

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592610

研究課題名(和文) 傷害網膜に誘導された組織幹細胞の機能発現とその眼内制御機構に関する研究

研究課題名(英文) A study for intraocular molecular mechanism and functional expression of tissue stem cells induced injury to the retina.

研究代表者

福島 美紀子 (Fukushima, Mikiko)

熊本大学・生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：10284770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：網膜組織幹細胞の分化、増殖に関わる分子の探索とその制御機構を網膜傷害モデル動物および眼疾患サンプルを用いて解析した。網膜傷害モデルでは非ステロイド抗炎症薬投与により炎症性サイトカインであるIL-6スーパーファミリーに属するCNTFの発現ならびに移植された神経幹細胞のグリア分化を抑制することができた。眼疾患サンプルを用いた解析では白内障、緑内障、網膜疾患特異的に炎症サイトカイン、細胞増殖因子、アミロイド関連タンパク質の発現上昇が明らかになった。網膜剥離、黄斑上膜疾患を有する硝子体液には網膜色素上皮細胞の分化、形質転換誘導作用があり、smad、NF- $\kappa$ Bのリン酸化シグナルの関与が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study was related to the control mechanism differentiation of retinal tissue stem cells and was analyzed by using a sample eye disease and retinal injury animal model. It was possible to suppress glial differentiation of neural stem cells transplanted as well as the expression of CNTF belonging to the IL-6 superfamily is an inflammatory cytokine by a non-steroidal anti-inflammatory agent administered in the retinal injury animal model. Increased expression inflammatory cytokines, growth factors, of amyloid-related proteins was revealed cataract, glaucoma, and retinal disease in specific in the analysis is using a sample eye disease. In retinal pigment epithelial cell culture analysis, the transformation-induced effect on the vitreous humor with retinal detachment, epiretinal membrane disease, involvement of phosphorylation signal smad, of NF- $\kappa$ B has been revealed.

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：再生医学 細胞・組織 生理活性分子

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症は本邦の失明原因の上位にあり、患者数は増加の一途にある。既に重篤な状態に陥り、機能喪失した網膜疾患に対する有効な治療法は現時点ではない。

(2) 難治網膜疾患に対する新たな治療戦略のひとつとして、幹細胞網膜移植が試みられている。成体眼内に網膜組織幹細胞が発見され、拒絶反応を回避できる移植細胞源として注目されている。

(3) 神経前駆細胞を用いた神経再生治療では、移植細胞が病的組織内で適切にニューロンへ分化しネットワークを形成することが必要である。幹細胞治療の臨床応用に向けた基盤研究として本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

網膜幹細胞の分化増殖能に影響を与える眼内因子の探索を行ない、疾患モデル、傷害網膜での網膜再生に関わる分子メカニズム、細胞間相互作用について明らかにすることで、網膜再生の制御機構を細胞分子レベルで解明する。

3. 研究の方法

(1) 網膜傷害モデルにおける炎症性サイトカインの発現と制御機構

成体ラットにグルタミン酸受容体阻害剤 N メチル D アスパラギン酸硝子体内投与による網膜神経障害モデル、網膜光傷害モデルを作成し、傷害網膜内における IL-6 ファミリーに属する網毛様体由来神経栄養因子(CNTF)、IL-6 受容体構成分子である glycoprotein (gp)-130 の発現についてウェスタンブロット法を用いて経時的に調べた。非ステロイド抗炎症剤 (NSAID) を傷害モデルラット腹腔内に投与し CNTF、gp130、グリア細胞線維性酸性タンパク質 (GFAP) の発現制御効果について検討した。網膜傷害モデルを作製したのち、網膜傷害モデルに胎生 14 日マウス胎仔終脳より精製した神経前駆細胞を移植し、宿主網膜内における移植細胞の分化を免疫組織学的方法で観察した。

(2) 疾患サンプルによる生理活性分子の探索  
白内障、緑内障、硝子体手術時に前房水、硝子体液を採取し、サンプル中の生理活性物質の濃度をマルチプレックスイムノアッセイにより測定した。

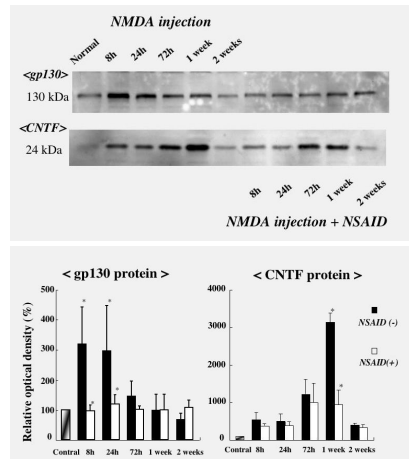
(3) 硝子体液中の生理活性の探索  
培養色素上皮細胞を用いて細胞分化、形質転換への影響を検討した。網膜剥離、黄斑上膜、黄斑円孔の手術時得られた硝子体液をヒト由来網膜色素上皮細胞の培養液に添加し、形質転換に関わるベータ型変異増殖因子(TGF-β)細胞内シグナルの発現についてウェスタンブロット法を用いて検討した。創傷治癒アッセイ (Wound healing assays) に術中硝子体サンプル液を添加し、網膜色素上皮の遊走能への影響をみた。

