

平成21年5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590243
 研究課題名（和文） コバルトクロライド誘発視細胞選択的障害モデルの発現機序解明ならびにその防御・治療

研究課題名（英文） A new model of retinal photoreceptor cell degeneration induced by a chemical hypoxia-mimicking agent, cobalt chloride: clarification of its mechanism and protection of retinal degeneration

研究代表者

丹羽 雅之 (NIWA MASAYUKI)
 岐阜大学・医学部・教授
 研究者番号：40156146

研究成果の概要：

マウス・ラットにおける CoCl_2 (Co) の選択的網膜視細胞障害能を詳細に検討し、その細胞死が apoptosis によるものであることを明らかにするとともに、Co の至適投与量を決定することにより、視細胞障害モデルを確立し、網膜障害予防・治療の検討に有用であることを明らかにした。視細胞障害発現機序としては、視細胞層へのカルシウムの特異的な集積が観察され、カルシウム濃度の局在変化によるメカニズムの関与が示唆された。脳虚血モデルに対し有効性を示すラジカル消去剤 PBN を用い、Co 誘発障害モデルでの有効性を組織化学的に検討したところ比較とした NMDA 誘発神経節細胞死は PBN により有意に、用量依存的に抑制されたが、Co による障害に対しては改善が認められなかった。このことから Co による視細胞障害性にはラジカルの関与が否定的である事が示唆された。ERG、VEP への影響を検討したところ、NMDA 同様 Co 投与によりそれらの発生が顕著に抑制された。なお、NMDA 投与による ERG の抑制はラジカル消去剤 PBN により回復が認められたが、Co による抑制には回復は認められなかった。再生治療への応用の目的でマウス ES 細胞を Co あるいは NMDA 誘発網膜細胞障害モデルに移植し、再生治療を試みた。ES 細胞は移植により網膜神経節細胞層に浸潤するような形で生着し、この生着率は NMDA 処理後の障害網膜では非処置群に比べ増加した。さらにこの生着細胞の腫瘍化は methotrexate の併用による制御の可能性が示唆された。一方、Co 障害後への ES 細胞の移植を試みたところ、有意な生着率の増加は観察されなかった。今後ヒト由来人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いて同様な移植の検討を試みる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：網膜視細胞障害、 CoCl_2 、実験動物モデル、Apoptosis、予防・治療・再生

1. 研究開始当初の背景

網膜視細胞は眼球の後方に位置し、哺乳類において唯一の光センサーとして働く。網膜視細胞は錐体・桿体の2種類の細胞からなり、視覚において重要な役割を担っている。しかしながら網膜色素変性症や近年先進国で著しい増加を示している老人性黄斑変性症、糖尿病性網膜症、網膜剥離症、網膜循環不全、緑内障など、遺伝性あるいは後天性の疾患により網膜視細胞が障害されると、著しい視力障害を来す (Berson EL, 1993. Invest Ophthalmol Vis Sci. 34, 1659-1676 ; Kennan A, et al. 2005. Trends Genet. 21, 103-110, etc)。これらの疾患に対しては、その進行を遅らせる以外に根本的な治療法がないのが現状である。

一方、各種疾患における網膜視細胞の障害発現やその防御法の確立の研究には実験動物モデルが必須である。これまでもいくつかの実験動物モデルが開発されてきたが、そのほとんどすべてが先天的遺伝子異常モデルであり、現状では十分とは言いがたい。例えば代表的モデルである rd マウスは rod 特有のホスホジエステラーゼの遺伝的変異を有し、出生後わずか1週間で rod 細胞に急速で大規模な細胞死をもたらす (Bowes C, et al. 1990. Nature. 347, 677-680)、その後2カ月未滿で失明にいたる (Jimenez AJ, et al. 1996. Cell Tissue Res. 284, 193-202)。しかしながらこのような先天的な遺伝子疾患モデルでは網膜障害発現後に成熟するため、成長過程で網膜のみならず生体における物質代謝異常を引き起こすことが避けられないという欠点がある。また多くのモデルはマウスであり、中動物の使用は困難である。

我々はすでに培養細胞に虚血状態を引き起こすと考えられている CoCl₂ をマウスに眼内投与することにより、網膜視細胞に極めて選択的にアポトーシスを伴う細胞死を引き起こすことを見出し、新しいモデルとして報告した (Hara A, Niwa M, et al. 2006. Brain Res. 1109:192-200), 下図参照)。本モデルは低分子物質 CoCl₂ を眼内に投与するという簡便な方法により、時期を限定して網膜視細胞障害を発現出来る長所を有している。またマウスのみならずラットにおいても同様な障害性を確認している。これは我々が初めて見出した現象であり、世界的にも他に例が無い。

