

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09693

研究課題名(和文) 視細胞変性のオンセットと進展制御に関わる網膜内炎症環境の時空的な解析

研究課題名(英文) Analysis of intra-ocular inflammation during retinal photoreceptor degeneration

研究代表者

渡邊 すみ子 (Watanabe, Sumiko)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：60240735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：網膜内の微少炎症環境の不均一性について検討し、網膜内の炎症像を4次元的に把握することを目標とした。網膜内の局所特異的なタンパク発現を明らかにするために、網膜の特定の領域をレーザーマイクロダイセクションで切り出し、LC-MSで網羅的に同定し、網膜変性の時間軸でのタンパク発現の時空的变化を示した。複数の変性モデルを用いて、同様の検討を行い、同時に感度を上げる技術開発を行い、当初の20倍程度のタンパク質が同定できるようになった。マイクログリアと神経細胞の共培養系では、ライブセル解析システムを用いて細胞貪食を定量的に解析することが可能になり、様々な細胞種、条件下での検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視細胞変性症は、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性症、網膜色素変性症などいずれも発症は加齢と強く関係し、この背景として、眼内での炎症サーキットの活性化が想定されるがその実体と分子機序、さらになぜ視細胞が選択的に変性していくのかは不明である。本研究により、網膜内で不均一な炎症像が観察されることが示され、炎症制御を時間軸とともに、空間的にも捉えて、標的を明確にして行う戦略につながる重要な手掛かりとなった。また、組織の切片を切り出してタンパク質を網羅的に同定する手法は、サンプル調整に高度な機器や技術も不要で汎用性が高いものである。

研究成果の概要(英文)：Inflammation is considered to contribute to the initiation and development of retina. Activation of immune-competent cells such as microglia are reported to be activated in the retinal degenerative diseases such as age-related macular degeneration, retinitis pigmentosa, and glaucoma. We had previously found that mouse microglia expressing v-RAS showed different activation state, suggesting that different micro-environment of inflammation in the retina contributes to differential state of activation of the microglia. Our question in this work is whether heterogeneity of inflammation present in the retina or not. By using frozen sections of the mouse retina and laser-micro dissection machine, we vertically cut out healthy and degenerating retina to 3 parts, and each part was served to proteome analysis. We identified retinal layer-specific protein expression patterns in each layer, and the patterns change with progression of retinal degeneration.

研究分野：網膜発生、疾患分子基盤

キーワード：網膜 マウス 変性 炎症

1. 研究開始当初の背景

我々はストレスと神経細胞の変性の課題に取り組むため中枢神経の優れたモデルである網膜、特に視細胞変性症に焦点をあて研究を展開している。視細胞変性症は、糖尿病性網膜症(DR)、加齢黄斑変性症(AMD)、遺伝性の網膜色素変性症(PR)などがあるが、いずれも発症は加齢と強く関係し、50歳前後で急速に高まり、視細胞の変性が進行し重篤化すると失明に至る。この背景として、眼内での炎症サーキットの活性化が想定されるがその実体と分子機序、さらになぜ視細胞が選択的に変性していくのかは不明である。

視細胞変性に至る網膜内の炎症像の構築の中核をなすと考えられているマイクログリアは網膜内外からの刺激により活性化され炎症性サイトカインの放出、貪食などで神経細胞の変性の進展を修飾すると考えられ、脳ではマイクログリアの活性化の抑制による脳神経変性疾患の治療法の開発が多数行われている。我々は網膜内マイクログリアに着目し、その正常時、活性化時の特異的遺伝子発現パターンを同定し、マクロファージとは明らかに異なる細胞集団であることを世界に先駆けて同定した(Koso et al, *Glia* 2016)。網膜内では、マイクログリアに加え、ミューグリア、アストロサイト、さらに視細胞自身もサイトカインを分泌するなど、複雑な細胞間のやり取りが、病態の進展に伴い変化していくことが想定され、眼内の炎症サーキットがどのように視細胞変性のオンセットと進展にかかわるのか時間軸での遷移の検討が必要である。我々は、マイクログリアの活性化のみ取り出して、これに起因する網膜への影響を検討するために v-Ras をマイクログリア特異的かつ誘導的に発現させてを活性化させるマウス(v-Ras-マイクログリアマウス)を作成した(Moriuchi et al, *IOVS*, 2020)。v-Ras を発現させると、マイクログリアは活性化を起し、増殖し、サイトカインを放出し、網膜全域に移動していく。さらに視細胞が変性を起し脱落していくことが観察され、活性化マイクログリアが視細胞変性の原因になりうることを初めて直接示すことに成功した。

マイクログリアは網膜全体に移動するが、次第に視細胞が局所から脱落していくのに対して、網膜内の他の神経細胞は影響を受けず、すなわち、v-Ras で同様に活性化したマイクログリアは網膜全域に移動するにも関わらず、視細胞のみがダメージを受けるといふ、細胞系列特異性が見出された。このことから、視細胞自身が phagocytosis を受けやすい susceptible な状態であること、あるいは、マイクログリアの網膜内の微小環境により同様のシグナルが活性化されたマイクログリアでもそのフェノタイプは行き着いた網膜内の領域に依存している、という二つの仮説が想定された。

2. 研究の目的

本研究では、眼内炎症の分子機構をマイクログリアを中心軸に据え、視細胞変性のオンセットを引き起こす分子基盤を明らかにするとともに、なぜ視細胞が選択的に変性していくのか明らかにし、その予防や創薬の標的となる制御点の理解につなげようとすることを核心をなす問いとして設定した。

