

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10914

研究課題名(和文) 成体マウスミュラーグリア細胞への遺伝子導入による in vivo 網膜神経細胞再生

研究課題名(英文) Induction of Muller glia-derived retinal regeneration by expressing regeneration promoting genes

研究代表者

岡本 晶子(須賀)(Okamoto, Akiko)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・分子細胞生物学研究部・研究員

研究者番号：70450400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：視覚は生活の質の維持に重要な要素であり、視機能の再生・維持を目的として、iPS細胞を用いた細胞移植、チャンネルロドプシンを用いた機能回復、人工網膜などの研究が進んでいる。一方で、網膜の内在性幹細胞を利用した神経細胞の再生源として、ミュラーグリア細胞が注目されてきた。本研究ではアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた遺伝子導入により、傷害時のミュラーグリア細胞の増殖とその後の神経細胞への分化を促進することを目的とし、候補因子の比較、網膜へのAAV導入効率を検討した。

研究成果の概要(英文)：Recovery of visual function is a recent issue for regenerative medicine. Several methods, such as iPS cell-based retinal cell/tissue transplantation, recovery of visual function using channel Rhodopsin and artificial retinal implant, are in progress. On the other hand, retinal Muller glia is focused as an injury-induced retinal stem/progenitor cell in vertebrate species. Regeneration of retinal neuronal cells from Muller glia has also been studied. In this study, we examined regeneration potential of mouse Muller glia by inducing candidate regeneration promoting genes by using adeno-associated virus transfection.

研究分野：網膜 発生生物学 再生 分子生物学

キーワード：網膜 グリア細胞 再生 変性モデル

1. 研究開始当初の背景

哺乳類において中枢神経細胞の再生は非常に起こりにくいと考えられており、確かに網膜の変性疾患で失われた視機能が自然に回復することはない。しかし、内在性に神経細胞を再生する能力がまったく無いわけではなく、これまでの研究で網膜内の主要なグリア細胞であるミュラーグリア細胞から神経細胞を再生できることが報告されてきた。たとえば成体ラット網膜に対して急性傷害を与えるとミュラーグリア細胞が増殖を開始し、さらに遺伝子導入によって網膜内の神経細胞への分化を促進できることが示された。これらの増殖性ミュラーグリア細胞は網膜前駆細胞様のマーカー遺伝子を発現しており、傷害後に Wnt や上皮細胞成長因子 (EGF) といった増殖促進因子や分化促進因子を添加するとミュラーグリア細胞の増殖が促進され、神経細胞に分化する細胞も増えることが報告されている。マウスではミュラーグリア細胞の増殖が生後 2 週齢以内の若いマウスでしか見られないという報告もあるが、申請者はこれまでの研究で成体マウス網膜でも傷害後にミュラーグリア細胞が網膜前駆細胞と共通のマーカーを発現し、C57BL/6 (B6) 系統に対して 129 系統、BDF1 (B6 と DBA2 の掛け合わせ第一世代) マウスではより多くの細胞が増殖しており、さらにこれらの B6 以外の系統では Wnt シグナル活性化因子、EGF、繊維芽細胞成長因子 (FGF)、FGF+インスリンをそれぞれ添加したときにミュラーグリア細胞の増殖が促進されることを示した。さらに、ミュラーグリア細胞の増殖しやすさの違いに関わる因子を調べるために最も差の大きかった B6 系統と 129 系統の間で網膜傷害前後での遺伝子発現の差を比較した結果、傷害後に 129 系統では網膜前駆細胞と共通の遺伝子の発現が上昇していたのに対し、B6 系統では炎症応答に関わる因子の発現が高くなることが示された。

ミュラーグリア細胞由来の網膜再生能が非常に高いゼブラフィッシュでは、先に挙げた Wnt シグナル、EGF シグナル、FGF シグナル、インスリンシグナル全てが網膜傷害後に上昇し、それらが相乗的に網膜神経細胞の再生を促進することが示されている。申請者が得た結果は、遺伝的背景に影響されるものの、これらのゼブラフィッシュと共通のシグナルが哺乳類でもミュラーグリア細胞の網膜前駆細胞化を促進することを示している。しかし、上に挙げたような増殖因子の眼内への添加はミクログリアや血管内皮細胞などに対しても非特異的に増殖促進する可能性が高く、ミュラーグリア細胞特異的に増殖・脱分化に重要な遺伝子を制御する事が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまでに行ったマウス系統間での遺伝子発現量の比較データとゼブラフィッシュでの報告をもとに、まず哺乳類のミュラーグリア細胞株を用いて網膜前駆細胞化と神経細胞への分化に寄与する候補遺伝子の機能評価を行う。さらにここで絞り込まれた候補遺伝子・遺伝子群を生体網膜内のミュラーグリア細胞に高効率で感染する改変型アデノ随伴ウイルスを用いてマウス・ラットに投与し、光傷害による急性の視細胞変性モデルと遺伝的な網膜変性疾患モデルでもミュラーグリア細胞の網膜前駆細胞化と網膜神経細胞の再生が促進されるかどうかを検討する。すでに転写因子の組み合わせによって増殖性のミュラーグリアから特定の網膜神経細胞への分化誘導効率が上がることが知られており、これらの遺伝子をさらに加えることで生体内でより高効率に目的とする神経細胞が再生されると期待できる。また、成体で常に視細胞が新生されているゼブラフィッシュとは異なり、恒常的な細胞新生が見られない哺乳類網膜内で神経細胞への分化と生着を促進するために、in