4. 研究成果

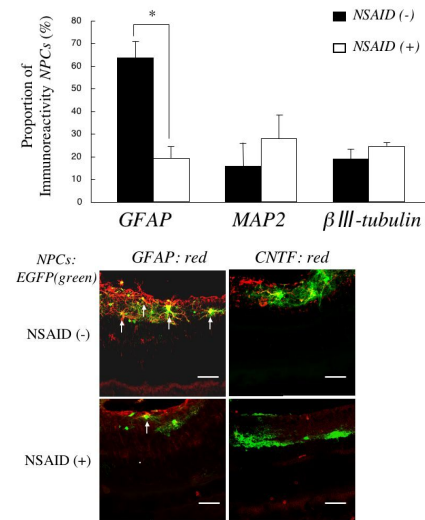
(1) 網膜傷害モデルにおける炎症性サイト

カインの発現と制御機構

gp130 の発現上昇は傷害 8 時間、24 時間後に認められ、傷害後 1 週間まで有意に増加していた。NSAID の投与によりその発現は有意に抑制された。CNTF の発現は傷害後 1 週間後に上昇するものの、NSAID の投与によりその発現は有意に抑制された。

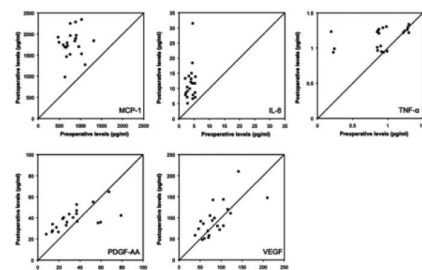


移植網膜においても NSAID 投与により網膜内のグリア細胞線維性酸性タンパク質 (GFAP)、CNTF の発現が減少した。さらに移植幹細胞のグリアへの分化が抑制された。



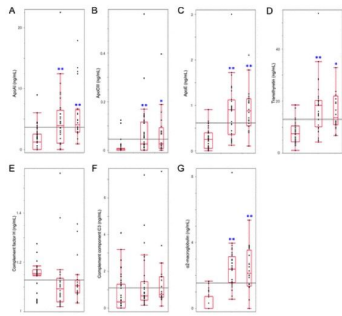
(2) 疾患サンプルを用いた生理活性分子の探索

白内障術前後の前房水サンプルにおいて炎症関連の生理活性物質 MCP-1、IL-8、TNF、VEGF、PDGF-AA のうち、MCP-1、IL-6 の有意な発現上昇が認められた。

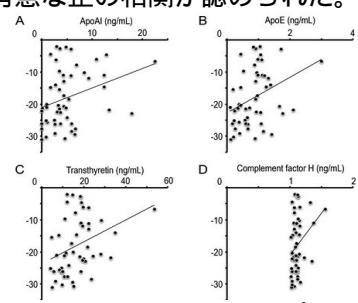


緑内障手術において前房内の MPC-1 濃度と術後の眼圧コントロール成績に相関があることが示唆された。

緑内障の前房水サンプルでは原発隅角緑内障においてアルツハイマー関連分子アポリポロタン(Apo)AI、ApoCIII、ApoE、トランスサイレチン(TTR)、補体H因子、補体第3成分、2マクログロブリン(2M)のうち、Apo AI、ApoCIII、ApoE、TTR、2Mの濃度が白内障と比較して有意に濃度が高かった。

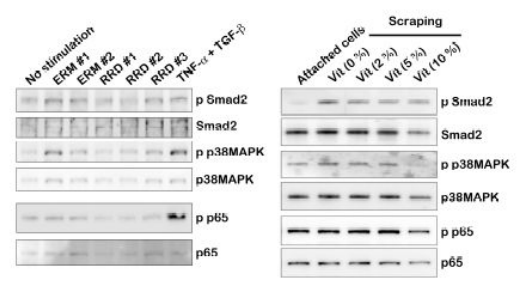


さらに原発開放隅角緑内障において視野障害の程度と前房内 ApoAI、ApoE、TTR、CFH 濃度に有意な正の相関が認められた。

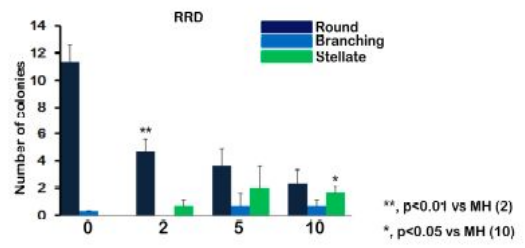
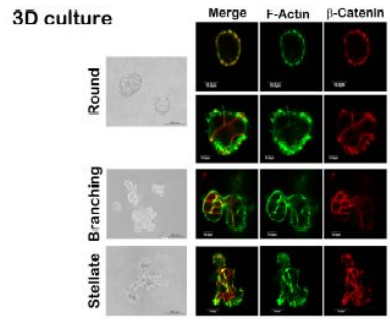


