

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659759

研究課題名(和文) 網膜梗塞部位におけるミュラー細胞を利用した網膜神経の再生研究

研究課題名(英文) Regeneration of retinal neuron using Muller cells in the infarction area

研究代表者

村田 敏規 (MURATA, Toshinori)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：50253406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：網膜の梗塞巣を再現するために2つのモデルを用いた。1) 網膜レーザー凝固による網膜凝固壊死巣。2) Kimba マウスのvascular endothelial growth factor 過剰産生による、無灌流領域の形成。in vivoでの観察のために、マウス眼で光干渉断層計による網膜の浮腫や壊死の観察。蛍光眼底造影による無灌流領域の観察を可能とした。

免疫組織学的に、Pax6とnestinと、グリア細胞のマーカーであるglial fibrillary acidic protein (GFAP)の局在が一致する部位を探した。現在まで、再現性を持って局在が一致する条件を確立するに至っていない。

研究成果の概要(英文)：To make infarction in the retina, we used two models.1) laser induced necrotic area. 2) Kimba mice, transgenic mice that overexpress vascular endothelial growth factor in the retina. We developed a method to detect these infarcted area with optical coherence tomography or fluorescein angiography. We attempted to establish a method to induce expression of neuroblastic markers such as Pax6 and nestin in regenerative Muller cells in the retinal infarction. The definite protocol has to be pursued in the further studies.

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 梗塞 前駆細胞 ミュラー細胞 糖尿病網膜症

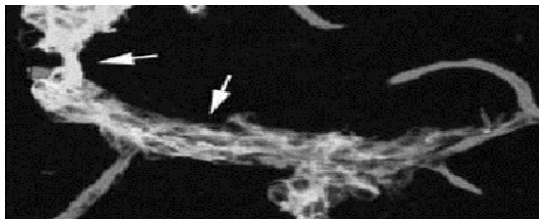
1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は現在でも勤労世代の失明原因の首位を占める。糖尿病患者が急増している今日、糖尿病網膜症による失明、あるいは日常生活に支障をきたすような視力の低下を防ぐ治療法を開発することは急務である。患者は網膜血管の閉塞とこれに伴う網膜神経細胞の壊死により視力を失う。このような患者に視力を回復させるには、閉塞した網膜血管の再疎通と、壊死した網膜神経線維の再生が必要となる。現在我々は網膜血管の再生の研究を行っているが、これと同時に網膜神経細胞の再生も実現すれば、失明した患者の視力の回復が得られ、社会復帰が可能となる。

従来の研究で以下の2つのことが報告されていたことに我々は注目した。

(1) 網膜固有のグリア細胞であるミュラー細胞は、神経前駆細胞としての機能をもち、glial fibrillary acidic protein (GFAP)陽性である。J Neurosci. 2007 Jun 27;27(26):7028-7040
Invest Ophthalmol Vis Sci 2010; 51(11):5991-6000

(2) マウス脳梗塞モデルで、GFAP陽性のグリア細胞が神経前駆細胞として働き、鎖状構造をつくりながら血管に沿って梗塞巣に移動して、シナプスを持つ成熟したニューロンに分化する。J Neurosci. 2006 Jun 14; 26(24):6627-6636



上図は上記文献から引用した図であるが、神経前駆細胞(矢印)が血管(線状の構造)に沿って、脳室下帯から脳梗塞部位に移動している。このように、神経前駆細胞を血管新生にそって遊走させることができれば、網膜の梗塞巣においても、機能の回復に繋がる可能性がある。研究代表者と連携研究者は眼科臨床的には糖尿病網膜症を専門としている。血流がなくなった、黄斑の血流と神経を再生させれば視力回復は得られると考え、研究をすすめる。ミュラー細胞を神経前駆細胞として、網膜神経細胞への分化を示す所見を明らかとし、さらにこれを誘導できることを目指す。

グリア細胞であるミュラー細胞は障害が進んだ網膜でも必ず生存している。このミュラー細胞から神経細胞を誘導分化させることができれば、糖尿病網膜症だけでなく、網膜の神経細胞が障害されるすべての疾患に対して、視力回復の可能性をひらく研究である。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、網膜の神経前駆細胞と考えられているミュラー細胞を使い、網膜の神経細胞とそのネットワークを再生させることである。これは上述のように糖尿病網膜症における無灌流領域において、血流と壊死した神経線維を再生させ、ネットワークを構築する可能性を秘めている。

最終目標に対して、このような研究は前例がないため、まず研究手技を確立されることに、力点を置いた。以下のようなメソッドロジーの確立が目標とされた。

マウスで、再現性を持って網膜の無灌流領域を形成する動物モデルを作成、もしくは見つけて購入する。

そのマウスの網膜無灌流領域を再現性を持って造影で描出できる手技を開発する。

マウスの網膜の、optical coherence tomography (OCT)で、網膜の菲薄化を検出して、壊死、梗塞巣のおおよその位地を同定でき、経時的に観察できるようにする。

