

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2010

課題番号：19500280

研究課題名（和文） 胚性幹細胞から分化誘導した網膜神経節細胞の移植による緑内障の治療

研究課題名（英文） Treatment of a glaucoma model by transplantation of cloned retinal progenitor cells derived from ES cells

研究代表者

黒川 真奈絵 (KUROKAWA MANAE)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：90301598

研究代表者の専門分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：緑内障、網膜神経節細胞、胚性幹細胞

## 1. 研究計画の概要

緑内障患者に胚性幹(ES)細胞に由来する網膜神経節細胞(RGC)を移植し損傷視神経を置き換える根治療法の確立を最終目的とし、その為の前臨床段階の検討を行う。

(1) マウス ES 細胞に眼発生に必須の遺伝子である pax6 を導入後神経細胞に適した環境で培養し、神経幹細胞特異的な分子を発現したクローンを選択する。当該クローンの形態を光学・電子顕微鏡にて観察し、RGC が発現する神経特異的蛋白・転写因子の発現を検討する。また興奮性細胞に特有のカルシウムの取り込みの有無を確認する。

(2) このpax6遺伝子導入細胞を視神経損傷マウスの網膜下組織へ移植し、移植細胞の生着及び生着後の細胞がRGCへと分化したかを検討する。それ以外の細胞への分化が認められれば、組織染色等により性状・機能等を検討し、移植後の分化について詳細に検討する。RGCへと分化した細胞について、その軸索が中脳上丘まで辿り着き後細胞に情報を伝達しているか確認する。

(3) 移植マウスが視力を回復したか、機能的検討を行う。正常マウス、視神経損傷マウス、および移植マウスにおいて対光反射を調べ、光刺激伝達能の回復の度合いを検討する。またこの3群において網膜電図を測定し、網膜における細胞の興奮過程を解析する。なお、神経接着分子 L1 のノックアウトマウスを複製して網膜神経節前駆細胞を移植し、再生した視神経が中脳上丘まで到達したか観察する。

## 2. 研究の進捗状況

(1) マウスES細胞に眼発生に必須の遺伝子であるpax6遺伝子とGFP遺伝子を導入し、限界希釈法によりクローン化した。nestinおよびMusashi-1を発現したものを選択培養したところ、アルカリフォスファターゼ陰性の双極性細胞および片側に長い軸索を伸長しもう一方に多数の樹状突起を示す細胞を認め、各々知覚神経およびRGC特有の形態を示した。

これらの細胞はpax6、神経特異分子であるβIII tubulin、neurofilament(NF)M、RGCに認められるBrn3a、Brn3b、Islet1、Thy1、メラノプシンを発現していた。またRGCの初期誘導に関わるmath5や、otx2、emx1、emx2、six3、shh等前脳を含む中枢神経の分化に関わる分子の発現も認めた。中脳に発現するEn1、En2や、運動ニューロンに発現するLim1、HB9の発現は認めなかった。

マウス腎被膜下に移植した網膜神経節前駆細胞を電子顕微鏡で観察したところ、神経細胞に特異的な微細管構造や神経線維を認め、神経細胞への分化を確認した。この細胞が興奮性細胞としての特性を有しているかをCa imaging法にて検討した。RGC様細胞はL-type、N-type、P/Q-type、T-typeのCaチャンネルのサブユニットを発現しており、広い範囲のCaチャンネルサブタイプを発現するRGCの特徴を反映した。KC1刺激により細胞外からのCa<sup>2+</sup>を取り込みが見られ、阻害剤として鉛やニフェジピンを添加した場合この取り込みの抑制が認められた。

(2) 視神経を損傷し新規に緑内障マウスモ

デルを作製するため、マウスの眼球後1mm部位の視神経を切子で10秒x5回摘んで圧迫した。損傷マウスの視神経軸索ではNFMおよびMBPの発現が殆ど認められなくなり、逆に圧迫部位以外でGFAPの発現が亢進した。また網膜最内層のRGCの細胞体数が減少した。本損傷により順行性および逆行性にRGCの軸索変性および細胞体の脱落を来し、視覚情報の伝達が障害されるモデルを作製できた。

