

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K16989

研究課題名(和文) DNA損傷応答が哺乳類網膜の再生に及ぼす影響

研究課題名(英文) The effects of DNA damage response to retinal regeneration in mammalian retina

研究代表者

蔣池 かわり (Komoike, Kaori)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90792408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミュラーグリアは網膜の主要なグリア細胞であり、網膜傷害時には増殖し、グリオシスを起こす。しかし、ミュラーグリアがどのように網膜の傷害を感知し応答しているのかは明らかでない。本研究では、N-methyl-N-nitrosourea (MNU)誘発視細胞傷害モデルを用いて、ラットミュラーグリアの傷害応答を制御する分子メカニズムを検討した。

その結果、ラットのミュラーグリアは変性視細胞のフォスファチジルセリンを認識することで網膜の変性を感知し、引き続きRac1が活性化することで増殖、グリオシス、変性細胞の貪食が引き起こされていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療研究において近年脚光を浴びている細胞移植とは異なる視点から、すなわち網膜が本来有する再生能力に着目し、その活性化により網膜再生を試みることを申請者らは最終的な目標としている。本事業により受けた助成によって、申請者らは世界で初めて網膜の傷害と、それにより変性した神経細胞を貪食することがミュラーグリアの増殖の引き金となっていることを明らかにした。本研究により哺乳類ミュラーグリアの特性が明らかになれば、未だ決定的な治療法が確立されていない網膜変性疾患や神経変性疾患の新たな治療法の開発に貢献する可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Muller glia, the major glial cells in the retina, proliferate and consequently induce gliosis after retinal injury. However, it is still unclear how Muller glia sense and respond to retinal injury. In this study, to investigate the molecular mechanisms underlying the injury response of Muller glia, we used the N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-induced photoreceptor injury model. The results suggest that rat Muller glia sense retinal degeneration by recognizing phosphatidylserine on the cell surface of degenerating photoreceptors followed by Rac1 activation that leads to proliferation, gliosis, and phagocytosis of degenerating cells.

研究分野：網膜再生

キーワード：ミュラーグリア 網膜再生 貪食 グリオシス フォスファチジルセリン Rac1 増殖 MNU

1. 研究開始当初の背景

再生医療が目覚ましい発展を続ける昨今、網膜の再生は、我が国が世界で初めて iPS 細胞を用いた細胞移植による臨床試験を行ったことから特に注目を集めており、国民の関心は高い。世界中で様々なグループが細胞移植による網膜の再生を研究している。一方、申請者らは移植治療とは別の視点から、哺乳類の網膜がなぜ再生しないのか、そのメカニズムを解明することで、網膜再生医療に寄与することを目指している。

魚類の網膜は再生することが知られており、そのメカニズムは、網膜のグリア細胞である Müller グリア(ミュラーグリア)が網膜傷害後、脱分化・増殖し神経細胞へ再分化することによる再生である(Fausett and Goldman, 2006)。しかし、哺乳類ではミュラーグリアによる再生はごく僅かである。ミュラーグリアの増殖を促進する因子がいくつか報告されているが、哺乳類網膜が再生しないメカニズムは明らかになっていない。哺乳類の網膜が再生しない根本的原因を解明する事が、哺乳類網膜の再生を成功させる上で必要不可欠である。

2. 研究の目的

申請者らは、これまでに成熟したラット、マウス、ゼブラフィッシュにアルキル化剤である N-methyl-N-nitrosourea(MNU)を投与することで視細胞変性を誘導し、網膜が再生する魚類と再生が制限される哺乳類を比較することで、哺乳類網膜の再生を負に制御する要因について検討し、①ラットでは、殆どのミュラーグリアが細胞周期へ進入し一過的に増殖するが、その後減少する。マウスではミュラーグリアは細胞周期へ進入せず、同じ哺乳類でも網膜傷害後のミュラーグリアの増殖能に差異がある。②細胞周期進入後、ラットのミュラーグリアは DNA 損傷マーカーである H2A.X、DNA 損傷応答としてアポトーシスを誘導することが知られる p53、その下流因子で、細胞周期を停止する p21 を発現する。一方、網膜が再生するゼブラフィッシュのミュラーグリアは DNA 損傷応答を呈することなく増殖を続けるという結果を得ていた。