vitro の視細胞分化誘導系で効果が見られているレチノイン酸やタウリン、また眼内の炎症抑制による新生細胞の生着促進を試みる。

3. 研究の方法

申請者が行った網膜傷害後に発現が上昇する遺伝子のマウス系統間での比較により、ミュラーグリア細胞の増殖に対応して発現が高くなる遺伝子の中には網膜前駆細胞と共通の遺伝子があることが示された(78 個中7 個)。これらの中にはCyclin やMyc など細胞周期の制御に直接かかわる遺伝子の他に、神経幹細胞の未分化性や細胞増殖と分化に関わる機能が既に報告されている遺伝子が複数含まれていた。これらの遺伝子と先行研究で用いられているAscl1 をミュラーグリア細胞の網膜前駆細胞化促進候補因子とし、まず株化されたミュラーグリア細胞(C57M10、M10-M1等)又はミュラーグリア細胞の初代培養を用いて機能を評価する。Pollak らの方法ではマウスミュラーグリア細胞の初代培養作成から20 日程度で網膜神経細胞のマーカー発現を確認しており、これを指標に候補遺伝子の導入によって網膜前駆細胞に特徴的な遺伝子発現が見られるかどうか、ミュラーグリア細胞に特徴的な遺伝子の発現が低下するかどうかを確認する。またミュラーグリア細胞の初代培養細胞は増殖が遅いが(1 週間で2 倍程度)、Ascl1 を導入すると細胞増殖が促進されていることから、同様にpH3 で検出できるM 期の細胞数が変化するかどうかを確認する。第一目標としては対象として用いているAscl1 よりも網膜前駆細胞化が早く、又は効率よく見られる候補遺伝子があるかどうかを検討する。ここでそれほど大きな差が見られなかった場合、Ascl1 と他の候補遺伝子の組み合わせを試し、相乗的効果が得られるかどうかを検討する。また、前駆細胞化促進候補に加えて発生過程で網膜の各神経細胞への分化を制御する遺伝子の組み合わせを導入したときに分化の方向性が変化するかどうかを免疫染色により検討する。

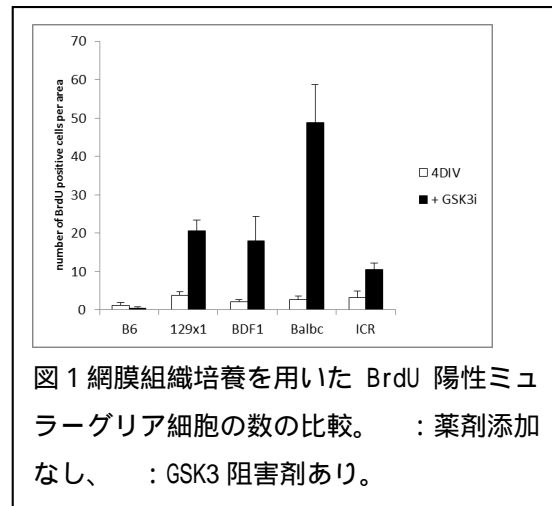
先年度の研究で得られるミュラーグリア細胞の前駆細胞化遺伝子、又は前駆細胞化遺伝子と特定の神経細胞への分化促進遺伝子の組み合わせを網膜変性モデルマウスにアデノ随伴ウイルスを用いて導入し、生体内でのミュラーグリア細胞由来の神経細胞の再生が促進されるかどうかを検討する。これまでの報告で変性する視細胞の量が多いほどミュラーグリア細胞の脱分化が起こりやすいことが言われており、申請者が薬剤投与による変性モデルと光傷害モデルを用いて検討した場合も確かに視細胞の変性が早いほど多くのミュラーグリア細胞が増殖していた(未発表)。これらの結果から、まず傷害の強さを人為的に光の強さでコントロールでき、視細胞変性のモデルとしてよく使われている光傷害モデルに対してin vitro で検討した候補遺伝子を導入し、視細胞の再生効果があるかどうかを検討する。遺伝子導入には先に述べたように硝子体注射でミュラーグリア細胞に効率よく感染することができる改変型アデノ随伴ウイルス(ShH10)を用いる。光傷害直前に候補遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルスを投与したマウスに対して、LED ライトを一定時間照射する。増殖細胞をラベルするために腹腔注射によりBrdU を投与する。ラットの光傷害モデルでは傷害後2 日 3 日目にミュラーグリア細胞の一過的な増殖が見られ、1 週間程度で視細胞外節の消失と外顆粒層の網膜全層に対する比率の顕著な減少が認められる。そこで傷害後1 日目から4 日目までの間に遺伝子導入によってミュラーグリア細胞の網膜前駆細胞化が促進されるかどうかをBrdU の取り込みやin vitro の検討で使用したマーカー遺伝子の発現で確認する。増殖から神経細胞への分化に移行すると予想される5 日以降については、導入遺伝子の効