網膜の梗塞巣を作ることができれば、同部位で神経幹細胞、前駆細胞のマーカーが発現されているか否かを免疫組織化学等で検討する。

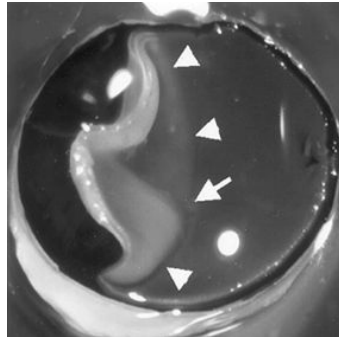
3. 研究の方法

網膜外層の虚血による変成および壊死巣を作る上では、網膜剥離モデルと、網膜光凝固モデルを使用する。

4. 研究成果

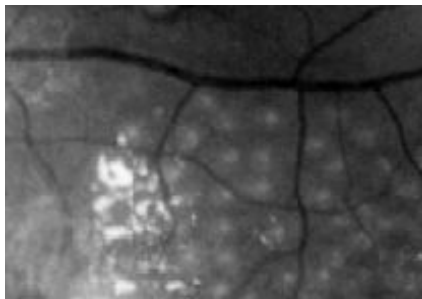
1. マウスで再現性を持って網膜の無灌流領域を形成する動物モデルを作成、もしくは見つけて購入するに関しては、以下のa-cの3通りのモデルが考案された。それぞれ、網膜の内層および外層に網膜の変性梗塞巣を作成して、これをMuller細胞が修復して行く過程を確認できるモデルである。

(1) 網膜外層の虚血による変成および壊死巣を作る上では、網膜剥離モデルを作成した。

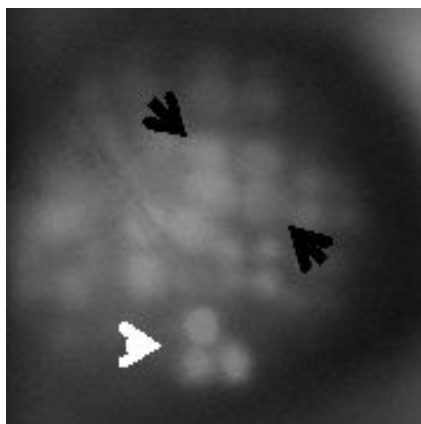


(2) 網膜外層の細胞変成を作る上では、網膜光凝固モデルを作成した。

下図は日と網膜における光凝固の図であるが、レーザーのエネルギーを、網膜色素上皮で吸収させ、網膜外層に凝固壊死を誘導する。白く規則正しく並ぶ点が一つつのレーザー凝固斑である。



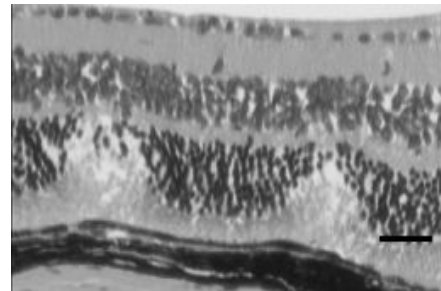
人間における日常診療に使うのと同様な、レーザー凝固斑をマウスに行う事は、従来困難な手技であった。我々は短時間に複数の凝固斑を作成可能なパターンスキャンレーザーであれば、マウスでも人と同じようにレーザーができるのではないかと考えた。



上図はマウスにおいて、パターンスキャンレーザーをもちいて、汎網膜光凝固を施行した時の、ビデオから落とした画像である。汎

網膜光凝固はパターンスキャンレーザーが望ましいが、研究用のレーザーには、レーザー装置は通常の外來で使わなくなった古い機械でも、十分パワーを得ることができ、レーザー用コンタクトレンズの代わりに、カバーガラスで角膜を圧迫して平らにすることで、眼底観察が可能であった。

組織学的に観察すると、下図のように網膜の外層（視細胞層）に変成をつくり、その核である外顆粒層が選択的に失われている。これらの変性巣はグリア細胞の突起が伸展してこれを埋めることが期待される。



