

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791302

研究課題名 (和文) 変性網膜の骨髄間質細胞移植による組織再生の検討

研究課題名 (英文) Investigation of regeneration of the degenerated retina by the transplantation of bone marrow stromal cells.

研究代表者

高山 徹也 (TAKAYAMA TETSUYA)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70347029

研究成果の概要：

骨髄間質細胞による眼の網膜再生を検討するため、網膜変性モデル動物への細胞移植を行った。結果として移植細胞の損傷組織への定着は確認できたが、組織の再生には至らなかった。次に骨髄移植モデル動物を作製し、眼組織における骨髄由来細胞を調べたところ、角膜・強膜・ぶどう膜・網膜などに広く分布し、その多くはマクロファージやミクログリアである事が判明した。さらに、それらの細胞は角膜や網膜などの各部位において各々異なる特徴的形態を持つ事が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1500000	0	1500000
2008 年度	1100000	330000	1430000
年度			
年度			
年度			
総計	2600000	330000	2930000

研究分野：組織学、眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：骨髄間質細胞、眼組織、網膜変性、再生、移植

## 1. 研究開始当初の背景

視細胞は網膜内で光刺激を感受するように特殊に分化した感覚ニューロンである。網膜色素変性や網膜剥離などの疾患では、視細胞は比較的選択的に損傷され、重篤な視覚障害の原因となっている。他の中枢神経系組織同様、一旦障害された視細胞は生体内で再生されることは無いため、失われた視機能を取り

戻すことは不可能であると考えられてきた。しかし、近年の再生医学研究の進展により、この問題を克服する様々な戦略が練られており、その中でも骨髄細胞が注目されている。

骨髄間質細胞由来の間葉系幹細胞は、骨・軟骨・脂肪・腱・骨格筋といった間葉系組織の前駆細胞を生み出すとの報告や、特定の誘導条件下では心筋や神経細胞にもなりうること

が明らかにされている。さらに、骨髄の自家移植による骨再建や閉塞性血管病変の細胞治療など、すでに多方面での臨床応用も進められている。眼科領域においては臨床応用の段階ではないものの、動物実験モデルにおいては硝子体内へ移植した骨髄細胞が網膜神経細胞へ分化したとの報告もなされている。一方、骨髄間質細胞は損失細胞補填の為の移植源としての有用性のみならず、微小環境に応じて種々のサイトカインや神経栄養因子を生産・分泌し、神経保護効果を示すことも知られている。

網膜・視神経再生の研究は、神経幹細胞、ES細胞、成体および胎児由来の神経・グリア細胞など様々な方面からのアプローチが試みられる中で、最終目標である臨床応用を見据えた場合に倫理面や供給の安定性、さらには免疫拒絶反応や安全性など多くの問題が存在するのも否めない。一方、骨髄細胞は骨髄穿刺で採取が容易であり、旺盛な増殖能を持つので大量培養も容易である。そのため自家移植が可能であり、移植におけるドナー不足の問題や免疫拒絶反応も回避でき、将来の眼科臨床における神経保護・再生医療の核になり得ると考える。骨髄細胞により、網膜神経保護作用が発揮され、さらには脱落した視細胞を補い正しく機能させる事ができれば、多くの中途失明者に再び光をよみがえらせる事が期待される。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の第一のテーマは、骨髄間質細胞の眼球内移植による網膜の再生であり、実験系として網膜の変性・損傷が前提になる。何ら障害の生じていない健常な眼球に対して骨髄間質細胞を移植しても通常は何も変化は生じず、移植細胞の網膜内への移動や網膜構成細胞などへの分化は観察されないと推測される。動物実験においては、RCSラット(遺伝的網膜変性ラット)、光網膜変性モデル、薬物投与による網膜変性モデルなどが再生研究の対象となると考える。

今回は、ヨウ素酸ソーダ( $\text{NaIO}_3$ )の薬剤投与による網膜変性モデルを対象とする。ヨウ素酸ソーダの網膜色素上皮細胞に対する毒性

は古くから知られており、動物に投与すると網膜色素上皮細胞のネクローシス(壊死)が生じ、さらに視細胞のアポトーシス(プログラムされた細胞死)が続発して網膜層構造が破壊される事が報告されている。またヨウ素酸ソーダ投与による網膜変性モデルにおいては、障害された網膜色素上皮細胞が骨髄由来幹細胞の誘引物質として作用するサイトカインを分泌する事も報告されている。

