

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592022

研究課題名 (和文) 網膜神経節細胞の分子多様性の解明による細胞死阻止の研究

研究課題名 (英文) Trials to rescue retinal ganglion cells from several clinical pathways leading to cell death by analysis of their molecular diversity

研究代表者

小阪 淳 (KOSAKA JUN)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：40243216

研究成果の概要：

細胞死を誘導するとされるHrkと、神経細胞の成熟に関わると考えられるC38分子の網膜神経節細胞、及び他種の網膜神経節細胞におけるmRNA発現、及びタンパク分子の局在の質的量的な多様性が明らかになった。さらに網膜変性疾患に対する細胞治療のソースとしての色素上皮細胞の脱分化のしくみの一端が明らかになった。いずれも、将来の臨床応用につながる重要な基礎研究の成果である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：視覚科学、神経科学、発生生物学、再生生物学、眼科学、解剖学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼細胞生物学、眼発生・再生医学、網膜神経節細胞、細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の網膜神経節細胞は、その樹状突起形態の差や細胞体の大きさ等から、 $\alpha$ 型、 $\beta$ 型等に細分化している。緑内障では、網膜周辺部の大型 ( $\alpha$ 型) 細胞から変性が始まる。一方で、視神経障害や実験的視神経切断時には $\alpha$ 型細胞は細胞死に抵抗性を示し、逆に小型 ( $\beta$ 型) から細胞死に至る。以上より、 $\alpha$ 型、 $\beta$ 型という網膜神経節細胞のサブクラスに、

分子の発現の質的量的な差、つまり細胞死を決める細胞内情報伝達経路の分子レベルの差が存在することが強く示唆される。しかし、これら細胞死の差を説明する分子の全容については、解明されているとは言い難い。これら網膜神経節細胞のサブクラスを特徴付ける分子 ( $\alpha$ 型、 $\beta$ 型の分化マーカー分子) が同定され、なおかつ、それぞれに特異的な細胞

死の経路が明らかになれば、基礎分野での大きな貢献につながる。そればかりでなく、現時点では根本的治療法のない緑内障で、細胞死に至る網膜周辺部の $\alpha$ 型網膜神経節細胞に対して、細胞死を防ぐ手段を講じるといった、新しい治療法の開発へ結びつけることができると期待される。

## 2. 研究の目的

網膜神経節細胞一個一個で活性化されるシグナル伝達経路の分子の差、さらに同じ分子であっても、その量的な差を詳細に記載することで、網膜神経節細胞の転写レベルでの多様性を明らかにする。種々の疾病において、何故異なったサブクラスの網膜神経節細胞死が起こるかという問題の理解につなげることが、本研究の目的である。同時に、発生過程で各種網膜神経細胞への分化機転を解明するとともに、発生終了後の網膜再生の可能性について常に注意を払い研究を行う。網膜変性疾患に対する、根本的治療法の確立を目指した基礎研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 特異抗体による免疫組織化学染色

本研究の大半は、形態学的手法により行った。ラット、フェレットの網膜組織や、培養細胞に対する免疫組織化学染色を施行した。後段に記す分子を特異的に標識する市販のモノクローン抗体、抗血清を用いた。その他に、網膜神経節細胞と水平細胞を染色するC38抗体を用いた。本抗体は、1996年に、研究代表者と分担者が単離同定したモノクローナル抗体である[Wakabayashi T, Fukuda Y, Kosaka J. (1996) *Vision Research* 36, 1081-1090]。

### (2) 細胞培養

Hrkの機能探索、C38分子の機能探索には、神経系の株細胞であるP19細胞(embryonal carcinoma)、Neuro2a細胞(neuroblastoma)を用いた。

ふ卵9日目ニワトリ胚から網膜色素上皮層を単離し、初代培養を行った。培養液中にphenylthioureaとhuman basic fibroblast growth factorを添加し細胞を植え継ぐことによって、色素上皮細胞から分化2方向性を有する脱分化細胞を経て水晶体細胞を誘導することが出来る[Kosaka J, Watanabe K, Eguchi G. (1992) *Experimental Eye Research* 55, 261-267.]。この脱分化細胞と、網膜色素上皮細胞の細胞内情報伝達経路の違いを調査した。