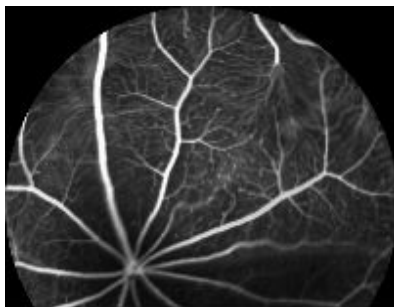
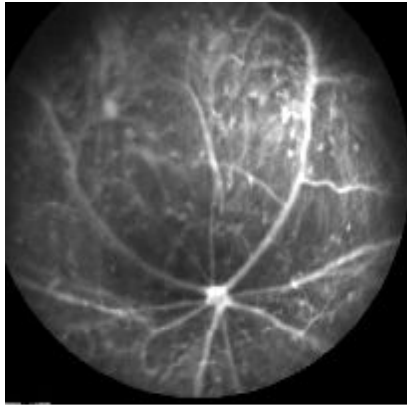
マウス網膜のレーザー凝固巣の組織像。ヘマトキシリンエオジン染色 bar=50 μ m

組織学的に、外顆粒層から視細胞層にかかる変性がみられる。このような、網膜の変性部位は、Muller 細胞により置換されるが、この Muller 細胞に神経前駆細胞としてのポテンシャルがあるので、神経細胞の再生の可能性が期待される。

(3) マウスの網膜無灌流領域を再現性を持って造影で描出できる手技を開発する。ローズベンガルを用いた光障害による網膜血管の閉塞。Photodynamic therapy 的手法を用いた、網膜血管の閉塞などにより、網膜の内層の虚血、梗塞を試みたが、最終的に網膜内で vascular endothelial growth factor (VEGF) が過剰発現される Kimba マウスにおいて、網膜の無灌流領域を作成できることが確認できた。

従来、Kimba マウスに糖尿病マウスである Akita マウスを交配した Akimba マウスが増殖糖尿病網膜症の観察に有用とされていたが、増殖性変化が激しく、Kimba マウスの方が本研究には適していることが明らかとなった。

2. マウスの網膜無灌流領域を再現性を持って造影で描出できる手技を開発する。



マウスの角膜水晶体は、人間のそれよりも屈折力が強く、通常の人間用の眼底カメラでは観察することができない。一方、マウス用の造影カメラ、OCTはそれだけで800万円程度支出を余儀なくされる。我々は、マウス用コンタクトレンズを購入しさらに、ワイドフィールドレンズをアタッチメントとして使用することで、マウスの蛍光眼底造影を、再現性を持って確実に撮影をすることが可能となった。

これにより、検眼鏡での眼底の観察や、眼底写真撮影では観察できない、細かな網膜血管の障害、変化を、検出することができるようになった。

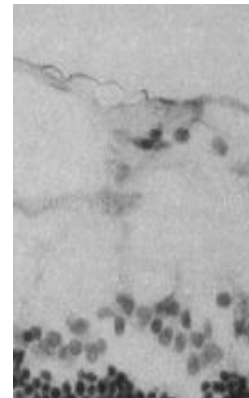
3. マウスの網膜のOCT像で、網膜の菲薄化を検出して、壊死、梗塞巣のおおよその一を同定でき、経時的に観察できるようにする。

OCT像も、マウスの眼球の小ささに伴う、角膜水晶体の高屈折力により、マウス専用の

OCT機械が必要であった。我々は、これもマウス用のコンタクトレンズと、マウス用のアタッチメントを、臨床で使用しなくなった古いOCTマシンに装着して、マウスのOCTを撮影できるようになった。この機械を用いて、Kimbaマウスを撮影できれば、増殖組織の断層像にあわせて、網膜浮腫の断層像が描出できることが期待される。病態解明、新しい治療法の開発に有力な武器となる。



4. 網膜の梗塞巣を作ることができれば、同部位で神経幹細胞、前駆細胞のマーカーが発現されているか否かを免疫組織化学等で検討する。



網膜におけるミューラー細胞はGFAP陽性であり、正常の網膜では網膜表層にその陽性反応はとどまるが、虚血網膜では網膜深層にまで、その胞体そして伸展した突起が陽性に染色される。これは網膜全層を縦断するように貫き、かつ横方向にも突起を伸ばしているもので、これらの突起にPax6やnestinが陽性になるマウスを現在探している。現在の所、まだ陽性細胞を同定することができていない。研究手技は確立したので、引き続き新しい研究テーマを申請して、研究を続けていきたい。

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) [雑誌論文] (計 1 件)

1) Hirano T, Iesato Y, Imai A, Toriyama Y, Kikushima W, Murata T Effect of Laser Wavelength on Delivering Appropriate Laser Burns through the Opaque Lens Using a Pattern Scan Laser. Ophthalmic Res. 2014;51(4):204-209

[学会発表] (計 1 件)

1) Takao Hirano, Takuma Hayashi, Toshinori Murata Rag1 expression in RGCs is involved in programmed cell death ARVO 2013 Annual Meeting, Seattle, USA 2013 年 5 月 9 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

村田 敏規 (MURATA, Toshinori)

信州大学・医学部・教授

研究者番号 : 50253406

(3) 連携研究者

千葉 大 (CHIBA, Dai)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 70467158