. Immunol. *10*, 1–21.

Yamasaki, S., Sugita, S., Horiuchi, M., Masuda, T., Fujii, S., Makabe, K., Kawasaki, A., Hayashi, T., Kuwahara, A., Kishino, A., et al. (2021). Low Immunogenicity and Immunosuppressive Properties of Human ESC- and iPSC-Derived Retinas. Stem Cell Reports *16*, 851–867.

Yamasaki, S., Tu, H.-Y., Matsuyama, T., Horiuchi, M., Hashiguchi, T., Sho, J., Kuwahara, A., Kishino, A., Kimura, T., Takahashi, M., et al. (2022). A Genetic modification that reduces ON-bipolar cells in hESC-derived retinas enhances functional integration after transplantation cells in hESC-derived retinas enhances. IScience *25*, 103657.

Yau, K.W., and Hardie, R.C. (2009). Phototransduction Motifs and Variations. Cell 139, 246–264.

#### 謝辞

本論文を終えるにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科 藤尾慈 先生に心より御礼申し上げます。

本研究は、理化学研究所、及び大日本住友製薬株式会社において行われたものであり、本研究 を行う機会を与えていただき、またご指導ご鞭撻をいただきました、高橋先生、万代先生、杉 田先生、木村氏、岸野氏、池田氏に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、深いご理解とご協力を賜わり、日常の議論を通して多くのご指摘 をいただきました理化学研究所の栗本先生、前田亜希子先生、前田忠郎先生、永樂氏、大西 氏、二木氏、Tu氏、松山氏、増田氏、森永氏、神田氏、田中氏、小出氏、伊良波氏、渡邊 氏、秋葉氏、宇山氏、You-Ren氏、伊藤氏、小林氏、後藤氏、北畑氏、真壁氏、藤井氏、石田 氏、江戸氏、大日本住友製薬株式会社の平峯氏、松下氏、糠谷氏、桑原氏、亀井氏、渡氏、喜 多氏、木曽氏に心より御礼申し上げます。

また、ES/iPS 細胞の培養や分化誘導、免疫染色や移植実験等において、ご協力を賜りました 大日本住友製薬株式会社 堀内氏、ぜい田氏、仙波氏、理化学研究所 橋口氏、藤井氏、庄氏に 心から深く感謝申し上げます。

研究以外の面においても支えて下さった、理化学研究所 網膜再生プロジェクトの皆様、大日 本住友製薬株式会社 再生・細胞医薬神戸センターの皆様にこの場を借りて厚く感謝申し上げ ます。

最後に博士号取得への理解と長きに渡りご協力いただいた家族に心から感謝申し上げます。

2021年3月 山﨑優

# 主論文

1. Preconditioning the Initial State of Feeder-free Human Pluripotent Stem Cells Promotes Selfformation of Three-dimensional Retinal Tissue.

Atsushi Kuwahara\*, **Suguru Yamasaki\*(\*Co-first)**, Michiko Mandai, Kenji Watari, Keizo Matsushita, Masayo Fujiwara, Yoriko Hori, Yasushi Hiramine, Daiki Nukaya, Miki Iwata, Akiyoshi Kishino, Masayo Takahashi, Yoshiki Sasai, Toru Kimura.

Scientific Reports. 2019 Dec 12, 9, 18936

2. Low Immunogenicity and Immunosuppressive Properties of Human ESC- and iPSC-Derived Retinas.

**Suguru Yamasaki\*(\*Co-first)**, Sunao Sugita\*, Matsuri Horiuchi, Tomohiro Masuda, Syota Fujii, Kenichi Makabe, Akihiro Kawasaki, Takuya Hayashi, Atsushi Kuwahara, Akiyoshi Kishino, Toru Kimura, Masayo Takahashi, Michiko Mandai. *Stem Cell Reports*. 2021 Apr 13, 16, 851-867

3. A Genetic modification that reduces ON-bipolar cells in hESC-derived retinas enhances functional integration after transplantation.