2. 研究の目的

そこで本研究では1) マウス・ラットにおける CoCl₂ (Co) の選択的網膜視細胞障害

能の細胞死の形態を明らかにしつつ、視細胞障害モデルとして確立、2) 中型実験動物における再現性の検討、3) Co 誘発性網膜視細胞障害性の機能面からの検討、4) Co 誘発性視細胞障害の防御の検討、5) Co 誘発性視細胞障害に対する再生治療の検討を試みた。

3. 研究の方法

1) 網膜障害発現: ddY 系マウス、ならびに Wistar 系ラットを用い、眼球内に Co を注入し、一定時間後に生理学および、組織化学的評価を行った。なお、比較として網膜神経節細胞を特異的に傷害する NMDA 投与を行った。

2) 細胞障害性の評価: HE 染色ならびに TUNEL 染色による組織化学的手法、ならびに動物用 ERG 計測システムを用いた網膜電位 (ERG) ならびに視覚誘発電位 (VEP) 測定による生理学的手法により評価した。

4. 研究成果

1) マウスにおける Co の選択的網膜視細胞障害能を毒性薬理学的に詳細に検討した。Co による視細胞障害性を HE 染色、TUNEL 染色にて評価したところ、その細胞死は Apoptosis によるものであることが明らかとなった。また経時変化 (図1・図3・図4)、用量作用性 (図2) の検討から、最も選択性が高く発現される至適投与量はマウスでは 10 nmol であることが明らかとなった。同様にしてラットで検討したところ、ラットにおける至適投与量は 80 nmol の眼内投与であることが明らかとなった (図5)。これらのことから Co による視細胞障害モデルが確立でき、その障害予防・治療の検討に有用であることが明かとなった。

2) 中型実験動物としてウサギを用いて予試験的に検討した結果、齧歯類と同様な apoptosis を伴う選択的視細胞障害性が観察され、種を超えた応用が可能であることが示唆された。

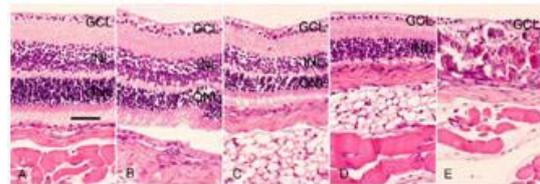


図1. CoCl₂ の眼内投与によるマウス網膜障害. 濃度依存性の検討. (A) 1, (B) 2, (C) 5, (D) 10, (E) 20 nmol / 2 μ l CoCl₂.

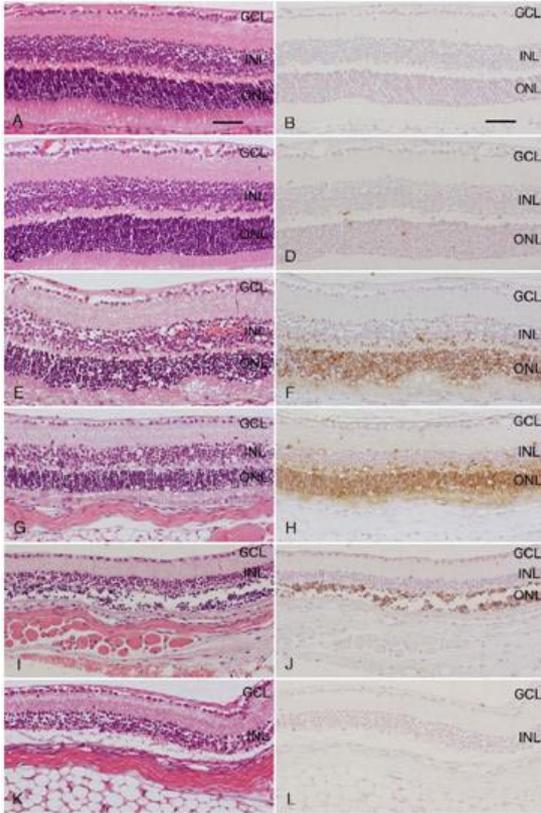


図2. CoCl₂ (12nmol) の眼内投与によるマウス網膜障害. 経時変化. (A, C, E, G, I, K) : HE染色, (B, D, F, H, J, L) : TUNEL染色. 12 (A, B), 24 (C, D), 48 (E, F), 96時間 (G, H), 1週間 (I, J), 2週間 (K, L) 後.