糖尿病網膜症手術硝子体サンプル、増殖組織切片においてアンジオポイエチン様タンパク質(Angptl)2の発現が認められた。

(3)硝子体液中の生理活性の探索  
培養ヒト網膜色素上皮細胞に網膜剥離、黄斑上膜、黄斑円孔手術中に得られた硝子体サンプルを添加培養し、TGF-β細胞内シグナルの発現変化をみたところ、黄斑上膜においてp38MAPKの上昇が認められた。擦過刺激を加えると硝子体サンプル濃度依存性にsmad2リン酸化の発現上昇を認めた。



網膜剥離、黄斑上膜の硝子体液添加により擦過刺激によるp38MAPK、NF-κBの活性化が認められた。網膜色素上皮細胞を3次元培養し、その形態変化を観察したところ、網膜剥離由来の硝子体液添加により浸潤形態への分化誘導が認められた。



疾患眼内には炎症性サイトカインのみならず細胞の機能、分化に影響を与える様々な生理活性物質の存在が示唆され、移植再生治療において細胞分化、機能発現に影響する分子メカニズムの解明、制御機構の開発が必要であると考えられた。

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 9件)

Takahashi E, Inoue T, Fujimoto T, Kojima S, Tanihara H. Epithelial mesenchymal transition-like phenomenon in trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res.* 118:72-9.2014. 査読有

Goto A, Inatani M, Inoue T, Awai-Kasaoka N, Takihara Y, Ito Y, Fukushima M, Tanihara H. Frequency and risk factors for neovascular glaucoma after vitrectomy in eyes with proliferative diabetic retinopathy. *J Glaucoma.* 22:572-6. 2013. 査読有

Inoue T, Kawaji T, Tanihara H. Monocyte chemotactic protein-1 level in the aqueous humor as a prognostic factor for the outcome of trabeculectomy. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2013. doi: 10.1111/ceo.12204. [Epub ahead of print] 査読有

Inoue T, Kawaji T, Tanihara H. Elevated levels of multiple biomarkers of Alzheimer's disease in the aqueous humor of eyes with open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54:5353-8. 2013.

査読有

Kawai M, Inoue T, Inatani M, Tsuboi N, Shobayashi K, Matsukawa A, Yoshida A, Tanihara H. Elevated levels of monocyte chemoattractant protein-1 in the aqueous humor after phacoemulsification. Invest Ophthalmol Vis Sci. 53:7951-60. 2013.

査読有

Tsuboi N, Inoue T, Kawai M, Inoue-Mochita M, Fujimoto T, Awai-Kasaoka N, Yoshida A, Tanihara H. The effect of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 on aqueous humor outflow facility. Invest Ophthalmol Vis Sci. 53:6702-7. 2012. 査読有

Inoue T, Kawaji T, Inatani M, Kameda T, Yoshimura N, Tanihara H. Simultaneous increases in multiple proinflammatory cytokines in the aqueous humor in pseudophakic glaucomatous eyes. J Cataract Refract Surg. 38:1389-97. 2012. 査読有

Takahara Y, Inatani M, Seto T, Iwao K, Iwao M, Inoue T, Kasaoka N, Murakami A, Futa R, Tanihara H. Trabeculectomy with mitomycin for open-angle glaucoma in phakic vs pseudophakic eyes after phacoemulsification. Arch Ophthalmol. 129:152-7. 2011. 査読有

Takahara Y, Inatani M, Hayashi H, Adachi N, Iwao K, Inoue T, Iwao M, Tanihara H. Dynamic imaging of axonal transport in living retinal ganglion cells in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci. 52:3039-45. 2011. 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

Takahashi E, Kawaji T, Ito Y, Tanihara H. Epithelial Mesenchymal Transition and Human Vitreous Samples in 2D and 3D culture of ARPE-19 Cells. The association for Research in Vision and Ophthalmology 2013 Annual Meeting, 2013.5.5. シアトル、ワシントン、米国

Ito Y, Oike Y, Tanihara H. Angpt12 Knockout Mice Suppress Inflammation in Retinal Vessel Induced by High-Fat Diet. The association for Research in Vision and Ophthalmology 2012 Annual Meeting, 2012.5.8. フォートローダーデイル、フロリダ、米国

Ito Y, Nakao S, Zandi S, Tanihara H. Adiponectin Suppresses Adherent Leukocytes in Retinal Vessels Induced by High-Fat Diet. The association for Research in Vision and Ophthalmology 2011 Annual Meeting, 2011.5.3. フォートローダーデイル、フロリダ、米国

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 美紀子 (FUKUSHIMA MIKIKO)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

授

研究者番号：10284770

(2) 研究分担者

伊藤 康裕 (ITO YASUHIRO)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：70380996

井上 俊洋 (INOUE TOSHIHIRO)  
熊本大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：00317025

高橋 枝里 (TAKAHASHI ERI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号：60622602

行徳 雄二 (GYOUTOKU YUJI)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：10420639

(平成 23 年度)

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：