

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 22 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591968

研究課題名（和文）ミュラー細胞の増殖と神経再生を制御する分子的基盤の解明

研究課題名（英文）Study on the mechanisms that regulate the proliferation of Müller glia

研究代表者

藤枝 弘樹（FUJIEDA HIROKI）

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：70280972

研究成果の概要（和文）：ラットおよびマウスの視細胞変性モデルにおけるミュラー細胞の増殖制御について解析を行った。マウスでは全く増殖が見られず、ラットではほぼすべてのミュラー細胞が細胞周期へ進入したが、同時に DNA 損傷と p53 の活性化が起こり、ミュラー細胞の細胞死と細胞数の減少が観察された。すなわち哺乳類網膜ではミュラー細胞の細胞周期進入に伴う DNA 損傷が網膜再生を阻害する要因となっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： We analyzed the proliferative capacity of Müller glia in rodent models of photoreceptor damage. No proliferation was observed in the mouse retina whereas almost all Müller glia reentered the cell cycle in the rat retina; however, rat Müller glia underwent the DNA damage response and p53 activation, leading to cell death. Thus, the DNA damage response in Müller glia may be one of the mechanisms underlying the limited regenerative capacity of the mammalian retina.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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，細胞周期，DNA 損傷，p53，ミュラー細胞

1. 研究開始当初の背景

ミュラー細胞は網膜のグリアであり、網膜の形態と機能の維持に重要な働きをしている。近年、魚類などの下等脊椎動物ではミュラー細胞が網膜幹細胞として機能し、網膜傷害により失われた神経細胞を再生することが報告された。哺乳類においてもミュラー細胞による神経再生が報告されているが、魚類と比較するとその再生能力は極めて乏しい。Wnt、Sonic Hedgehog、EGF 等の増殖促進因子

を投与することにより、哺乳類ミュラー細胞の増殖と神経再生が促進されることも報告されたが、傷害組織を再生するには不十分である。ミュラー細胞が増殖し、神経を再生する分子機構はほとんど不明であり、特に哺乳類においてその再生能力が抑制されている要因についてはこれまで全く研究されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳類網膜の再生が阻害されている要因を明らかにすることにより、ミュラー細胞による網膜再生を賦活化するための基盤的知識を得ることにある。

3. 研究の方法

マウス (C57BL/6) およびラット (Wistar) にアルキル化剤 Methyl nitrourea (MNU) を腹腔内投与し (70 mg/kg BW)、視細胞変性を誘導した。MNU 投与後、1~7 日後に網膜を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定して免疫組織化学に供した。また組織を新鮮凍結して mRNA を抽出し、リアルタイム PCR システム (アプライドバイオシステムズ StepOne Plus) を用いて定量 RT-PCR を行った。

4. 研究成果

(1) 視細胞変性モデルの作製

MNU 投与による視細胞変性の経過を TUNEL 法を用いて検討した。マウス、ラットのいずれにおいても投与 1 日で外顆粒層のほぼ全体が TUNEL 陽性となり、投与 2 日で反応のピークが見られた (図 1)。

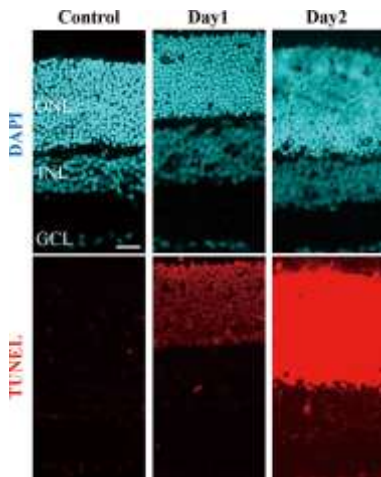


図 1 : MNU 投与後のラット網膜の TUNEL 反応。投与 1 日から視細胞の変性が見られる。ONL, 外顆粒層、INL, 内顆粒層、GCL, 視神経細胞層。スケール 20 μ m。