<u>Suguru Yamasaki</u>, Hung-Ya Tu, Take Matsuyama, Matsuri Horiuchi, Tomoyo Hashiguchi, Junki Sho, Atsushi Kuwahara, Akiyoshi Kishino, Toru Kimura, Masayo Takahashi, Michiko Mandai *iScience.* 2022 Jan 21, 25, 103657

4. Addition of Chk1 inhibitor and BMP4 cooperatively promotes retinal tissue formation in selforganizing human pluripotent stem cell differentiation culture.

<u>Suguru Yamasaki</u>, Atsushi Kuwahara, Akiyoshi Kishino, Toru Kimura, Masayo Takahashi, Michiko Mandai.

Regenerative Therapy. 2022 Mar, 19, 24-34

#### 参考論文

1. Establishment of Immunodeficient Retinal Degeneration Model Mice and Functional Maturation of Human ESC-Derived Retinal Sheets after Transplantation.

Satoshi Iraha, Hung-Ya Tu, **Suguru Yamasaki**, Takahiro Kagawa, Motohito Goto, Riichi Takahashi, Takehito Watanabe, Sunao Sugita, Shigenobu Yonemura, Genshiro A Sunagawa, Take Matsuyama, Momo Fujii, Atsushi Kuwahara, Akiyoshi Kishino, Naoshi Koide, Mototsugu Eiraku, Hidenobu Tanihara, Masayo Takahashi, Michiko Mandai

Stem Cell Reports. 2018 Mar 13, 10, 1059-1074

2. Medium- to long-term survival and functional examination of human iPSC-derived retinas in rat and primate models of retinal degeneration.

Hung-Ya Tu\*, Takehito Watanabe\*, Hiroshi Shirai\*, <u>Suguru Yamasaki\*(\*Co-first)</u>, Masaharu Kinoshita, Keizo Matsushita, Tomoyo Hashiguchi, Hirotaka Onoe, Take Matsuyama, Atsushi Kuwahara, Akiyoshi Kishino, Toru Kimura, Mototsugu Eiraku, Kiyoshi Suzuma, Takashi Kitaoka, Masayo Takahashi, Michiko Mandai

EBioMedicine. 2019 Jan, 39, 562-574

3. A ROCK Inhibitor Promotes Graft Survival during Transplantation of iPS-Cell-Derived Retinal Cells. Masaaki Ishida, Sunao Sugita, Kenichi Makabe, Shota Fujii, Yoko Futatsugi, Hiroyuki Kamao, <u>Suguru</u> <u>Yamasaki</u>, Noriko Sakai, Akiko Maeda, Michiko Mandai, Masayo Takahashi *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 22, 22, 3237 4. Effects of indole on drug resistance and virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium revealed by genome-wide analyses.

Eiji Nikaido, Etienne Giraud, Sylvie Baucheron, Suguru Yamasaki, Agnès Wiedemann, Kousuke Okamoto, Tatsuya Takagi, Akihito Yamaguchi, Axel Cloeckaert, Kunihiko Nishino *Gut Pathogens*. 2012 May 25, 4, 5

5. The crystal structure of multidrug-resistance regulator RamR with multiple drugs. <u>Suguru Yamasaki</u>, Eiji Nikaido, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Daisuke Fujiwara, Ikuo Fujii, Kunihiko Nishino *Nature Communications*. 2013 Jun 26, 4, 2078

6. Phenotype microarray analysis of the drug efflux systems in Salmonella enterica serovar Typhimurium.

Seiji Yamasaki, Takuma Fujioka, Katsuhiko Hayashi, <u>Suguru Yamasaki</u>, Mitsuko Hayashi-Nishino, Kunihiko Nishino

J Infect Chemother 2016 Nov, 22780-784

7. Crystal structure of the multidrug resistance regulator RamR complexed with bile acids. **Suguru Yamasaki**, Nakashima R, Sakurai K, Baucheron S, Giraud E, Doublet B, Cloeckaert A, Nishino K.

Scientific Reports. 2019 Jan 17, 9, 177