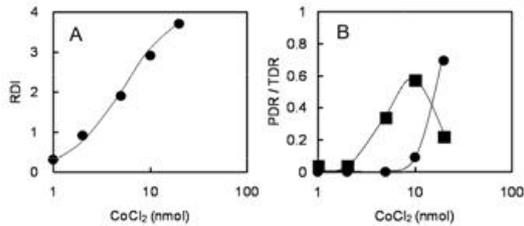


図3. CoCl₂ マウス眼内投与後の網膜障害性の用量-作用曲線.
RDI : 網膜障害性 INDEX, PDR : 全網膜中の視細胞選択的障害性の比. TDR : 全網膜中の網膜障害性の比

3) Co誘発性網膜視細胞障害を機能面から評価する目的で動物用 ERG 計測システムを用いた網膜電位 (ERG) ならびに視覚誘発電位 (VEP) 測定法の確立を試みた。その結果、マウスにおいて再現性高く ERG, VEP を測定出来る条件を確立した。

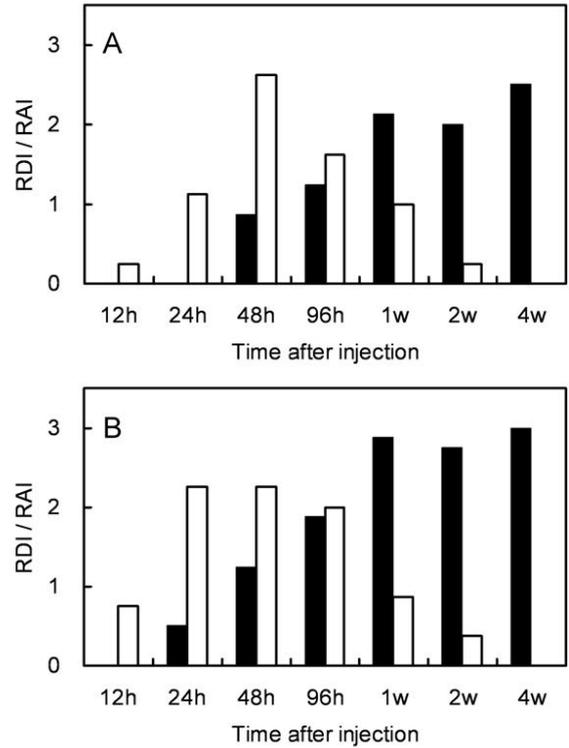


図4. 図2に基づく網膜障害性経時変化の定量化. RAI (白カラム) : TUNEL染色に基づく Apoptosis-index. RDI (黒カラム) : HE染色に基づく細胞障害性インデックス. CoCl₂濃度: A, 12nmol, B, 18nmol.

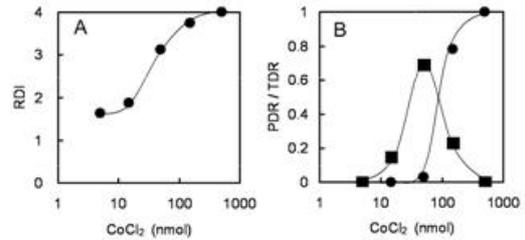


図5. CoCl₂ ラット眼内投与後の網膜障害性の用量-作用曲線.
RDI : 網膜障害性 INDEX, PDR : 全網膜中の視細胞選択的障害性の比. TDR : 全網膜中の網膜障害性の比

これらの条件により予試験的にCoをマウスに眼内投与したところ、定性的ではあるが明かな電位の減少が観察出来た。比較として用いたNMDAによる電位変化も検討し、良好な電位減少作用が認められた。Co, NMDAの両電位変化を比較測定することにより、予防薬・治療薬の開発に有用な機能面からの測定系が確率できる。

4) C oの視細胞障害性発現機序を明らかにする目的で、細胞内C a動態の検討を行った。まず組織化学的な検討として Kossa 染色を行ったところ、視細胞層に明らかなC aの沈着が認められ、C aの局在の変化が示唆された。そこで蛍光C a試薬を用いてC a動態の変動を検討したが、現時点では良好な結果は得られていない。

同様な目的で、C o投与後の網膜組織標本を用いて、細胞のC a動態に影響を与える低分子量H S P 2 0ならびにそのリン酸化体(16位、59位)の量的変動を免疫組織学的に検討したところ、いずれも染色性は観察されなかった。C oの細胞障害性におけるC aの変動に関しては更に検討を続ける。

次いで、C o眼内投与による視細胞選択的障害性の防御、治療を試みた。

5) 我々が既に明らかにした脳虚血モデルに対し有効性を示すラジカル消去剤PBNを用い、C o誘発障害モデルでの有効性を組織化学的に検討した。NMDA誘発神経節細胞死はPBNにより有意に、用量依存的に抑制されたが(図6)、C oによる障害に対しては改善が認められなかった。このことからC oによる視細胞障害性にはラジカルの関与が否定的である事が示唆された。