本申請は、上記研究成果をさらに発展させ、同じ哺乳類であるにも関わらず、ラットのミュラーグリアが増殖するのに対し、なぜマウスのミュラーグリアは増殖しないのか、そのメカニズムを検討すること、および、DNA 損傷応答が哺乳類ミュラーグリアの再生能に及ぼす影響について検討することを目的として行った。

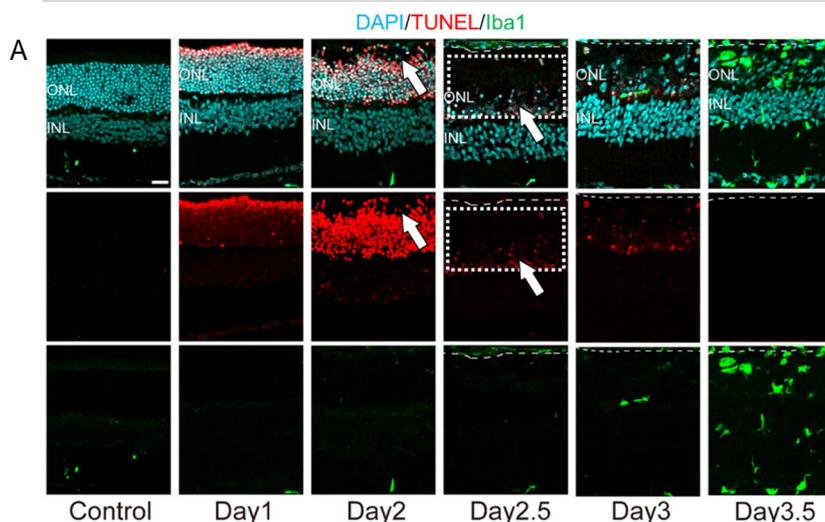
3. 研究の方法

5 週齢オスの Wistar ラットおよび C57BL/6J マウスへ MNU を腹腔内投与し、経時的に眼球を摘出し免疫組織化学的、分子生物学的な解析を行った。また、ミクログリア/マクロファージの活性化を阻害するためにミノサイクリンをラットへ腹腔内投与した。さらに、MNU 投与 2 日後のラット網膜を摘出しフォスファチジルセリン (PS) の認識を阻害する L-serine-0-phosphate (L-SOP)、Rac1 の活性化を阻害する NSC23766、ライソソームを可視化する LysoTracker、増殖細胞をラベルする 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) と共に組織培養した。

4. 研究成果

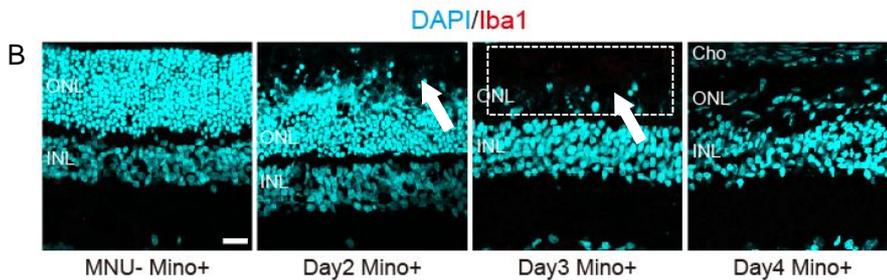
【研究の主な成果】

- (1) ミクログリア/マクロファージが抑制された網膜でも変性視細胞は除去される



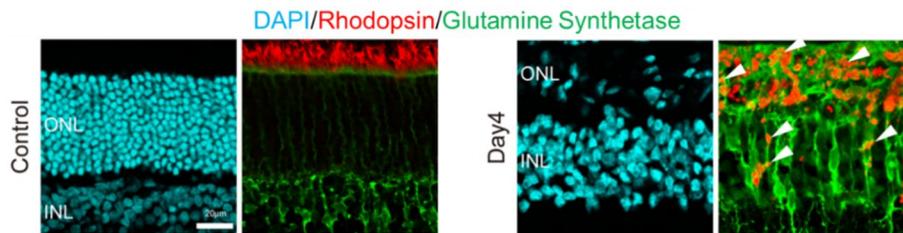
ラットの MNU 誘発視細胞傷害モデルでは、MNU 投与 1~2 日後、視細胞はアポトーシス細胞をラベルする TUNEL 染色陽性 (赤) となり、2~2.5 日後に殆ど消失した (矢印、破