### (3) $Ca^{2+}$ optical imaging

初代培養したニワトリ由来網膜色素上皮細胞と、同細胞種から誘導した脱分化細胞に対して、 $Ca^{2+}$  indicatorである蛍光色素Fluo-4をロードして、細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の変化を蛍光顕微鏡下で2次元的に観察した。

## 4. 研究成果

(1) 細胞死関連分子の網膜神経節細胞死における働き

ラット網膜と、網膜神経節細胞の $\alpha$ 型、 $\beta$ 型機能分化がより明瞭なフェレットの網膜、培養細胞において、細胞死を促進するpro-apoptotic geneであるHrkの詳細な発現パターンと細胞死誘導機能との関連性が明らかになった。Hrkノックアウトマウスの組織標本を用いて、まず複数の市販の抗Hrk抗体の品質を評価したところ、特異性が高く使用に耐えうる製品が見出されたので、免疫組織化学染色を行った。その結果、網膜神経節

細胞では、その局在する蛋白質の絶対量は低かった。このことは、Hrk を発現しない培養細胞に Hrk の全長 cDNA を発現ベクターに組み込み transfection して染色した結果からも支持される。この培養細胞の実験では、Hrk を発現する細胞は、抗体による十分な染色性が観察された。さらに、抗体の染色性が高く、発現量の多い細胞ほど細胞死に至る傾向が見られたので、Hrk の発現上昇により網膜神経節細胞が細胞死に至るといふ我々の仮説を裏付ける結果となった（論文準備中）。現在、後段に述べる標的分子の定量化法を駆使して、Hrk 分子の局在量と細胞死の関連について、培養細胞、及び、正常と視神経切断後の網膜組織を用いて解析を継続している。

## （2）細胞一個レベルでの mRNA 発現量の絶対量の定量化

### ①p53 分子の定量化

組織切片上の遺伝子産物の絶対量の定量化法の改良を進めた。図 1 A は、*in situ* hybridization 法によりヒト大腸癌由来細胞株 SW620 細胞における p53 抑制癌遺伝子の mRNA の局在を示したものである。図のように、mRNA のコピー数は、シグナル強度を示す染色質の濃淡に反映され、p53 分子の発現に細胞一個一個のレベルで違いがあることが判る。図 1 B は、同じ細胞の p53 タンパク分子をモノクローナル抗体 D0-7 で染色し蛍光発色したものである。同様に、核内に局在する p53 タンパク分子の存在量に違いがあることが判る。現在までに、p53 に対する 4 種類の probe の準備を終了し、その染色性について再現性があるかどうかを確認した。さらに、標的部分のオリゴヌクレオチドをスポットしたスライドガラス、抗体が認識する部分の合成ペプチドをスポットしたスライドガラスを作成し、定量化を行っている。

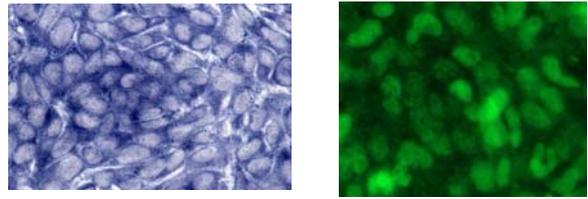


図 1 : A(左図)ヒト大腸癌由来細胞 SW620 における p53-mRNA の局在。B(右図)同細胞種の p53 蛋白質の局在。

### ②組織切片の RNase 処理条件の決定

陰性対照用に行う、組織切片の RNase 処理について、標本中の標的 RNA を完全に消化分解できる条件を決定することが出来た。その条件は、臓器によって異なることが明らかになり、定量化の条件設定において、組織別、細胞別に、詳細な条件検討が必要であることが示唆された。

