

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791263
 研究課題名(和文) Flatmount 法を用いた毛様体・網膜幹細胞からの視細胞再生についての解析
 研究課題名(英文) The analyses of photoreceptor regeneration from cilio-retinal stem cells using flatmount technique.
 研究代表者
 西口 康二 (NISHIGUCHI KOJI)
 名古屋大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：30447825

研究成果の概要：

遺伝性網膜変性マウスと薬剤性の後天性網膜変性モデルを用いて毛様体上皮組織における網膜神経細胞の再生について *in vivo* で検討した。その結果、成体の哺乳類の毛様体は、網膜障害に反応して網膜神経細胞を分化・再生する役割を担っていると考えられた。そのメカニズムをさらに解明することにより、多くの神経細胞を失った重症な網膜変性患者に対する、網膜神経再生治療への新たな道が開かれる潜在性を秘めている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：網膜変性、毛様体上皮、網膜、視細胞、網膜発生

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝性網膜疾患の多くは、進行性の視細胞変性により徐々に視機能が失われていく網膜色素変性症という共通の臨床像を呈する。そのため、臨床情報だけから、100 種類以上ある原因遺伝子の中から、患者の欠損遺伝子を特定するのは非常に困難である。いまだ有効な治療法がない難治性の疾患である。

したがって、網膜色素変性症の治療においては、網膜神経細胞移植などの、遺伝子非特異的手法を模索することがより実用的である。

(2) 毛様体網膜幹細胞は、魚類や両生類の眼においては、複雑な構造・機能を有する網膜神経細胞を再生する役割を、生涯を通じて担っている。一方、近年、哺乳類の網膜最周辺部、毛様体、あるいは毛様体に隣接する虹彩

にも、網膜視細胞へ分化する可能性を持った細胞が存在することが分かってきた。しかし、マウスなどの哺乳類においては、様々な調査・研究にもかかわらず、このような毛様体網膜幹細胞の分布やそれらによる網膜神経の再生は *in vivo* で確認されていない。

2. 研究の目的

(1) マウスの毛様体上皮細胞と網膜神経細胞の発生について、毛様体網膜の flatmount 法を用いて、周辺網膜、毛様体扁平部を組織学的に解析すること。

(2) 網膜変性マウスにおいて、組織形成後あるいは成体の毛様体に網膜神経系の細胞が存在するか明らかにすること。

(3) 組織形成後のマウス眼において、毛様体網膜幹細胞からの網膜神経細胞再生が起こりうるか検討すること。

(4) 成体のマウス眼において、毛様体網膜幹細胞からの網膜神経細胞再生が起こりうるか検討すること。

3. 研究の方法

(1) 生後 3 日齢～120 日齢のマウス毛様体扁平部と周辺網膜を flatmount 法を用いて免疫組織学的に解析した。

(2) BrdU を用いて分裂細胞をラベルし、それらの細胞の空間的、時間的な分布を調べた。また、毛様体扁平部上皮における、網膜神経マーカー（リカバリン、ロドプシン、PNA、PKC α 、シナプトフィジン、緑色錐体オプシンなど）の発現の有無とマーカー陽性細胞の形態を詳細に検討した。

(3) 野生型マウス (C57BL)、遺伝性網膜変性マウス (rd1 マウス)、薬剤性網膜変性マウス (C57BL マウスに MNU を腹腔内投与) を解析対象とした。

4. 研究成果

(1) BrdU 陽性細胞より形成される網膜神経幹細胞の集団である neuroblast layer は毛様体扁平部まで広がっており、同部位は発生学的に網膜と非常に近いと考えられた。

(2) 生後の発生の段階の毛様体上皮には、リカバリン、ロドプシン、PNA 陽性などの網膜神経マーカー陽性であり、網膜神経細胞の形態的特徴も有した細胞が多数存在した。しかし、正常マウスの毛様体においては、組織形成後 (P12 以降) にそれらの細胞はほとんど見られなかった。

(3) 遺伝性の網膜変性症を有する rd1 マウスや MNU による薬剤誘発性の網膜変性マウスの毛様体扁平部では、生後 30 日齢以降の成体においても、膜神経マーカー陽性の細胞が多数存在した。

(4) 毛様体扁平部における網膜神経マーカー陽性細胞の多くは、錐体視細胞系の細胞である一方、杆体視細胞系の細胞は少なかった。これは、杆体視細胞が錐体視細胞よりも多い網膜とは反対の結果であった。