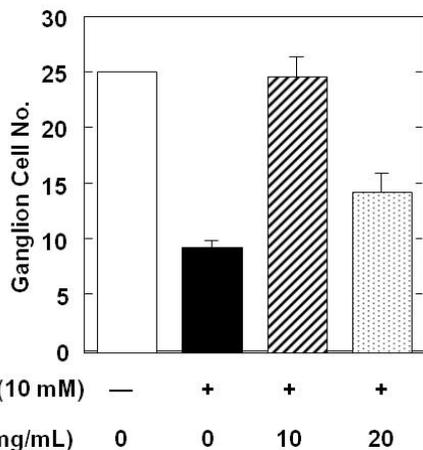


図6. NMDA眼内投与後の網膜神経節細胞障害に対する、PBNの抑制作用。

6) 網膜障害性に対するPBNの効果を生理学的に評価した。NMDA投与によるERGの減弱作用はラジカル消去剤PBNにより回復が認められたが、C oによるERG抑制には回復は認められなかった。

7) 再生治療への応用の目的でマウスES細胞をC oあるいはNMDA誘発網膜細胞障害モデルに移植し、再生治療を試みた。ES細胞は移植により網膜神経節細胞層に浸潤するような形で生着し、この生着率はNMD

A処理後の障害網膜では非処置群に比べ増加した。さらにこの生着細胞の腫瘍化はmethotrexateの併用による制御の可能性が示唆された。一方、C o障害後へのES細胞の移植を試みたところ、有意な生着率の増加は観察されなかった。今後ヒト由来人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いて同様な移植の検討を試みる。

以上の結果から、C oの選択的視細胞障害モデルが確立出来た。またこの障害性は種を問わず発現することが示唆され、さまざまな種での実験動物モデルの作成が可能であり、創薬における有用なツールとなる可能性がある。さらに本モデルは遺伝子変異を伴うモデルと異なり、様々な成長過程でのモデル動物を簡易に作成できる長所を有している。引き続き作用機序の解明、障害予防・治療薬の探索、網膜細胞の幹細胞等を用いた再生などについて検討を加える予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Niwa M, Hara A, Taguchi A, Aoki H, Kozawa O, Mori H. Spatiotemporal expression of Hsp20 and its phosphorylation in hippocampal CA1 pyramidal neurons after transient forebrain ischemia. *Neurol Res.* (2008) Dec 3. [Epub ahead of print] 査読有り
- ② Taguchi A, Hara A, Saito K, Hoshi M, Niwa M, Seishima M, Mori H. Localization and spatiotemporal expression of IDO following transient forebrain ischemia in gerbils. *Brain Res.* 1217:78-85(2008). 査読有り
- ③ Hara A, Aoki H, Taguchi A, Niwa M, Yamada Y, Kunisada T, Mori H. Neuron-like differentiation and selective ablation of undifferentiated embryonic stem cells containing suicide gene with Oct-4 promoter. *Stem Cells Dev.* 17: 619-627(2008). 査読有り
- ④ Aoki H, Hara A, Niwa M, Motohashi T, Suzuki T, Kunisada T. Transplantation of cells from eye-like structures differentiated from embryonic stem cells in vitro and in vivo regeneration of retinal ganglion-like cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 246:255-265(2008). 査読有り
- ⑤ Hara A, Taguchi A, Niwa M, Aoki H, Yamada Y, Ito H, Nagata K, Kunisada T, Mori H. Localization of septin 8 in murine retina, and spatiotemporal expression of septin 8 in a murine

model of photoreceptor cell degeneration. Neurosci Lett. 423: 205-210 (2007). 査読有り

- ⑥ Aoki H, Hara A, Niwa M, Motohashi T, Suzuki T, Kunisada T. An in vitro mouse model for retinal ganglion cell replacement therapy using eye-like structures differentiated from ES cells. Exp Eye Res. 84:868-875 (2007). 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

- ① Niwa M, Aoki H, Kozawa O, Hara A. CoCl₂による選択的視神経障害モデルの確立、第 82 回日本薬理学会年会 2009. 3. 16 横浜
- ② 青木仁美、丹羽雅之、原明、國貞隆弘 眼球の前房における免疫特権を活かしたマウス ES 細胞由来色素細胞の移植による虹彩の有色化と in vivo における分化制御 第 29 回日本炎症・再生医学会 2008. 7. 10 東京

[図書] (計 1 件)

- ⑦ Hara A, Oka N, Aoki H, Taguchi A, Yamada Y, Niwa M, Mori H. Nova Science Publisher (New York) OCT-3/4 Expressing Cells as Cancer Stem Cells in Human Immature Teratoma: Cancer Differentiation Potential. In: New Cell Differentiation Research Topics. 2008, 1-6

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 雅之 (NIWA MASAYUKI)

岐阜大学・医学部・教授

研究者番号：4 0 1 5 6 1 4 6

(2) 研究分担者

原 明 (HARA AKIRA)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：1 0 2 4 2 7 2 8

(3) 連携研究者

青木 仁美 (AOKI HITOMI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：1 0 5 5 0 3 6 1