ラット精巣、肝臓、小脳を材料に 28S-rRNA のプローブを用いて、RNase の処理条件を検討した。RNaseA の濃度条件を 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0mg/ml に振って組織切片を 37 度 30 分処理した。肝臓では、もっとも条件のゆるい 0.05mg/ml の RNase 処理ですべてのシグナルが消失した。標的 rRNA 分子が完全分解されたものと考えられる。精巣では 0.2mg/ml の処理で、spermatogonia でわずかに染色性が残った。しかし、0.5mg/ml で処理すると完全分解することが出来た。小脳では、もっとも高い濃度の 1.0mg/ml の RNase 処理でも、Purkinje 細胞にシグナルが残った。この結果は、組織内の標的核酸を酵素処理によって完全分解を行う際には、各組織によって詳細な条件検討が必要なことを示唆すると共に、組織によって標的核酸の存在状態に違いがあることが予想させる。

本実験結果により、スポットした標的合成オリゴヌクレオチドに組織切片を重ねて貼

り付けることによって、あたかも、組織中に標的分子のような状態に修飾できる。その際の組織切片中の標的核酸の分解操作の条件検討がなされた。本技術の実用化に大きく貢献できた。

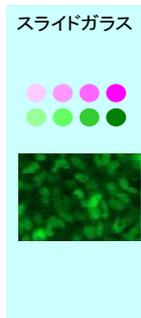


図 2：定量化技術の概略。組織切片と共に、濃度勾配を持った標的物質のスポットを置き、一体として染色する。

### (3) 細胞死に関わると考えられる C38 抗原分子の網膜内組織分布解析

我々が単離した網膜神経節細胞特異的モノクローン抗体 C38 の認識抗原分子 C38 の網膜における詳細な組織分布と、網膜神経細胞の成熟を制御するという機能が明らかになった(投稿準備中)。C38 分子の発現という視点から見ると、網膜神経細胞は中枢神経細胞でありながら、未成熟な表現型を成熟個体においても保持していることが明らかになってきた。特に水平細胞では、成熟ラットにおいても未成熟な神経細胞のマーカである Doublecortin が発現することが明らかになった(文献 1)。成熟個体の水平細胞では、神経成熟のマーカである C38 と未成熟のマーカである Doublecortin が共発現することが判明した(論文準備中)。視神経切断後、C38 分子の発現量が減少することが明らかになっているので、細胞死と神経成熟の関連性というユニークな観点から、今後研究が発展すると考えられる。

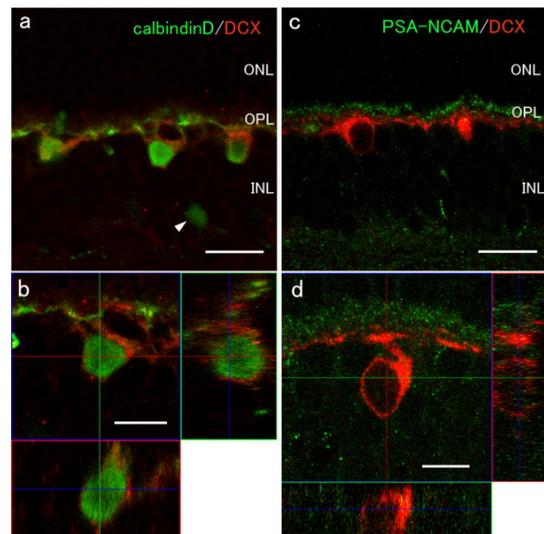


図 3：水平細胞の成熟度を探る。成熟ラット網膜切片を PSA-NCAM(OPL のマーカ)、calbindinD(水平細胞のマーカ)、DCX(Doublecortin)のそれぞれの得意抗体で染色した。calbindinD 陽性の水平細胞で DCX が共局在していることが判る。(文献 1 より転載)