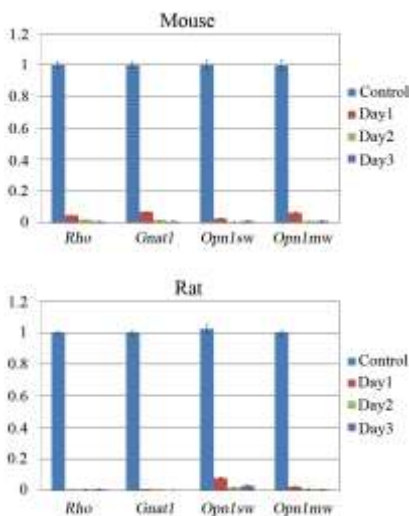


図 2 : MNU 投与後の杆体遺伝子 (Rho, Gnat1) と錐体遺伝子 (Opn1sw, Opn1mw) の発現変化。

また定量 RT-PCR により視細胞特異的遺伝子の発現変化を見たところ、マウス、ラットのいずれにおいても杆体遺伝子、錐体遺伝子の発現が MNU 投与 1 日で著しい減少を示し、2 日にはほとんど消失した (図 2)。したがって、マウス、ラット両種において同様の経過で視細胞変性が起きることが確認できた。

(2) ミュラー細胞の細胞周期進入

ラット網膜の凍結切片を用いて、細胞周期マーカー Ki67、Geminin、ミュラー細胞マーカー Lhx2 に対する 3 重免疫染色を行い、視細胞変性に伴うミュラー細胞の細胞周期進入を検討した。MNU 未投与のコントロール、MNU 投与後 1 日、2 日の網膜では Ki67 や Geminin の反応は見られなかったが、2.5 日目ではほとんどのミュラー細胞が Ki67 および Geminin 陽性となった (図 3)。ほとんどのミュラー細胞は 4 日目まで Ki67 陽性であったが、Geminin の反応は早めに減少し、4 日目にはほぼ陰性となった。

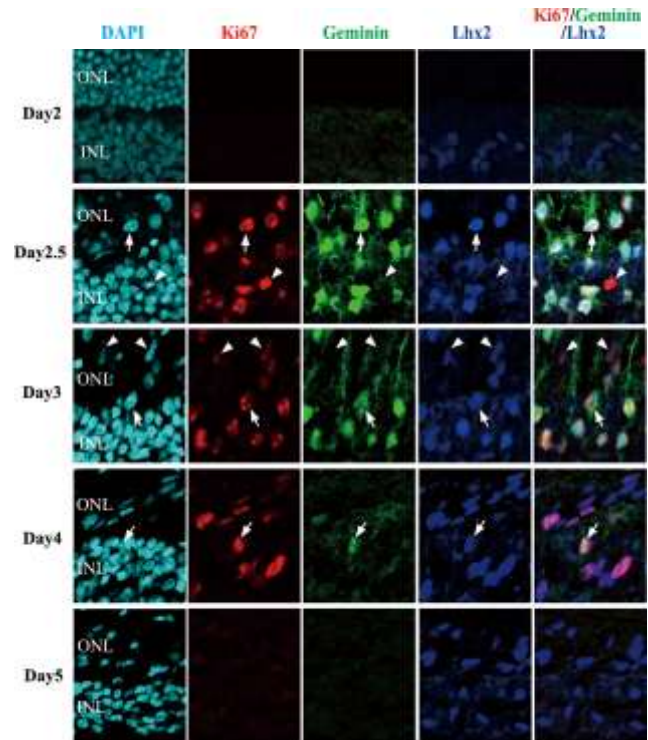


図 3 : MNU 投与後のラット網膜における Ki67 と Geminin の免疫反応。Ki67+/Geminin+/Lhx2+ミュラー細胞 (矢印)。Ki67+/Geminin-/Lhx2+ミュラー細胞 (矢頭)。ONL, 外顆粒層、INL, 内顆粒層。スケール 20 μ m。

