

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861612

研究課題名(和文)シナプスの保護における分子基盤の探求

研究課題名(英文) Analysis of spatial distribution of synapses and morphology of the retinal ganglion cells.

研究代表者

森藤 暁 (Moritoh, Satoru)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助手

研究者番号：20647234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：当初は、げっ歯類の緑内障モデルでシナプス分布の解析を予定していたが、うまくいかなかった。そこで、研究計画を一部変更し、医学研究に重要だが他の実験動物より研究が進んでいないブタを用いて、網膜神経節細胞の形態分類とシナプス分布の解析を行なった。ブタの網膜培養法と遺伝子銃による遺伝子導入法の開発に着手し、細胞形態マーカーやシナプスマーカーの遺伝子導入に成功した。特に網膜の内網状層に二層の樹状突起を伸ばす二層性の網膜神経節細胞に注目して形態分類を行ない、これまでブタでは未報告の運動方向選択性の網膜神経節細胞の候補を含め、数種類の二層性の網膜神経節細胞が存在することを形態的に同定することができた。

研究成果の概要(英文)：I developed organotypic tissue culture of porcine retina with particle-mediated gene transfer. Using this method, I successfully transfected cell morphological marker plasmid and synaptic marker plasmid into the porcine retinal ganglion cells. I examined morphology and synaptic position of the porcine retinal ganglion cells. I found several types of bistratified retinal ganglion cells including a candidate for direction-selective ganglion cells in porcine retinas.

研究分野：分子生物学

キーワード：網膜神経節細胞 遺伝子銃 網膜培養

1. 研究開始当初の背景

緑内障は、視神経の特徴的な構造的・機能的異常をきたす疾患であり、我が国の失明原因の25%を占める。病態は明確でなく、我が国では正常眼圧緑内障が、緑内障全体の70%を占めているが、眼圧降下以外の治療法はほとんどなされておらず、未解明の部分が非常に大きい。緑内障の本態は、網膜神経節細胞の細胞死と軸索障害である。緑内障モデル動物として、軸索障害を生じさせ、様々な研究が行われている。しかし、軸索障害から、網膜神経節細胞死に至る過程での、網膜神経節細胞内におけるシナプス分布の変化やシナプス崩壊の機序については、ほとんど調べられていない。網膜神経節細胞が死ぬ過程で、特に興奮性シナプスが異常興奮することによって、神経細胞死が引き起こされる可能性がある。そのため、軸索障害により、特に興奮性シナプスの空間的な配置に異常が生じるかどうかを調べ、シナプス崩壊の機序を解明することは重要な課題と考えられる。しかし、網膜神経節細胞の樹状突起は、網膜内網状層において複雑に重なり合っているため、免疫抗体染色などの従来手法ではシナプスの位置を正確に同定することは困難であり、見過ごされる点も多くあった。これに対して、本研究代表者らはすでに、成体げっ歯類の網膜をまるごと組織培養し、遺伝子銃による遺伝子導入によって、網膜神経節細胞内の、興奮性シナプス分子の樹状突起上の位置を可視化する方法を確立した (Moritoh et al. 2010)。この方法を用いることによって、興奮性シナプスがどのように網膜神経節細胞の樹状突起上に分布するのかを可視化し分析することができる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、本研究代表者らが開発した成体哺乳類の網膜組織培養法を用いて、シナプス分子をラベルするシナプスマーカーや細胞形態マーカーなどのプラスミドを遺

伝子銃で遺伝子導入し、網膜神経節細胞の樹状突起上のシナプス分布や網膜神経節細胞の形態を可視化し、緑内障モデルである軸索障害により、これらシナプス分布の空間的特性や細胞形態がどう変化するかを解明することである。

加えて、医学上重要な実験動物であるブタに本手法の成体哺乳類の網膜組織培養法と遺伝子銃による遺伝子導入を応用し、ブタの網膜神経節細胞の形態分類とブタの網膜神経節細胞内のシナプス分布の解析を行なうことである。

3. 研究の方法

緑内障病態モデル動物での網膜神経節細胞における樹状突起上のシナプスの空間的な分布パターンと網膜神経節細胞の形態を明らかにするため、本研究代表者らが開発した成体哺乳類 (げっ歯類) 網膜の組織培養法に対して、シナプス分子をラベルするシナプスマーカーや細胞形態マーカー (プラスミド) の遺伝子銃による遺伝子導入を行った。以下の順で研究を進めた。

- (1) 網膜組織培養法と遺伝子銃による遺伝子導入効率を、本研究のために最適化した。
- (2) 培養網膜に遺伝子導入する最適な細胞内局在マーカーを検討した。
- (3) 軸索障害の有無で、遺伝子銃により導入したシナプスマーカーの網膜神経節細胞内分布パターンの解析と細胞形態変化の解析を行った。

また、成体哺乳類網膜の組織培養法と遺伝子銃による遺伝子導入法を、医学的に重要なブタの網膜に応用し、細胞形態マーカーとシナプスマーカーを導入して、網膜組織培養を行なった。培養後に固定した網膜で抗体染色を行ない、網膜神経節細胞の形態分類と網膜神経節細胞内のシナプス分布の解析を行なった。