まずはヨウ素酸ソーダ投与による網膜変性ラットモデルを作製し、対象群としての本モデル動物の組織構造評価を行う。さらに同様に作製した網膜変性モデルへGFP(green fluorescence protein)標識のラット骨髄間質細胞を移植する。この骨髄間質細胞移植群の眼組織において、移植細胞が変性網膜組織へ遊走し定着するのか。その移植した骨髄細胞が神経保護効果を示し、網膜変性の抑制効果が認められるか。さらにはその損傷された部位において移植細胞が種々の網膜構成細胞(視細胞・ミュラー細胞・色素上皮細胞など)へと分化し、破壊された網膜層構造が再構築され得るかなどを免疫組織化学的手法を用いた蛍光顕微鏡、電子顕微鏡観察により明らかにする。

(2) 本研究の第二のテーマは、健常な眼組織に分布する骨髄由来細胞の解析である。

再生医療における免疫学的観点から骨髄を捉えた場合に、例えば臓器移植の拒絶反応に関与するとされる様々な骨髄由来の細胞(マクロファージ、樹状細胞、B細胞など)が考えられる。一方で、角膜のような無血管組織やblood-retinal barrierによって全身血流から隔てられた網膜組織などは免疫租界にあるものとされ、他の臓器・組織に比べ免疫反応の起こりにくい部位であると古くから考えられていた。しかしながら、臨床医療において長年の実績のある角膜移植においても移植後の拒絶反応はある一定の頻度で生じる。この機序の1つに骨髄に由来する細胞の関与が想定される。これらの現象に関連した基礎医学的知見を得るためにGFP発現マウスの骨髄細胞移植により骨髄置換を行ったマウスモデルを作製し、眼組織に広く分布すると思われる骨髄由来の細胞の種類を同定するとともに、その詳細な形態学的特徴を

明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) ヨーソ酸ソーダ誘発網膜変性ラットモデルへのGFP標識骨髄間質細胞の移植。

#### ①網膜変性モデルの作製

野生型Sprague-Dawley系ラット(SDラット)に滅菌した3% ヨーソ酸ソーダ溶液(60mg/kg bodyweight)を尾静脈より注射する。2週間後、1ヶ月後、3か月後に4%paraformaldehydeにて灌流固定・眼球摘出し、OCTコンパウンドに包埋する。

②GFP標識骨髄間質細胞の網膜変性モデルへの移植。

GFP遺伝子導入SDラットの大腿骨・脛骨より採取した骨髄細胞を $\alpha$ -MEM培養液(10%牛胎児血清、L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン含有)にて培養する。48時間後に非接着細胞を除去し、引き続き継代培養を行う。培養したGFP標識の骨髄間質細胞を収集し、 $\alpha$ -MEM培養液で希釈した後、ヨーソ酸ソーダ投与3日後のラット尾静脈より投与する。ヨーソ酸ソーダ溶液を投与してから2週間後、1ヶ月後、3か月後に4%paraformaldehydeにて灌流固定・眼球摘出し、OCTコンパウンドに包埋する。

③共焦点レーザー顕微鏡による組織標本の観察。

上記の①および②のOCTコンパウンド包埋試料から凍結切片を作成。Iba1(マクローファージ/ミクログリアのマーカー)、GFAP(Glia 1 Fibrillary Acidic Protein)、RPE65(Retinal Pigment Epithelium 65)、SDF-1 $\alpha$ (anti CXCL12 alpha subunit)等の抗体にて免疫染色を行う。また、細胞核の標識にはDAPI染色を施行する。

④透過型電子顕微鏡による組織標本の観察

上記②と同様にGFP標識骨髄間質細胞の網膜変性モデルへの移植を行い、電子顕微鏡用標本作製のため3.75% Acrolein/2% paraformaldehydeで灌流固定・眼球摘出し、OCTコンパウンドに包埋。凍結切片を作成し、pre-embedding immunoelectron microscopy techniqueにて移植細胞の超微形態の観察を行う。

eにて移植細胞の超微形態の観察を行う。

(2) 正常眼組織における骨髄由来細胞の解析

#### ①骨髄移植マウスモデルの作成

野生型C57BL/6マウスに放射線照射を行い骨髄組織を破壊した上で、GFP遺伝子導入C57BL/6マウスの大腿骨・脛骨より採取した骨髄細胞を静脈内投与し、骨髄移植マウスモデルを作成する。

②蛍光顕微鏡による組織標本の観察。

骨髄移植の4~6か月後に、4%paraformaldehydeにて灌流固定・眼球摘出し、OCTコンパウンドに包埋。凍結切片を作成し、Iba1抗体、CD11c抗体(樹状細胞のマーカー)、GFAP等の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞核の染色にはDAPIを使用する。

③共焦点レーザー顕微鏡による角膜および網膜の全載(whole-mount)標本の観察。

移植骨髄由来細胞の3次元立体的構造の観察のため、骨髄移植の4~6か月後に、4%paraformaldehydeにて灌流固定・眼球摘出し、角膜および網膜の全載標本作製。DAPIによる細胞核染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行う。