(1) 網膜内の微小な環境がマイクログリアの活性化状態に影響を与えているという仮説を検証する。

(2) 視細胞が特異的に貪食を受けていた理由を PS や eat-me-signal の発現状態について検討する。

(3) 脳では single cell RNA-seq により脳の領域によりマイクログリアの遺伝子発現パターンが異なることが示されている。網膜内でマイクログリアが不均一であるのか、特にサイトカインレセプター、細胞接着/認識、ファゴサイトーシス関連の遺伝子発現に差があるのか、これが変性時にどのように変化するのか、検討を加える。

3. 研究の方法

(1) 一方、eat-, don't-eat-me-signal について、上記のシグナルを増強した免疫染色により、詳細に検討を加え、特に変性の過程において、マイクログリアの挙動と着目する分子の空間的關係について検討を加える。視細胞の中でも領域により差異がある可能性が高く詳細に検討を加える。

(2) サイトカインレセプター、細胞接着/認識、ファゴサイトーシス関連の遺伝子発現に差があるのか、これが変性時にどのように変化するのか、免疫染色による検討に加え、LMD で切り出し

た網膜局所の遺伝子発現パターン、タンパク発現パターンを比較検討する。

(3) マイクログリアと神経細胞の共培養の系を利用し、セルソーターで単離した視細胞、介在神経、神経節細胞をマイクログリア（プライマリー、v-Ras発現、細胞株）と培養しイメージングによりファゴサイトーシスを検討すると同時に、神経細胞の細胞死などの状態を検討する。

4. 研究成果

(1) 正常、変性状態の視細胞を CD73 抗体を用いてセルソーターで単離し、そのほかの神経細胞と eat-, don't-eat-me-signal に関わるとされる遺伝子について、その発現を qPCR で検討したが、想定されるような発現の上昇は観察されなかった。また一部の分子についてはセルソーターを用いてタンパクの発現を検討したが顕著な差は確認されなかった。

(2) サイトカインレセプター、細胞接着 / 認識、ファゴサイトーシス関連の分子について、正常、変性状態の網膜の凍結切片に対して免疫染色を行ったが、いずれも十分なシグナルを得ることができず、網膜局所での発現について確信を持った結果を得ることはできなかった。そこで、網膜内の局所特異的なタンパク発現を明らかにするために、網膜の凍結切片を用いて、特定の領域をレーザーマイクロダイセクション(LMD)で切り出し、LC-MSで網羅的に同定し、網膜変性の時間軸の進展におけるタンパク発現の時空的变化が明らかにすることを目標に系を立ち上げた。正常マウスの網膜に加えて、複数の変性モデルを用いて、切片から切り出したストリップ状のサンプルについて、100枚程度集め、プロテオーム解析を行った。当初は同定タンパク数が少なく、微量タンパクは検出できなかったが、技術開発により感度が上がり、当初の20倍程度のタンパク質が同定できるようになり、種々のサイトカインも同定されている。しかしながら、ミュラーグリアが分泌すると考えられているサイトカインについては微量であるためか検出されず、さらなる技術的な改善を行なっている。

(3) マイクログリアと神経細胞の共培養の系の立ち上げを目指し、セルソーターで単離した視細胞、介在神経、神経節細胞をマイクログリア（プライマリー、v-Ras発現、細胞株）と共培養しイメージングによりファゴサイトーシスを検討する系の立ち上げを試みた。プライマリーのマイクログリアが不安定であること、ラベルをしないと、形態での細胞種の見分けが困難であること、神経細胞が安定して接着する培養皿表面のコーティングの選択が困難であったこと、などにより期待した像が得られず、この系についてはさらなる技術開発が必要であり現在も継続している。一方で、ライブセル解析システム（Incucyte）を用いて細胞貪食を定量的に解析することが可能になり、様々な細胞種、条件下での検討を進めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Iwagawa, T., Fukushima, M., Takeuchi, S., Kawamura, Y., Aihara, Y., Ozawa, M., Ykushiji-Kaminatsui, N., Aihara, M., Koseki, H., Suzuki, Y., Watanabe, S.	4. 巻 28
2. 論文標題 Histone H3K36 demethylase Fbxl11 plays pivotal roles in development of retinal late-born cell types	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 482-495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13028	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 -
1. 著者名 Iwagawa, T., Masumoto, H., Tabuchi, H., Tani, K., Conklin, B. R., Watanabe, S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Evaluation of CRISPR/cas9 exon-skipping vector for choroideremia using human in induced pluripotent stem cell-derived RPE.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Gene Medicine	6. 最初と最後の頁 e3464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jgm.3464	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 Kuribayashi, H., Katahira, M., Aihara, M., Suzuki, Y., Watanabe, S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Loss-of-function approach using the mouse retinal explants showed pivotal roles of Nmnat2 for early and middle stages of retinal development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell,	6. 最初と最後の頁 ar4, 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14537	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 -
1. 著者名 Saita, K., Moriuchi, Y., Iwagawa, T., Aihara, M., Takai, Y., Uchida, K., Watanabe, S.	4. 巻 597
2. 論文標題 roles of CSF2 as a modulator of inflammation during retinal degeneration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 427-436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cyto.2022.155996	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 Deng, X., Iwagawa, T., Fukushima, M., Suzuki, Y., Watanabe, S	4. 巻 62
2. 論文標題 Setd1a Plays Pivotal Roles for the Survival and Proliferation of Retinal Progenitors via Histone Modifications of Uhrf1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IOVS	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.62.6.1	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------