ミュラー細胞の細胞周期進入をさらに検証するために、固定の 2 時間前に BrdU を投与して、BrdU (S 期マーカー) の免疫染色をおこなった。Ki67 や Geminin 同様、コントロール、MNU 投与後 1 日、2 日の網膜では BrdU の反応は見られなかったが、2.5 日目でも多数

のミュラー細胞が陽性となった (図4)。陽性細胞数はその後減少し、4日目には全く見られなくなった。

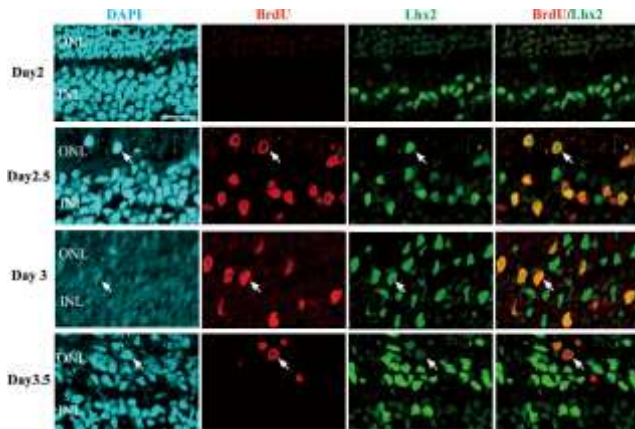


図4. MNU投与後のラット網膜におけるBrdUの免疫反応。矢印はBrdU+/Lhx2+ミュラー細胞。ONL, 外顆粒層、INL, 内顆粒層。スケール20 μ m。

同様に、M期マーカーである phospho-histone H3 (pH3)の免疫染色をおこなうと、MNU投与3日目をピークに陽性細胞が見られたが、多くの陽性細胞はLhx2陰性であったため、同時にS100 β をミュラー細胞マーカーとして用いたところ、pH3陽性細胞はすべてミュラー細胞であることが確認できた (図5)。

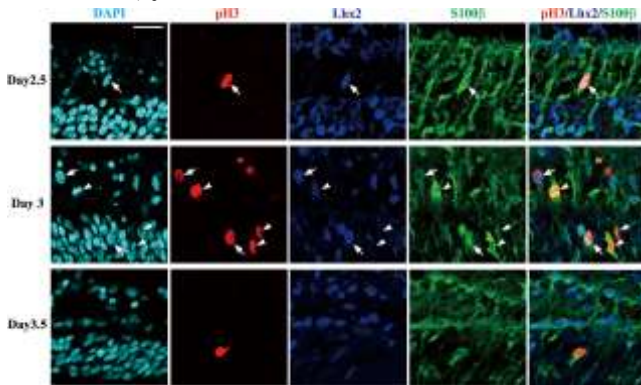


図5. MNU投与後のラット網膜におけるpH3の免疫反応。矢印はpH3+/S100 β +/Lhx2+ミュラー細胞。矢頭はpH3+/S100 β +/Lhx2-ミュラー細胞。スケール20 μ m。

以上の結果より、Geminin、BrdU、pH3の反応はMNU投与2.5日~3.5日に認められ、4日ではほとんどのミュラー細胞は陰性であったが、Ki67の発現は2.5~4日においてほとんどすべてのミュラー細胞に認められた。ミュラー細胞の細胞周期進入の時期についてさらに検討を加えるために、静止期(G0)マーカーであるCDK阻害因子p27の発現を検討した。コントロールおよびMNU投与1日

はすべてのミュラー細胞がp27陽性であったが、2日目には一部のミュラー細胞がp27陰性となり、2.5日にはほとんどすべてのミュラー細胞が陰性となった(図6)。3日目にはp27陽性細胞と陰性細胞の両方が混在したが、4日目にはすべてのミュラー細胞がp27陽性に戻った(図6)。以上より、2~2.5日目にかけてミュラー細胞が細胞周期に入り、3日目には徐々に細胞周期から離脱し、4日目にはほとんどのミュラー細胞が細胞周期から離脱すると考えられた。したがって、Ki67は細胞周期から出た後の細胞にも発現し、細胞周期マーカーとして使用する際には注意が必要であると考えられた。