果を増殖したミューラーグリア細胞由来と考えられるBrdU 陽性細胞の位置と神経細胞マーカーの発現によって検討し、さらに、各神経細胞への分化の比率を特異的なマーカーの染色で確認する。BrdU 陽性細胞の生着率が低い場合には、全体的な炎症を抑える合成ステロイド剤やミクログリアの活性化を抑えるミノサイクリンの投与で改善を試みる。また、より長期に外顆粒層の厚さが遺伝子導入によって保たれるかどうかを光干渉断層計によって継続的に観察し、顕著な効果が見られればERG や行動解析によって機能の回復を検討する。

4. 研究成果

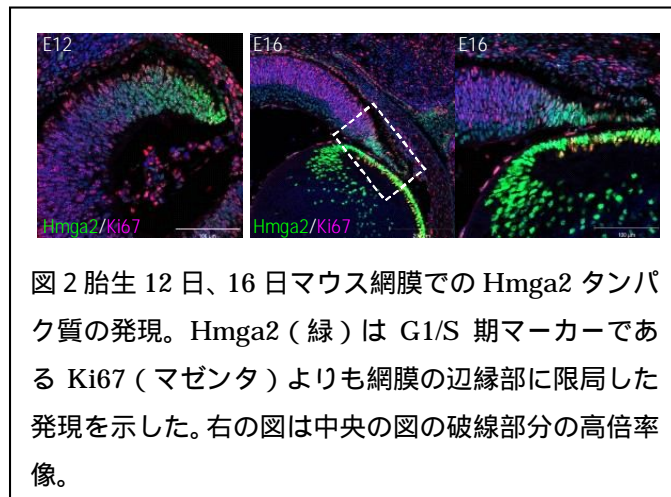
(1) マウス系統ごとのミューラーグリア細胞の増殖性の違い

これまでの研究で近交系である B6 マウスと 129 マウス、BDF1 マウス間でミューラーグリア細胞の網膜傷害後の増殖能に差があることを見ていたが、加えて Balb/c マウスとコンジェニックである ICR についても比較検討を行った(図1)。これまでの結果と同様に、B6 以外の系統は GSK3 阻害剤存在下ではミューラーグリア細胞の増殖が促進された。



(2) 増殖促進候補因子としての Hmga2 の網膜での発現

まず Ascl1 と共発現させる増殖促進因子として以前のスクリーニングで得られた Hmga2 の発現を発生中のマウス網膜組織で確認した(図2)。脊椎動物の網膜では周辺部に幹細胞が存在し、前駆細胞から最終分裂を終えた分化細胞が中心部に向かって加えられていくが、Hmga2 は周辺部で細胞増殖



マーカーである Ki67 と共局在しており、これまでの報告にあるように、より未分化性の高い細胞で発現していると考えられた。

(3) 遺伝子導入用ウイルスベクターの作成と in vivo 遺伝子発現の検討

網膜ミューラーグリア細胞へ遺伝子を導入するプラスミドベクターおよびアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを作成し、培養細胞、網膜組織培養、さらに生体マウス網膜への感染の検討を行った。培養細胞には高効率で感染し、導入遺伝子タンパク質の発現を確認できた。以前 B6 と 129 マウスの網膜組織培養で細胞増殖を比較した実験を参考に、生後 8 週齢 B6 マウスの網膜組織培養に対して、Venus と Hmga2 又は Ascl1 を AAV にて導入したところ、

ミュラーグリア細胞への感染は見られたが増殖は確認できなかった(図3)

