

Title	Establishment of immunodeficient retinal degeneration model mice and functional maturation of human ESC-derived retinal sheets after transplantation(Abstract_要旨)
Author(s)	Iraha, Satoshi
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2019-01-23
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k21448
Right	リポジトリ登録であれば出版社版でも可能。
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士 (医学)	氏 名	伊良波 論
論文題目	Establishment of immunodeficient retinal degeneration model mice and functional maturation of human ESC-derived retinal sheets after transplantation (免疫不全・網膜変性マウスモデルの作製とヒト ES 細胞由来網膜シート移植後の機能的成熟)		
(論文内容の要旨)			
<p>【目的】網膜色素変性は遺伝性・進行性の網膜変性疾患であり、主に光を感じ取る視細胞が障害を受け、失明に至ることもある疾患である。網膜色素変性に対する ES/iPS 細胞由来網膜を用いた移植治療の臨床応用に取り組むためには、ヒト組織を移植後詳細に機能評価できる疾患モデル動物が必要であった。重度免疫不全マウスである NOG マウスは再生医療領域で重要な基盤系統であるが、本論文では 2 種の網膜変性モデルマウスを NOG 化し、モデル動物としての表現系の評価及びヒト ES 細胞由来網膜組織を移植して生着・成熟を確認した。さらに、移植後のホスト網膜における光応答の回復の有無を調べた。</p> <p>【方法】ヒト網膜色素変性の原因遺伝子の一つである Phosphodiesterase 6B 遺伝子に変異を有する網膜変性のモデルマウス <i>rd1-2J</i> マウスと <i>rd10</i> マウスの 2 系統を体外受精・胚移植及び自然交配により NOG 化した(NOG-<i>rd1-2J</i>、NOG-<i>rd10</i> マウス)。視細胞変性速度を <i>rd1-2J</i>、<i>rd10</i> マウスと免疫組織学的に比較した。また、ヒト ES 細胞由来網膜組織を網膜下に移植し、移植組織の生存、成熟を免疫組織学的に評価した。更に、光応答の改善の有無について、多点電極アレイ (MEA) を用いて、ホストマウス網膜神経節細胞 (RGC) からの光応答を調べた。</p> <p>【結果】NOG-<i>rd1-2J</i>、NOG-<i>rd10</i> マウスを得ることができた。ともに 10 週齢で視細胞層はみとめず、網膜変性を認めた。変性速度を調べると、NOG-<i>rd1-2J</i> マウスでは <i>rd1-2J</i> マウスと変性速度に大きな差は認めなかったが、NOG-<i>rd10</i> マウスでは明らかに <i>rd10</i> マウスよりも早期から変性を認めた。NOG-<i>rd1-2J</i> マウスにヒト ES 細胞由来網膜組織を移植し、分化 200 日以降で観察した所、視細胞成熟マーカーの発現を認め、電子顕微鏡でも成熟した視細胞の構造を確認できた。光刺激へのホスト RGC の残存応答は、移植をしていない生後 8 週や 12 週の NOG-<i>rd1-2J</i> マウスの網膜でも孤発性に見られたが、それらは視神経から 1mm 以内の近位部では見られず、同部位では正常な錐体細胞の残存も見られなかった。移植後、分化日数 200-260 日の時点で 8 眼に対して MEA を施行した。3 眼は反応せず、2 眼はわずかに反応を示し、3 眼は移植部位に局在する複数の RGC 反応を認め、その反応は視神経近位部も見られ、移植片由来の反応であることが示唆された。対照としてマウス iPS 細胞由来網膜組織を NOG-<i>rd1-2J</i> マウスに移植すると、同様の反応がより明瞭に検出された。</p> <p>【考察】NOG 化網膜変性モデルマウスに、ヒト ES 細胞由来網膜組織を移植したところ、200 日以上も生着し、視細胞の成熟も確認できたことから、ヒト由来網膜組織の生着を評価するのに適したモデルを作成することができた。NOG-<i>rd1-2J</i> モデルでは、特に視神経近位での残存視細胞およびその反応は検出されず、移植後の移植部位に局在する複数の RGC 細胞の光応答は移植片に由来する反応を捉えていることが示唆された。移植片周辺には典型的な光応答とは異なる過敏な光応答もしばしば見られ、シナプス形成過程の未熟な反応を捉えている可能性も示唆され</p>			

た。ヒト ES 細胞由来網膜組織を移植することで、末期の変性網膜において光応答機能が回復する可能性を示すと共に、マウス iPS 細胞由来網膜移植ではより顕著な反応が得られたことから、他種移植においても機能的生着はするものの、同種他家移植に比べるとシナプス形成効率が劣る可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

網膜色素変性は現在のところ有効な治療法がなく、治療法の研究と開発が期待されている。

申請者らは疾患に対して再生医療の技術を用いた移植治療の研究に取り組んでいる。患者への臨床応用にあたっては、ヒト幹細胞由来の網膜組織が移植後に機能改善をするか検証する必要がある。

本論文では、まずヒト組織を移植し、機能評価できる疾患モデル動物の作製が行われた。2 種の変性速度の異なる網膜変性モデルマウスを重度免疫不全化して NOG-*rd1-2J*、NOG-*rd10* マウスを作製し、モデル動物としての表現系の評価を行った。次に、作製した NOG-*rd1-2J* マウスにヒト ES 細胞由来網膜組織を移植して、移植後半年の時点でも移植片が生着していることを確認し、電子顕微鏡で成熟した視細胞の構造である外節構造を確認した。さらに、多点電極アレイを用いて、移植後のホストマウスの網膜神経節細胞から移植片に由来する光応答を確認し、機能改善も認めた。

以上の研究はヒト細胞由来網膜組織の生着を評価するのに適したモデル動物を作製し、ヒト ES 細胞由来網膜組織を移植することで、末期の変性網膜において光応答機能が回復する可能性の解明に貢献し、網膜色素変性に対する再生医療を用いた移植治療の臨床応用に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 30 年 11 月 13 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降