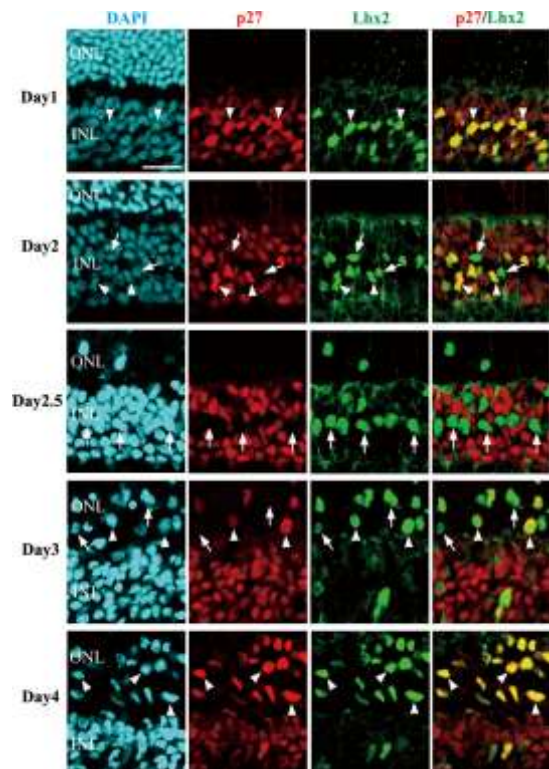


図6. MNU投与後のラット網膜におけるp27の発現。矢印はp27-/Lhx2+ミュラー細胞、矢頭はp27+/Lhx2+ミュラー細胞。ONL, 外顆粒層、INL, 内顆粒層。スケール20 μ m。

次にマウス網膜におけるミュラー細胞の細胞周期進入について検討した結果、MNU投与後も細胞周期マーカー(Ki67、BrdU、pH3)の反応が全く認められなかった。そこで、G1期からS期にかけて細胞周期への進入とその維持に関わる各種Cyclinの発現を定量RT-PCRにより解析した結果、ラット網膜ではCyclinD1、E1、E2、A2のいずれもが発現増加を示したが、マウス網膜で増加したCyclinはD1のみで、S期への進入を示すCyclinE、Aの発現は認められなかった(図7)。したがってラットとは異なり、マウスのミュラー細胞は視細胞変性後も明らかな細胞周期への

進入が確認できなかった。

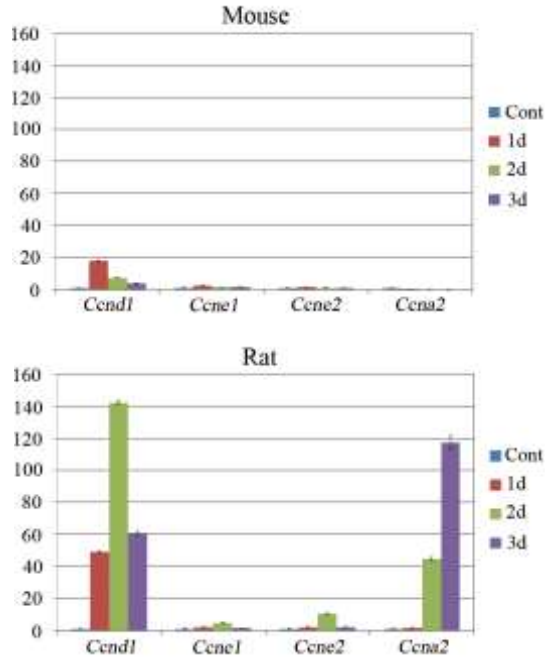


図7：MNU投与後の網膜におけるCyclin mRNAの発現変化。Gapdhを内部標準として相対値を算出し、コントロール（Cont）を1としたFold変化を示した。

