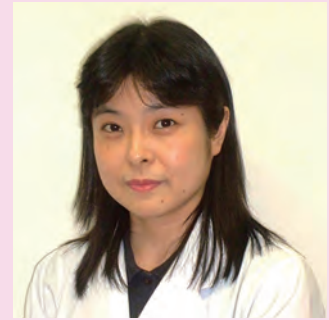


ヒト体細胞から網膜視細胞への分化誘導

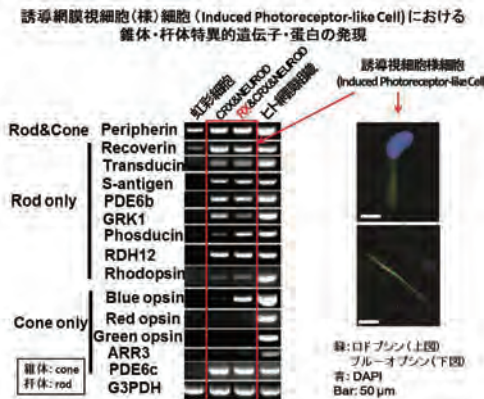
網膜の再生研究は近年急速に進み、実用化も近いと言われる。ヒトのES細胞やiPS細胞から視細胞、さらに網膜組織までがin vitroでつくられている。一方、多能性幹細胞ではなく“体細胞”に数種類の転写因子遺伝子をミックスして導入するとiPS細胞を経ることなく比較的短期間で必要な細胞を得ることができる“ダイレクト・リプログラミング”と呼ばれる技術も開発され、すでに心臓、膵臓、神経などがつくられている。我々は、この方法によって幼若なヒト虹彩細胞から網膜視細胞様の細胞を作製した。国立成育医療研究センターの倫理委員会の承認を得て、同センター眼科で網膜芽細胞種の治療目的で摘出された眼球(ドナーの年齢は、6か月から3歳)から、虹彩細胞を単離した。網膜の発生や視物質の発現を制御し、網膜に特異的に発現する転写因子から6種類(SIX3, PAX6, RX, CRX, NRL, NEUROD)を選び、培養虹彩細胞にレトロウィルスベクターを用いて導入した。視細胞への分化の程度は、網膜に特異的に発現するオプシン等についてRT-PCR法と免疫染色で評価し、電気生理学的手法(パッチクランプ)での機能的評価も行った。6因子の中で最低



世古 裕子

GCOE PD →
国立障害者リハビリテーションセンター研究所感覚機能系障害研究部 視覚機能障害研究室長

限必要な因子の組み合わせを検討した結果、CRXとNEURODの2因子が rhodopsin の発現に必須であり、この2因子にRXを加え3因子とすると blue opsin の発現が著明に増加し、誘導開始から1週間でオプシン発現は最大に達した。視細胞特異的遺伝子の発現は、この2因子のsiRNAで抑制された。一方、CRXとRXの2因子では、red opsin と green opsin の発現は誘導されたが、rhodopsin は誘導されなかった。CRX, NEUROD, RXの3因子を用いて分化誘導した培養虹彩細胞では、光トランスダクションに関わる遺伝子も発現が誘導されたが、青色光・緑色光刺激に対して脱分極性の応答を示した。虹彩色素上皮細胞と虹彩実質細胞のどちらからも視細胞様細胞は作製された。誘導培養視細胞の作製は、網膜変性疾患の病態解明や治療に用いる薬剤のスクリーニング等に有用なモデルを提供するはずである。



代表論文

Seko Y, Azuma N, Kaneda M, Nakatani K, Miyagawa Y, Noshiro Y, Kurokawa R, Okano H, Umezawa A. Derivation of human differential photoreceptor-like cells from the iris by defined combinations of "CRX, RX" and "NEUROD". PLoS One. 2012;7(4): e35611. Epub 2012 Apr 25. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001254

フィラグリン欠損マウスの角層バリア機能と経皮免疫応答に関する解析

フィラグリンの遺伝子変異は、アトピー性皮膚炎の主要な発症因子として報告されている。フィラグリンは角層の主要な構成タンパク質で、ケラチン線維と結合し角層の構造の安定化に寄与すると共に、アミノ酸にまで分解されると天然保湿因子(Natural moisturizing factor: NMF)として働き、角層の水分保持に必須の役割を担うと考えられている。しかし、その詳細なメカニズムやin vivoでの役割は、フィラグリンを完全に欠損したマウスの欠如のため、いまだ明らかになっていなかった。我々はフィラグリン欠損(Flg-/-)マウスを作成し、角層のバリア機能維持及び経皮免疫応答におけるフィラグリンの影響について検討した。

生後3～6日目のFlg-/-マウスは、落屑を伴いドライスキン様の外観を呈した。フィラグリンの分解産物が主要な構成要素であるNMFは、Flg-/-角層で著しい減少を認めたものの、興味深いことに角層内水分量や経皮水分蒸散量は正常だった。一方、仔マウスの皮膚を注意深くテープストリップする実験により、Flg-/-角層は物理刺激に対し脆弱であることがわかった。電子顕微鏡による観察から、Flg-/-角層で、細胞骨格の安定化に寄与すると考えられるケラチン線維の配列パターンの異常が確認され、これがFlg-/-角層の脆弱性に関与している可能性が示唆された。続いて、カルセイン含有リボソームをマウス皮膚に塗布し、共焦点顕微鏡で色素の透過性を評価したところ、Flg-/-角層で色素透過性の亢進を認めた。以上より、フィラグリンが外から内への物質透過を防ぐ角層のバリア形成に重要であり、その欠損は外来抗原の表皮内への侵入を許すことが示唆された。Flg-/-マウスは、刺激性接触皮膚炎反応、ハプテン誘導性接触過敏反応、蛋白抗原塗布後の液性免疫応答のいずれの系においても、野生型マウスに比べ経皮免疫応答の亢進を認めた。

Flg-/-マウスは、in vivoでのフィラグリンの機能を評価し、バリア機能異常を有する皮膚への経皮的抗原曝露から疾患が発症するまでのアトピー性皮膚炎発症機序の解明につながる有用なツールとなる。



代表論文

Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Shimizu A, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. J Allergy Clin Immunol. 129(6):1538-46, 2012



川崎 洋

GCOE PD →
慶應義塾大学医学部訪問研究員 予防医学協会リサーチレジデント