線四角)。網膜の変性細胞を貪食除去することで知られているミクログリア/マクロファージは Day3.5 日後網膜内に多数侵入した(緑)。



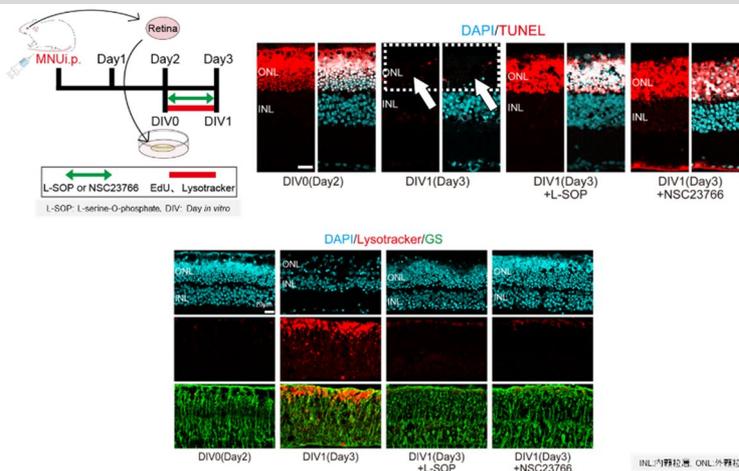
ラットへミクログリア/マクロファージの活性化を阻害するミノサイクリンを腹腔内投与した結果、ミクログリア/マクロファージの網膜内への進入は抑制され(赤)、ミノサイクリンを投与していないラット同様変性視細胞は消失した(矢印、破線四角)ことから、ラットの MNU 誘発視細胞傷害モデルでは、変性視細胞の除去にミクログリア/マクロファージの関与が低いことが示唆された。

(2) ミュラーグリアが変性視細胞を貪食除去している



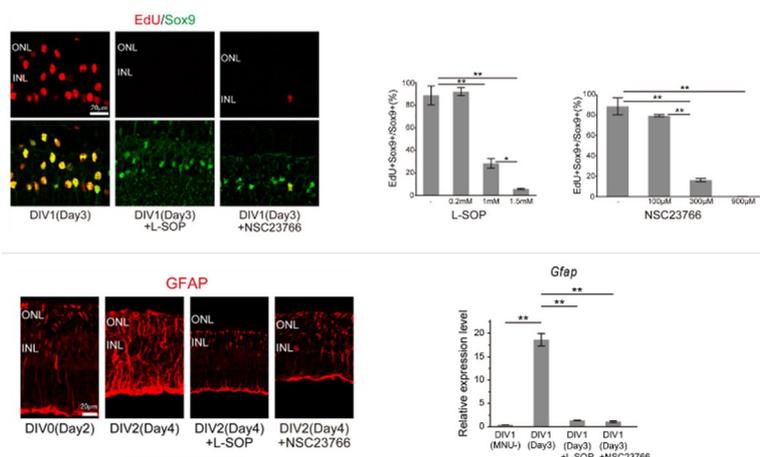
コントロール網膜では、ロドプシンは視細胞外節に特異的に検出されたが(左図赤)、MNU 処理網膜ではロドプシン陽性視細胞残骸様物質が外顆粒層に多数観察された(右図赤)。ミュラーグリアの細胞質マーカー(緑)とロドプシンを共染色すると、外顆粒層に存在するロドプシン陽性の視細胞の残骸がミュラーグリアの細胞質内に見られたことから(矢頭)、変性視細胞はミュラーグリアによって MNU 投与 2~2.5 日の間に貪食除去されていることが示された。我々は以前、MNU 処理ラット網膜において、殆どのミュラーグリアが 2 日後までに細胞周期へ進入することを報告しており(Nomura-Komoike et al., IOVS, 2016)、ミュラーグリアが変性視細胞を貪食する時期と細胞周期へ進入する時期が一致していることから、増殖と貪食能の獲得は共通のメカニズムで引き起こされているのではないかと仮説を立てた。

(3) 網膜傷害後のミュラーグリアの貪食応答には PS の認識と Rac1 の活性化が必要である



網膜の組織培養 1 日後(生体網膜では 3 日後に相当)までに変性視細胞はほとんど消失し(右上図矢印、破線四角)、ミュラーグリアにおいてライソソームの急激な蓄積が観察されたことから(下図赤)、生体網膜同様ミュラーグリアが変性視細胞を貪食処理した。しかし、貪食の主要制御因子である PS の認識と Rac1 の活性化を薬理的に阻害すると、変性視細胞は残存し、ライソソームの集積は抑制された。