このモデルマウスの網膜下に分化誘導した網膜神経節前駆細胞を注入したところ、GFPの発現にて移植細胞が生着していること確認した。移植1か月後では、網膜のほぼ全層にGFP陽性細胞が移動していた。GFP陽性細胞は、網膜神経節細胞層においてBrn3およびNFMと、双極細胞層においてPKCと、光受容体層においてopsinとの2重陽性を示し、移植細胞は各々の層を構成する細胞に分化して、視神経損傷により変性した網膜組織構造を再構成していると考えた。移植マウスでは、軸索全長におけるNFM、損傷部におけるGFAP、損傷部より中枢側のMBPの発現が回復しており、移植細胞から網膜神経節細胞が分化し、軸索を伸長して視神経変性を抑制したと考えた。

網膜側より蛍光色素標識コレラ毒素を取り込ませたところ、視神経損傷マウスではその輸送が損傷部で途絶していたが、移植マウスでは視神経軸索での検出のみならず、対側の中脳上丘および外側膝状体への投射が確認された。移植細胞から分化した網膜神経節細胞の軸索伸長により、視神経の順行性軸索輸送が回復されたと考えた。

### 3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)4年目までに作製予定のL1ノックアウトマウスを既に作製し終えたため。

### 4. 今後の研究の推進方策

(1) 網膜神経節前駆細胞を移植したマウスが視力を回復したか、機能的な検討を行う。正常マウス、視神経損傷マウス、および移植マウスにおいて対光反射を調べ、光刺激伝達能の回復の度合いを検討する。観察は術後より3日置き程度に行い、時間経過に伴う変化を視神経損傷マウスと移植マウスで比較する。

(2) 正常マウス、視神経損傷マウス、および移植マウスにおいて網膜電図を測定し、網膜における細胞の興奮過程を解析する。刺激の強度を数段階に変化させ、各々の刺激時に現れる電位変化を、3群のマウスで比較する。

(3) 神経接着分子L1のノックアウトマウスを作製し、この網膜神経節前駆細胞を移植し、

再生した視神経が中脳上丘まで到達したかを検討する。野生型視神経損傷マウスに移植した場合より特異的かつ詳細に、移植細胞のみに由来する軸索伸張を観察できる。

(4) 4年間全ての結果より、網膜神経節前駆細胞による緑内障治療の前臨床研究について、総合的に評価する。

### 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計16件)

① Kayama M, Kurokawa MS, Ueda Y, Ueno H, Kumagai Y, Chiba S, Takada E, Ueno S, Tadokoro M, Suzuki N. Transfection with pax6 gene of mouse embryonic stem cells and subsequent cell cloning induced retinal neuron progenitors, including retinal ganglion cell-like cells, in vitro. *Ophthalmic Res* 43, 79-91. 2010. 査読有。

② Ueno H, Kurokawa MS, Kayama M, Homma R, Kumagai Y, Masuda C, Takada E, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N. Experimental transplantation of corneal epithelium-like cells induced by Pax6 gene transfection of mouse embryonic stem cells. *Cornea* 26, 1220-1227. 2007. 査読有。

③ Kayama M, Kurokawa MS, Ueno H, Suzuki N. Recent advances of corneal regeneration and possible application of embryonic stem (ES) cell derived corneal epithelial cells. *Clinical ophthalmology* 1, 373-382. 2007. 査読有。

[学会発表] (計51件)

① Kayama M, Kurokawa MS, Ueda Y, Ueno H, Kumagai Y, Masuda C, Takada E, Tago R, Ueno S, Suzuki N. Subretinal transplantation of embryonic stem cell derived neuroretinal cells to mice with optic nerve injury. *The Association for Research in vision and Ophthalmology*. Apr-May, 2008. Florida, USA.

② Kayama M, Kurokawa MS, Ueda Y, Ueno H, Kumagai Y, Masuda C, Takada E, Ueno S, Tadokoro M, Suzuki N. Induction of Differentiation Into Retinal Ganglion Cells of Mouse ES Cells by Pax6 Gene Transfection. *The Association for Research in vision and Ophthalmology*. May, 2007. Florida, USA.

[図書] (計1件)

Xiang Y, Kurokawa MS, Kanke M, Takakuwa Y, Kato T. Springer. *Peptidomics*. Chapter 20, 259-271. 2010. 査読有。