### (4) 網膜色素上皮の分化転換性の生理学的解析-網膜の再生医学的治療の細胞ソースとして

網膜変性疾患に対する再生医学的治療の細胞ソースとして、分化転換能を有する網膜色素上皮の生理機能変化に着目して研究を進めた。初代培養したニワトリ胚由来網膜色素上皮細胞は、水晶体細胞や網膜神経細胞への分化転換能を有しているとされる。網膜色素上皮細胞と、脱分化細胞のアセチルコリンに対する応答性の違いを調査した。

網膜色素上皮細胞と脱分化細胞の双方で、ムスカリン性アセチルコリン受容体の活性化を経由した細胞内  $Ca^{2+}$  ストアからの  $Ca^{2+}$  動員による、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇が見られた。一方、脱分化細胞では、それに加えてニコチ

ン性アセチルコリン受容体の活性化により L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介した細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が観察された。この変化は、網膜色素上皮の脱分化過程の最も早期で起こる生理学的な変化である。以上のデータは、ニコチン型アセチルコリン受容体の活性化と、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介した細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が、色素上皮細胞の脱分化を促すものと予想できる。そこで、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの阻害剤である Diltiazem を培養液中に添加すると、色素上皮細胞から脱分化細胞への転換が阻害されることが明らかになった。本研究は、色素上皮細胞の脱分化の過程をすべて説明するものではないが、脱分化、分化転換過程で細胞内情報伝達機構の大きな変化が起こっていることが強く示唆される結果となった(図4)。

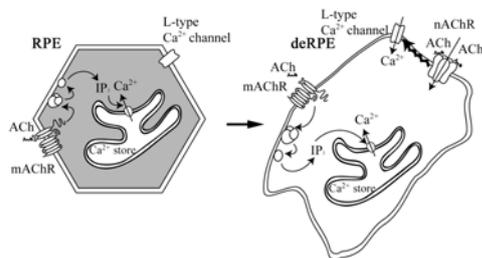


図4：色素上皮細胞の分化状態では、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルは細胞膜上に発現するが、ムスカリン型アセチルコリン受容体を介した細胞内ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  動員のみが起こる。細胞が脱分化すると、ニコチン型アセチルコリン受容体が細胞膜上に発現し、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こす。脱分化によって、2 本立ての細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇機構を有するようになる。(文献2より転載)

## 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 2 件)

(1) Mariko Sekiguchi-Tonosaki, Masakatsu Obata, Akira Haruki, Toshiyuki Himi, Jun Kosaka\*. (2009). Acetylcholine induces  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in chicken retinal pigmented epithelial cells during dedifferentiation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **296**, C1195-C1206. 査読有.

(2) Taketoshi Wakabayashi\*, Jun Kosaka, Tetsuji Mori, Yasuharu Takamori, Hisao Yamada (2008). Doublecortin expression continues into adulthood cells in the rat retina. *Neuroscience Letters* **442**, 249-252. 査読有.

[学会発表] (計 2 件)

(1) (シンポジウム発表) 若林毅俊、小阪 淳、山田久夫 “網膜神経細胞の成熟を制御する分子の解析” シンポジウム「網膜を材料にした多角的アプローチにより組織細胞の姿を知る」 (オーガナイザー) 小阪 淳、筒井公子、第 114 回日本解剖学会総会 2009 年 3 月 29 日、岡山.

(2) (一般ポスター発表) 関口-外崎真理子、小幡雅克、春木明、佐々木順造、氷見敏行、小阪 淳 “脱分化誘導過程における網膜色素上皮細胞のアセチルコリンに対する応答性” 第 31 回日本神経科学大会・東京 2008 年 7 月 11 日.

“Response to acetylcholine in the chicken retinal pigmented epithelial cells during their dedifferentiation”

[その他]  
ホームページ  
<http://square.umin.ac.jp/oka-anat/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小阪 淳 (KOSAKA JUN)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准  
教授  
研究者番号：40243216

(2) 研究分担者

若林 毅俊 (WAKABAYASHI TAKETOSHI)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90302421

(3) 連携研究者

なし