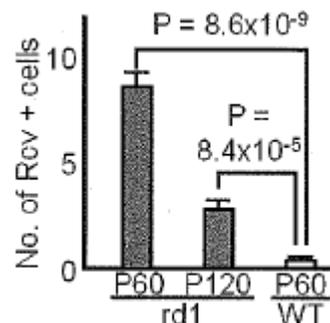


図 1 毛様体扁平部におけるリカバリン陽性細胞の数

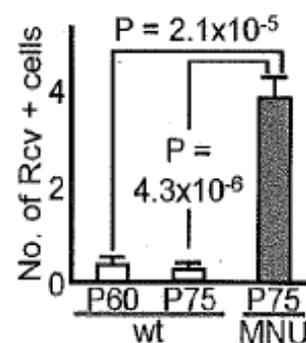


図 2 毛様体扁平部におけるリカバリン陽性細胞の数

(5) rd1 マウスの毛様体扁平部では、組織形成後 (P12 以降) においても分裂細胞から網膜神経細胞への分化が認められた。しかし、30 日齢以降は確認できなかった。したがって、同モデルでは、成体における、網膜神経細胞再生は起こらない可能性があると考えられた。

(6) 生後 30 日齢の成体のマウスに MNU 腹腔内投与により薬剤性の網膜変性を誘発した。これらのマウスに対して MNU 投与 2 日後にさらに BrdU を腹腔内注射し、分裂細胞をラベルした。それらのマウスの毛様体扁平部を生後 37~40 日齢で組織学的に評価した。その結果、生後 32 日齢以降の成体の毛様体扁平部や周辺網膜においても、ごく少量ではあったが、分裂細胞から網膜神経細胞への再生が起こることが認められた。

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 4 件)

すべて査読有り

① Nishiguchi KM, Kaneko H, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H.
Generation of immature retinal neurons from proliferating cells in the pars plana after retinal histogenesis in mice with retinal degeneration.
Mol Vis. 2009;15:187-99. Epub 2009 Jan 23.

② Kaneko H, Nishiguchi KM, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H
Characteristics of Bone Marrow-Derived Microglia in the Normal and Injured Retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 Sep;49(9):4162-8.

③ Kaneko H, Nishiguchi KM, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H
Retardation of Photoreceptor Degeneration in the Detached Retina of rd1 Mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 Feb;49(2):781-7.

④ Nishiguchi KM, Kaneko H, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H

Identification of photoreceptor precursors in the pars plana during ocular development and after retinal injury Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 Jan;49(1):422-8

[学会発表] (計 6 件)

① H20 年 8 月 24 日
Japan Macular Club, 毛様体扁平部と網膜の発生
発表者: 西口康二
発表場所: 愛知県、蒲郡市

② H20 年 5 月 3 日
ARVO 2008, Circulating Bone Marrow Derived Microglia Engraft Into the Injured Retina
発表者: Hiroki Kaneko, Koji M Nishiguchi, Makoto Nakamura, Shu Kachi, Hiroko Terasaki
発表場所: Ft Lauderdale, FL, USA

③ H20 年 5 月 1 日
2008 ARVO, Increased Number and Prolonged Presence of Retinal Precursors in the Pars Plana of rd1 Mice
発表者: Koji M Nishiguchi, Hiroki Kaneko, Makoto Nakamura, Shu Kachi, Hiroko Terasaki
発表場所: Ft Lauderdale, FL, USA

④ H19 年 11 月 24 日
第 46 回日本網膜硝子体学会、骨髄由来細胞のマウス網膜内への生着
発表者: 兼子裕規、西口康二、中村誠、加地秀、寺崎浩子
発表場所: 青森県、青森市

⑤ H19 年 11 月 23 日
第 46 回日本網膜硝子体学会、毛様体上皮細胞の網膜神経細胞への分科と周辺網膜の形成
発表者: 西口康二
発表場所: 青森県、青森市

⑥ H19 年 10 月 13 日
第 61 回日本臨床眼科学会、KCNV2 遺伝子に変異が検出された Cone dystrophy with supernormal rod ERG の一例

発表者：中村誠、安間哲宏、西口康二、伊藤
逸毅、近藤峰生、寺崎浩子
発表場所：京都府、京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西口 康二 (NISHIGUCHI KOJI)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30447825