(3) ミュラー細胞におけるDNA損傷応答

細胞周期マーカーを発現するミュラー細胞が実際に分裂することを確認するために、MNU投与後のミュラー細胞数の変化を定量化した。その結果、MNU投与後2日間で細胞数が若干減少したが、2日目から4日目にかけて細胞周期への進入と一致して細胞数の有意な増加が見られた(図8)。ところが、4日目から7日目にかけて、ミュラー細胞数の著しい減少が観察された(図8)。

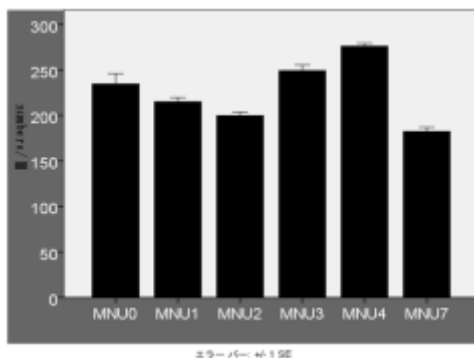


図8：MNU投与後のラット網膜におけるミュラー細胞数の変化。

ミュラー細胞数が減少した理由として、細胞周期進入に伴うDNA損傷が要因となって細胞死を起こすという仮説を立て、DNA損傷マーカーであるphospho-H2AX (pH2AX)の免疫染色を行った。その結果、MNU投与後1~2日

には細胞死を起こす視細胞がpH2AX陽性となったが、ほとんどのミュラー細胞は陰性であった(図9)。ところが、ミュラー細胞がS期に入る2.5日目にはほぼ全てのミュラー細胞がpH2AX陽性となり、その後反応は徐々に減少した(図9)。

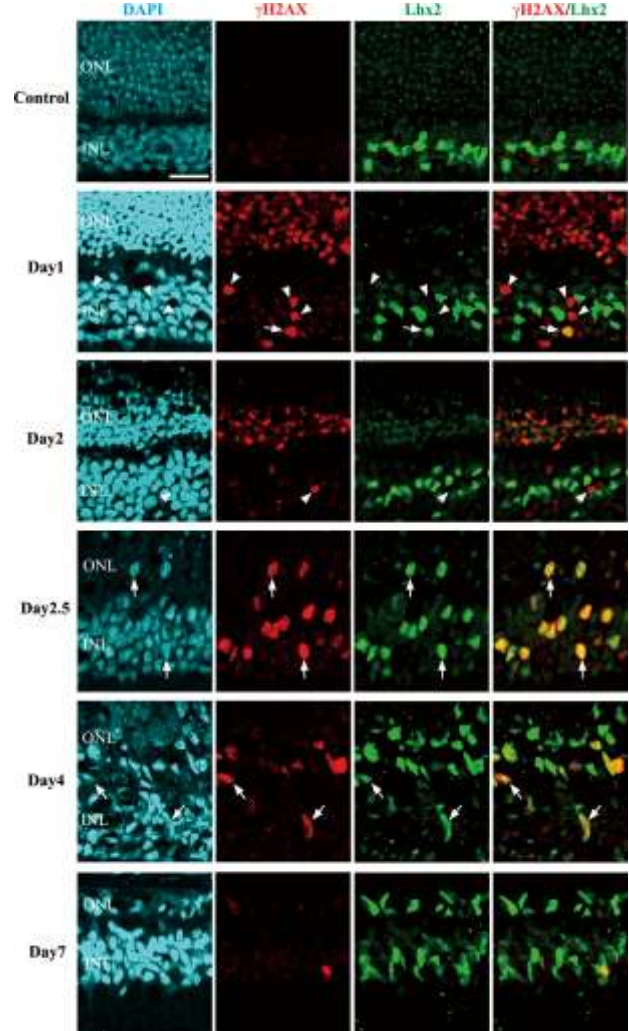


図9：MNU投与後のラット網膜におけるpH2AXの免疫反応。矢印はDNA損傷を示すpH2AX+/Lhx2+ミュラー細胞。pH2AX+/Lhx2-の細胞はミュラー細胞以外でのDNA損傷を示す(矢頭)。ONL, 外顆粒層、INL, 内顆粒層。スケール20μm。