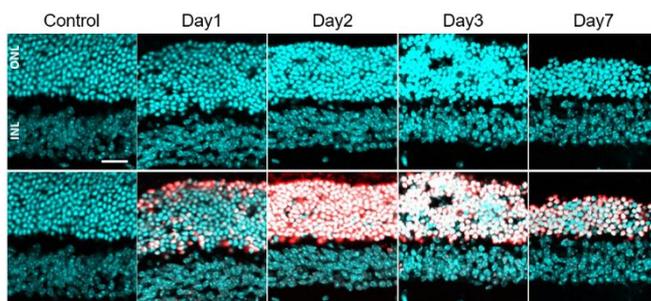
(4) 網膜傷害後のミュラーグリアの増殖には PS の認識と Rac1 の活性化が必要である



網膜の組織培養 1 日後までに S 期をラベルする EdU を取り込み（上図赤）、ミュラーグリアは増殖したが、PS の認識と Rac1 の活性化を薬理的に阻害するとミュラーグリアの増殖は抑制された（上図）

また、網膜の組織培養 1 日後までにグリオーシスのマーカーであるグリア線維酸性蛋白質は有意に増加したが（下図赤）、PS の認識と Rac1 の活性化を薬理的に阻害すると、ライソソームの集積は抑制された（下図）。

(5) MNU 投与後、マウスでは変性視細胞の消失が遅延する



ミュラーグリアが増殖しないマウスでは 網膜傷害後の変性視細胞の処理がラットと比較し大幅に遅延した。

以上の結果から、ラットの MNU 誘発視細胞傷害モデルではミュラーグリアが変性視細胞の PS を認識することで網膜の変性を感じ、引き続き Rac1 が活性化することで増殖、グリオーシス、変性細胞の貪食が引き起こされていることが示された。

【国内外における位置づけとインパクト】

ミュラーグリアが貪食能を有している事は 1932 年の Friedenwald らの報告から始まり、数多くの報告がなされているが、どのように貪食すべき細胞を認識しているのか、どのようなメカニズムによって貪食のメカニズムが制御されているのかについては全くわかっていなかった。また、魚類では網膜の傷害後、ミュラーグリアが網膜を再生する能力を有していることが 2006 年に Fausett らによって報告されてから、失った網膜神経細胞を補填し得る細胞として注目を集めている。哺乳類では網膜傷害後、魚類のようなミュラーグリアの増殖、脱分化や再分化という再正への反応が乏しく、それらを促進する因子の探索が行われており数多くの報告がある。しかし、ミュラーグリアの貪食活性の制御と網膜の再正反応の関与について実験的に示した報告は殆どなかった。本研究では、ミュラーグリアが変性細胞の PS を認識することで貪食のターゲットとして認識し、引き続き Rac1 が活性化することで増殖、グリオーシス、変性細胞の貪食を引き起こす、すなわち、貪食がミュラーグリアの再正反応の引き金となっていることを、ラットの視細胞傷害モデルを用いて世界で初めて報告した。