④透過型電子顕微鏡による組織標本の観察。

骨髄移植の4~6か月後に、電子顕微鏡用の標本作製のため3.75% Acrolein/2% paraformaldehydeで灌流固定・眼球摘出し、OCTコンパウンドに包埋。凍結切片を作成し、pre-embedding immunoelectron microscopy techniqueにて移植細胞の超微形態の観察を行う。

### 4. 研究成果

(1) ヨーソ酸ソーダ誘発網膜変性モデルへの骨髄間質細胞移植効果の解析。

①網膜変性ラットモデルでは、薬剤投与後より経時的に網膜色素上皮細胞の変性・数の減少、外顆粒細胞層(視細胞の核の位置)の配列の乱れが観察された。また、網膜のグリア細胞であるミュラー細胞の活性化やマクローファージ・ミクログリアなどの網膜外層への浸潤なども観察され、網膜外層を中心とした変性所見が組織学的に確認された。

②GFP 遺伝子導入ラットから採取、培養した骨髄間質細胞を移植した網膜変性ラットモデルの眼組織においては、上記の網膜変性所見に加え、変性した網膜外層を中心とした部位に特異的に移植骨髄間質細胞が分布していた。なお、これらの細胞は網膜以外の眼組織（角膜・ぶどう膜・強膜等）には確認されなかった。これらのことより、移植した骨髄間質細胞は、ヨウ酸ソーダ投与により損傷を受けた網膜外層からの特異的な因子（誘引物質として作用するサイトカイン等）により誘導され定着したものと推測されたが、それらの細胞の網膜構成細胞への分化は免疫組織化学的手法あるいは電子顕微鏡を用いた超微形態学的観察においては確認されなかった。また、コントロール群と骨髄間質細胞移植群との網膜変性像の比較に関しても、組織学的な差異は認められず、移植に伴う明確な網膜変性の抑制効果は確認されなかった。

(2) 正常眼組織における骨髄由来細胞の解析

①今回作製した骨髄移植マウスモデルの骨髄組織の切片を蛍光顕微鏡で観察したところ、ほぼ完全にドナーである GFP 遺伝子導入マウス由来の骨髄細胞により置換されている事が確認された。また、摘出眼球を蛍光実体顕微鏡にて観察したところ、移植骨髄由来の細胞が角膜、強膜、網膜に広く分布している様子が GFP の蛍光として観察された。

②蛍光顕微鏡による眼球組織標本の観察においては、GFP 標識された移植骨髄由来細胞が角膜、強膜、ぶどう膜、網膜の各組織に広く分布している様子が確認された。免疫組織化学的手法により、それらの細胞の多くはマクロファージあるいはミクログリアである事が確認された。

さらに、角膜および網膜の全載標本を共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、それらに分布する骨髄由来細胞の3次元立体構造の観察を行った。角膜上皮に分布する細胞は細長い細胞体からさらに細く分岐を持つ樹状の突起を有していた。一方、角膜実質に分布する細胞は鈍な角を持つ多角形で平坦な細胞形態を呈していた。また、網膜に分布する細胞は、中央の細胞体から3次元的に放射状に樹状の突起を伸ばしている様子が観察された。

このように、眼組織に分布する骨髄由来細胞の多くはマクロファージあるいはミクログリアである事、さらに、それらの細胞が眼組織の各々の部位において個性的・特徴的な形態を呈しつつ存在している事が明らかになった。

③透過型電子顕微鏡による眼球組織標本の観察。

角膜および網膜の電子顕微鏡観察にて、

GFP 陽性の骨髄由来細胞の超微形態を観察した。特に、角膜実質に分布する細胞に関しては、細胞表面に多数の指状突起や細胞質内ライゾームなどを有しマクロファージの特徴を示すものの他に、角膜細胞（角膜における線維芽細胞）と非常に緊密な接触を示し、これらの細胞間における機能的な連絡を示唆するような大変興味深い所見が得られた。

## 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1件）

- ① Tetsuya Takayama, Teruyoshi Kondo, Masatoshi Kobayashi, Keisuke Ohta, Yoshihiro Ishibashi, Takaaki Kanemaru, Hideki Shimazu, Fumihiko Ishikawa, Takahiro Nakamura, Shigeru Kinoshita, Kei-ichiro Nakamura, Characteristic morphology and distribution of bone marrow derived cells in the cornea, The Anatomical Record, 査読有, 292, 2009, 756-763.

〔学会発表〕（計1件）

- ① 高山徹也、角膜に分布する骨髄由来細胞の組織学的観察、第113回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008年3月29日、大分県。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高山 徹也 (TAKAYAMA TETSUYA)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70347029