成体マウス由来の網膜組織培養および生体マウスでの AAV による遺伝子導入効率が予想よりも低く、増殖能の変化の観察が困難と考えられたため、まず感染効率に影響する条件を検討した。

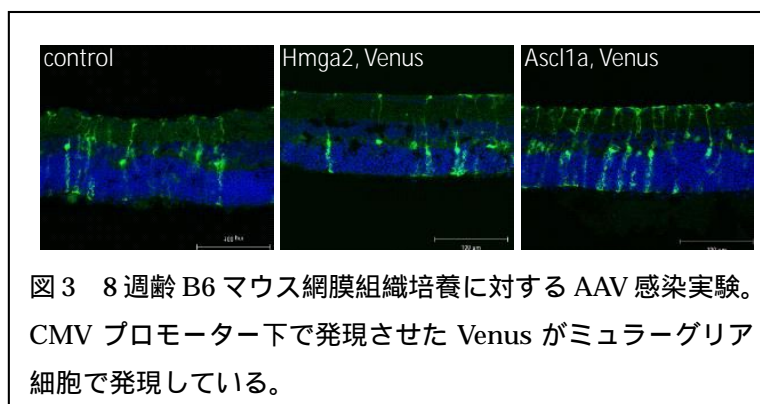


図3 8週齢 B6 マウス網膜組織培養に対する AAV 感染実験。CMV プロモーター下で発現させた Venus がミュラーグリア細胞で発現している。

その結果、ウイルスベクターの精製過程よりも実験に用いるマウスの週齢が感染効率に大きく影響していた。最終的に生後10日目以内のマウスに対しては、改変型ウイルスベクターの使用により硝子体側から広範囲に遺伝子を導入することができた。本研究ではこれまでの実験結果から6週令以上の成体網膜に対して実験を行う予定だったが、ウイルスベクターの特性により生後10日以内の幼若マウスを用いることに変更した。生後7日目マウスの網膜に硝子体注射によって AAV ベクターを注入したが、Ascl1、Hmga2 の単独発現では蛍光タンパク質のみを発現させた対照群と細胞増殖や導入された細胞の種類に違いは見られなかった。

(4) ラットミュラーグリア由来培養細胞での比較

AAV による in vivo での遺伝子導入では導入効率のばらつきが予想以上に大きかったため、培養細胞にて細胞増殖および神経細胞への分化能の違いを比較するためにラットミュラーグリア細胞から樹立された細胞を購入し、遺伝子導入実験を行った。

(5) 視細胞障害モデルマウスの作成

先行論文では遺伝子改変により Cre 依存的にミュラーグリア細胞で Ascl1 を発現させたマウスに対し、NMDA 投与による網膜傷害を与えてミュラーグリア細胞の増殖と神経細胞への分化を検討している。しかし NMDA 投与では障害される神経細胞の種類を選べないことから、光障害による視細胞死を検討した。B6 マウスには Rpe65 遺伝子の多型により光による視細胞変性が起こりにくいと言われているため、当研究室で CRISPR/Cas9 法により作成したヒトの遺伝子変異を持つ疾患モデルマウスを用いて、光照射による視細胞変性の有無を検討している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Suga A, Mizota A, Kato M, et al., Identification of Novel Mutation in the LRR-Cap Domain of C21orf2 in Japanese Patients with Retinitis Pigmentosa and Cone-Rod Dystrophy. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 査読有、57 巻 4255-4263、2016
doi: 10.1167/iovs.16-19450

[学会発表](計5件)

Akiko Suga, et al., Novel mutation in *LRRTM4* is associated with dominantly inherited macular dystrophy with reduced ON-bipolar cell response., ARVO 2018,

2018

須賀晶子, et al., 網膜色素変性と錐体桿体ジストロフィーそれぞれの患者から見つかった繊毛遺伝子 C21orf2 の新規変異、第9回 Retina Research Meeting、2016

Akiko Suga, et al., Characterization and whole genome analysis of cynomolgus monkeys with hereditary macular drusen., XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research, 2016

Akiko Suga, et al., Identification of novel mutations in C21orf2 from Japanese patients with early-onset retinitis pigmentosa., 13th International Congress of Human Genetics, 2016

Akiko Suga, et al., Proliferation potential of Muller glia after retinal damage varies between mouse strains., ARVO 2015, 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 晶子 (OKAMOTO, Akiko)

独立行政法人国立病院機構・東京医療センター臨床研究センター・研究員

研究者番号：70450400

(3) 連携研究者

岩田 岳 (IWATA, Takeshi)

独立行政法人国立病院機構・東京医療センター臨床研究センター・部長

研究者番号：90374157