【今後の展望】

本研究により、研究の目的「同じ哺乳類であるにも関わらず、ラットのミューラーグリアが増殖するのに対し、なぜマウスのミューラーグリアは増殖しないのか、そのメカニズムを検討する」において上記成果を報告した。今後、マウスにおける変性視細胞の貪食活性を試み、ミューラーグリアの増殖を促進することができるのか検討を行う。「DNA 損傷応答が哺乳類ミューラーグリアの再生能に及ぼす影響について検討する。」という研究目的において、ミューラーグリアの増殖を抑制することによる DNA 損傷応答への影響、および DNA 損傷応答を抑制することによるミューラーグリアの増殖への影響について引き続き検討を続ける。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 蒋池 勇太、蒋池 かおり、松岡 雅人	4. 巻 189
2. 論文標題 Intake of acrylamide at the dietary relevant concentration causes splenic toxicity in adult zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Research	6. 最初と最後の頁 No.109977
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envres.2020.109977	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 蒋池 かおり、齋藤 文典、藤枝 弘樹	4. 巻 10
2. 論文標題 Phosphatidylserine recognition and Rac1 activation are required for Muller glia proliferation, gliosis and phagocytosis after retinal injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 No.1488
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-58424-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 早川るり子、蒋池かおり、川上速人、森嶋正恵、清水一彦、北原秀治、藤枝弘樹、江崎太一	4. 巻 27
2. 論文標題 Ultrastructural changes in the choriocapillaris of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in C57BL/6 mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 No.104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-020-00246-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 齋藤文典、蒋池かおり、藤枝弘樹
2. 発表標題 網膜変性時のミュラー細胞の脱分化・増殖に関するNotchシグナル
3. 学会等名 日本解剖学会第107回関東支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤文典, 蔣池かおり, 藤枝 弘樹
2. 発表標題 網膜再生に向けたAAVベクターの作製とミュラー細胞への遺伝子導入の検討
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蔣池かおり, 西野玲子, 藤枝弘樹
2. 発表標題 視細胞変性とMullerグリアの増殖性応答の時間的関連性：アルキル化剤による比較
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蔣池かおり, 藤枝弘樹
2. 発表標題 網膜傷害後の Muller グリアの増殖とグリオシス、変性細胞の除去にはフォスファチジルセリンの認識と Rac1 の活性化が関与する
3. 学会等名 第14回 Retinal Research Meeting
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蔣池かおり, 藤枝弘樹
2. 発表標題 フォスファチジルセリンの認識はミュラーグリアの細胞周期進入に必須である
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蒋池 かわり、齋藤 文典、藤枝 弘樹
2. 発表標題 The phagocytic and proliferative responses of Muller glia after retinal injury are driven by a shared mechanism in rat.
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蒋池 かわり、齋藤 文典、藤枝 弘樹
2. 発表標題 Mullerグリアの増殖、グリオース、変性細胞の除去にはフォスファチジルセリンの認識とRac1の活性化が関与している
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蒋池 かわり、齋藤 文典、藤枝 弘樹
2. 発表標題 ラットミュラーグリアによるフォスファチジルセリンの認識と増殖の開始
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川 亨、齋藤 文典、須藤 則広、蒋池 かわり、藤枝 弘樹
2. 発表標題 光傷害ラット網膜における神経細胞再生の検討 (第三報)
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川 るり子、蔣池 かわり、森島 正恵、清水 一彦、北原 秀治、菊田 幸子、川上 速人、藤枝 弘樹、江崎 太一
2. 発表標題 MNU-誘発網膜変性マウスモデルにおける脈絡膜毛細血管板内皮細胞の早期形態的变化とその意義
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川るり子、蔣池かわり、川上速人、森島正恵、清水一彦、北原秀治、藤枝弘樹、江崎太一
2. 発表標題 Dctopic cells found in the multilayered basal laminae of the choriocapillaris.
3. 学会等名 第12回網膜シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗山 和可子、齋藤 文典、蔣池 かわり、藤枝 弘樹
2. 発表標題 ミュラー細胞におけるS100 の発現変化と機能
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蔣池かわり、藤枝 弘樹
2. 発表標題 網膜傷害後のミュラーグリアによる視細胞の貪食
3. 学会等名 The 21th Vision science forum
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 蒋池 かわり、齋藤 文典、藤枝 弘樹
2. 発表標題 網膜傷害後のミュラーグリアによる変性視細胞の除去
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 早川るり子、森川俊一、蒋池かわり、北原秀治、清水一彦、森嶋正恵、藤枝弘樹、江崎太一
2. 発表標題 MNU誘導性視細胞変性モデルマウスにおける血管系の解析 脈絡膜毛細血管板の変化について
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 早川亨、齋藤文典、須藤則弘、蒋池かわり、藤枝弘樹
2. 発表標題 光傷害ラット網膜における神経細胞再生の検討（第二報）
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 早川るり子、蒋池かわり、森嶋正恵、清水一彦、北原秀治、川上速人、藤枝弘樹、江崎太
2. 発表標題 MNU - induced網膜変性モデルにおける脈絡膜毛細血管板の早期形態変化について
3. 学会等名 第11回 Retinal Research Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 早川るり子, 森川俊一, 蔣池かおり, 北原秀治, 清水一彦, 森島正恵, 藤枝弘樹, 江崎太一
2. 発表標題 Choriocapillaris during MNU-induced photoreceptor cell degeneration in mice.
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------