

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791840

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた網膜変性モデルの作製

研究課題名(英文) Generation of a new mouse model of inducible rod photoreceptor degeneration

研究代表者

高祖 秀登 (Koso, Hideto)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：50612876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性や加齢黄斑変性では視細胞が進行性に变性し、いまだ根治療法は存在しない。近年、哺乳類網膜で傷害時にグリア細胞が神経細胞を再生することが示された。このようなグリア細胞の再生能をいかした治療を開発するには、培養下で薬剤をスクリーニングできる系の開発が必須である。本研究では遺伝子改変マウスを用いて、組み換え依存的に視細胞の傷害を誘導できるモデルマウスを作成した。網膜体外培養を行ったところ、培養下でも視細胞の傷害とグリア細胞の活性化を誘導できた。培養下で刺激依存的に網膜変性とグリアの活性化を誘導できる系は例がなく、グリア細胞の再生能を誘導する薬剤を探索する上で有用なツールとして期待される。

研究成果の概要(英文)：Retinitis pigmentosa and macular degeneration are characterized by progressive degeneration of photoreceptor cells. There are still no effective treatments to cure these diseases. Recent studies have shown that Muller glia, the most abundant glia in the retina, de-differentiate upon injury, and regenerate neurons. To identify drugs that promote the regenerative potential of Muller glia, it is essential to establish an in vitro model of photoreceptor degeneration. By using genetically engineered mice, I generated a new mouse model of photoreceptor degeneration. Retinal explant culture experiments showed that photoreceptor degeneration and Muller glial activation could be induced by tamoxifen-dependent recombination in vitro. To my knowledge, this is the first in vitro model of photoreceptor degeneration and Muller glial activation that can be induced in a temporally controlled manner. This model facilitates the discovery of drugs that promote the regenerative potential of Muller glia.

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 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

日本における視覚障害者の総数は 30 万人を超える。その約 25% を占めるのが網膜色素変性や加齢黄斑変性といった、視細胞が変性する疾患である。一度変性した視細胞は再生しないため、根治療法はいまだ存在しない。近年、哺乳類網膜において、傷害時にグリア細胞が脱分化して神経細胞を生み出すことが分かって来た。このようなグリア細胞の再生能を利用すれば、傷害された視細胞を再び作り出せる可能性がある。しかし、哺乳類網膜において、傷害時にグリア細胞が環境から受け取るシグナルや、脱分化応答を制御する分子機構についてはほとんど分かっていない。

## 2. 研究の目的

視細胞傷害時のグリア細胞の応答を研究するためには、急性に視細胞の傷害を引き起こす必要がある。そのようなマウスモデルとして、薬剤投与や光傷害が知られている。これらの方法は *in vivo* において有効性が示されているが、グリア細胞の応答を制御するような薬剤をスクリーニングするには、*in vivo* モデルは drug delivery の観点から非効率的である。網膜再生を促進するような薬剤を探索するためには、*in vitro* で視細胞の傷害を誘導し、グリア細胞の応答を解析できるような系の確立が必須である。そこで本研究では、遺伝子改変マウスを用いることで、タモキシフェン投与依存的に視細胞の傷害を誘導できるモデルを作成し、網膜体外培養により、*in vitro* でもグリア細胞の応答を再現することを目的とした。

## 3. 研究の方法

RNA 結合タンパク Msi1 は、杆体視細胞に発

現することが知られている。そこで、この Msi1 遺伝子に着目し、Msi1 遺伝子座に誘導型 Cre 組換え酵素 (CreERT2) をノックインしたマウス (Msi1-CreERT2) を作製する。そして、組換え依存的にジフテリア毒素フラグメント A (DTA) が発現するようなマウス (R26R-DTA, The Jackson Laboratory) と掛け合わせ、Msi1-CreERT2 ; R26R-DTA マウス (DTA マウス) を作成する。この DTA マウスにタモキシフェンを投与することで、組換え依存的に杆体視細胞で DTA の発現を誘導し、細胞死を誘導することができる。この組換えマウスから網膜を摘出して体外培養し、*in vitro* でタモキシフェンを投与することで、*in vitro* でも視細胞の変性を誘導することができると考えた。

## 4. 研究成果

Msi1 遺伝子座のエクソン 1 番目の開始コドン以降を CreERT2 に置き換えるターゲティングベクターを作成した。ES 細胞にインジェクションし、正しく組み替えが起こった ES クローンをサザンブロッティングで選択した。初期胚へインジェクションしてキメラマウスを作製し、C57BL/6 マウスとの戻し交配により、生殖系列へ移行した系統を得た。次に、Cre による組換え依存的に LacZ、または YFP を発現するマウスを交配し、タモキシフェンを投与して、Msi1 の発現組織で組み替えが起こることを確認した (Takeda et al., 2013)。こうして作製した Msi1-CreERT2 マウスを、The Jackson Laboratory から購入した R26R-DTA マウスと掛け合わせて、Msi1-CreERT2 ; R26R-DTA マウス (DTA マウス) を作成した。DTA マウスにタモキシフェンを投与したところ、投与 1 ヶ月後には組織学的に杆体視細胞の変性が確認された。そして、網膜電図でも一致する所見が得られた。詳細な組織解析から、投与 1 週間後には、ミ

ユラーグリア細胞がリアクティブな変化を示し、また活性化したミクログリアが網膜下腔へと移動することが分かった。これらから、DTA マウスモデルは、タモキシフェン投与依存的に視細胞の変性を誘導できる、新規の視細胞変性モデルであることが示された。次に、DTA マウスの網膜を摘出して体外培養し、in vitro でタモキシフェンを投与したところ、1週間後に in vitro でもミューグリア細胞のリアクティブな変化とミクログリアの活性化を認めた。ミクログリアは、変性視細胞の方へと移動し、さらにミューグリア細胞は増殖を再開したことから、増殖能をもつ未分化な状態へと脱分化したと考えられた。以上より、タモキシフェン投与依存的に ミューグリアとミクログリアの活性化を誘導できる培養系を確立できた。In vitro で刺激依存的にグリア細胞の活性化を誘導できるような系の報告はこれまでになく、この系を用いることで、今後グリア細胞の脱分化や再生を促進するような薬剤やサイトカインなどをスクリーニングしていくことが可能となった。

#### 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 3 件)

Razak SR, Ueno K, Takayama N, Nariai N, Nagasaki M, Saito R, Koso H, Lai CY, Murakami M, Tsuji K, Michiue T, Nakauchi H, Otsu M, Watanabe S. Profiling of microRNA in human and mouse ES and iPS cells reveals overlapping but distinct microRNA expression patterns. PLoS One 8 (9); e73532. 2013  
DOI: 10.1371/journal.pone.0073532

\*Takeda H, \*Koso H, Tessarollo L,

Copeland NG, Jenkins NA. Musashi-CreERT2: A new cre line for conditional mutagenesis in neural stem cells. Genesis 51 (2), 128-34. 2013 \*Equal contribution

DOI: 10.1002/dvg.22357

Koso H, Takeda H, Yew CC, Ward JM, Nariai N, Ueno K, Nagasaki M, Watanabe S, Rust AG, Adams DJ, Copeland NG and Jenkins NA. Transposon mutagenesis identifies genes that transform neural stem cells into glioma-initiating cells. Proc Natl Acad Sci USA 109 (44), E2998-3007. 2012

DOI: 10.1073/pnas.1215899109

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/moldev/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

高祖 秀登 (KOSO HIDETO)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：50612876

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：