4. 研究成果

緑内障モデルとして、ラットの視神経切断モデルでの解析を行なった。具体的には、ラットの視神経切断モデルの網膜に、軸索障害7日後、網膜を単離し、遺伝子銃で、細胞形態マーカーCMV-EGFP-F とシナプスマーカーCMV-PSD95-GFP を導入後、網膜培養を行なった。その後、観察を行ない、軸索障害後7日目での、網膜神経節細胞の形態とシナプス分布を障害なしのコントロールと比較した。この結果、軸索障害の有無で、網膜神経節細胞の形態とシナプス分布に有意な差は観察されなかった。本手法では、GFP や GFP を融合させたプラスミドを遺伝子導入に用いているため、遺伝子導入され培養後に GFP 蛍光を発する細胞は、GFP を十分に発現できるだけの程度健全な状態で、まだ細胞死やシナプス崩壊が引き起こされていない健全な細胞に偏ってしまう可能性があると考えた。当初観察の目的としていた、軸索障害により細胞死やシナプス崩壊が引き起こされているような不健全な状態の細胞では、GFP を十分に発現できない恐れがあり、本手法で捉えるのは難しいのではないかとこの可能性を考えた。

以上から、げっ歯類の緑内障モデルで研究計画を立案していたが、緑内障モデルで細胞死やシナプス崩壊に至るような状態の網膜神経節細胞における遺伝子導入は、本手法では困難な可能性があるため、本手法で当初の研究計画を進めることには限界があるのではないかと考えた。そこで、げっ歯類の緑内障モデルでの網膜培養と遺伝子銃による研究計画に加え、医学研究に重要な実験動物であるが、網膜神経節細胞の形態分類やシナプス分布の解析があまり進んでいないブタの網膜を用いて、本手法を応用し研究を開始することにした。まず、ブタの網膜培養法の開発に着手し、げっ歯類での手法をブタの網膜にも応用できることがわかった (図1)。遺伝子銃による遺伝子導入として、細胞形態マ

ーカーやシナプスマーカーの遺伝子導入に成功した (図2)。網膜神経節細胞の形態分類には、細胞形態マーカーとして、CMV-EGFP-F プラスミドを用い、網膜神経節細胞のシナプス分布には、興奮性ポストシナプスマーカーである、CMV-PSD95-GFP プラスミドを用いた。特に網膜の内網状層に二層の樹状突起を伸ばす二層性の網膜神経節細胞に注目して形態分類を行ない、スターバーストアクリン細胞のマーカーである ChAT 抗体と GFP 抗体との共染色により、これまでブタでは未報告の運動方向選択性の網膜神経節細胞の候補 (図3) を含め、それ以外にも数種類の二層性の網膜神経節細胞 (図4) が存在することを形態的に同定することができた。現在これらの内容を論文にまとめるため準備を行なっている。



図1 遺伝子銃により遺伝子導入したブタ培養網膜

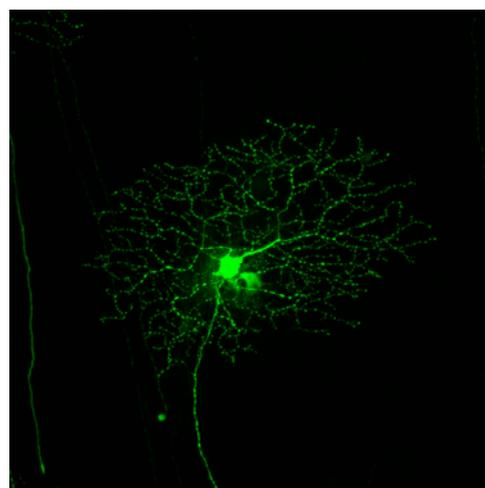


図2 興奮性シナプスマーカーPSD95-GFPを導入したブタの網膜神経節細胞

樹状突起上にドット状にシナプスの位置を可視化することができた。

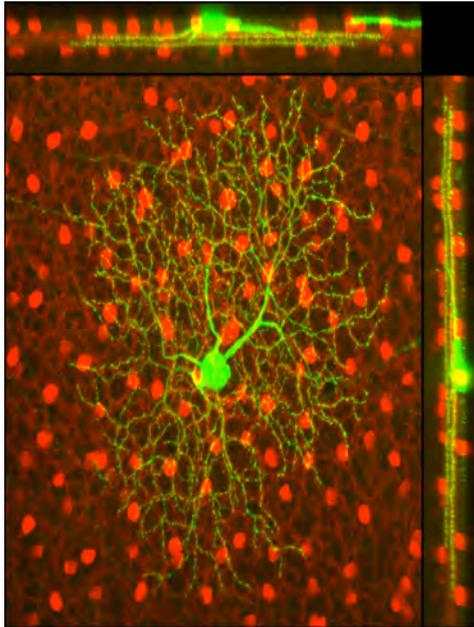


図3 プタの運動方向選択性網膜神経節細胞の候補

赤色で染色されたスターバーストアマクリン細胞の樹状突起に沿って、緑色で染色された網膜神経節細胞の樹状突起が広がっている。

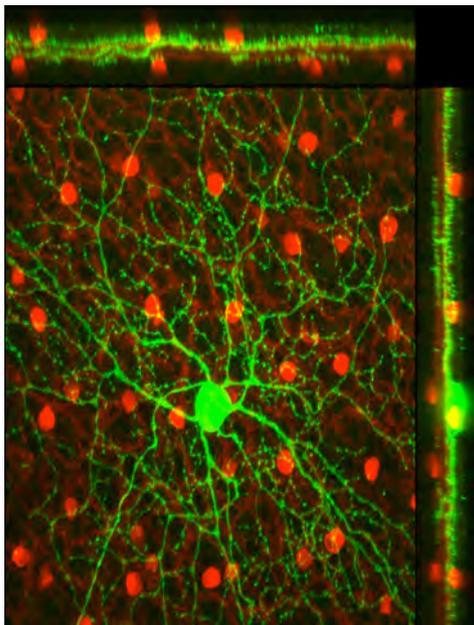


図4 本研究で同定されたプタの二層性の網膜神経節細胞の1種

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0件)

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森藤 暁 (Moritoh, Satoru)
東北大学・大学院医学系研究科・助手
研究者番号：20647234

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：