DNA損傷はATM、ATRといったキナーゼを介して腫瘍抑制因子p53を活性化し、細胞周期停止やアポトーシスを誘導することが知られている。そこで、ミュラー細胞におけるp53の活性化の有無を検討した。ATMやATRによるリン酸化を示すPhospho-p53(Ser15)の免疫反応はコントロールやMNU投与1~2日には認められなかったが、2.5日目にはほとんどのミュラー細胞に陽性反応が観察され、その後は減少した(図10)。

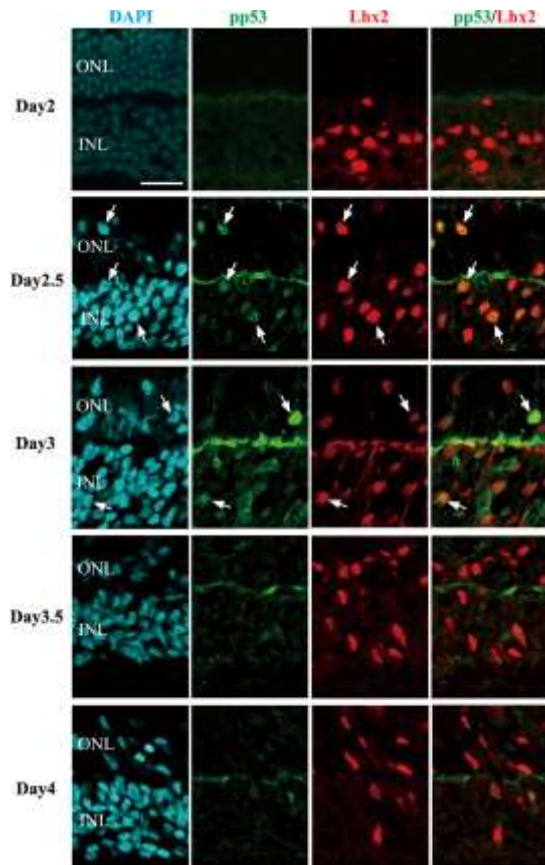


図 10. MNU 投与後のラット網膜における Phospho-p53 (pp53) の免疫反応。矢印は pp53+/Lhx2+ ミュラー細胞。ONL, 外顆粒層、INL, 内顆粒層。スケール 20 μ m。

(4) 結論

以上の所見より、ラットでは視細胞変性後にミュラー細胞が細胞周期へ進入し、それとほぼ同時に DNA 損傷を起こす結果、p53 が活性化し、ミュラー細胞の細胞周期停止および細胞死が誘導されると考えられた。今後 DNA 損傷の抑制あるいは p53 の機能抑制によりミュラー細胞の細胞増殖と生存、さらには視細胞再生が促進されることを示すことにより、「DNA 損傷応答が哺乳類網膜の再生を阻害する」という新たな仮説を検証していきたい。またラットとマウスの比較により明らかになったミュラー細胞の増殖能の種差に関して、今後その分子基盤を解明していきたい。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕 (計 3 件)

①野村かおり、齋藤文典、早川亨、根岸春樹、藤枝弘樹「網膜変性に伴う Müller 細胞の細胞周期進入とアポトーシス」第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013. 3. 29、高松

②齋藤文典、藤枝弘樹「MACS 法を用いたラット網膜からのミュラー細胞の単離」第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013. 3. 29、高松

③野村かおり、佐藤二美、藤枝弘樹「網膜傷害後に Müller 細胞において活性化される細胞内シグナル伝達経路」第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2012. 3. 28、甲府

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤枝 弘樹 (FUJIEDA HIROKI)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：70280972

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐藤哲二 (SATO TETSUJI)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：10162447

船戸弘正 (FUNATO HIROMASA)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号：90363118