

平成 23 年 5 月 27 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21791661

研究課題名（和文）網膜グリア細胞及び脂肪幹細胞を用いた新しい網膜移植治療の開発

研究課題名（英文）Retinal transplantation with retinal glial cell and adipocytes

研究代表者

高宮 央（TAKAMIYA AKIRA）

旭川医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：50400114

研究成果の概要（和文）：

幹細胞の特性を有する網膜グリア細胞および脂肪細胞の新しいドナー細胞としての可能性を探求するために、これらの細胞をもちいてマウスに網膜移植を行った。その結果、宿主網膜に強固に生着し神経細胞様の突起を伸展させたドナー細胞を網膜外層に観察することが出来た。この細胞は主に扁平な細胞体と突起の伸展を有しており、網膜アストロサイト様の特徴を有していた。この結果から、網膜グリア細胞および脂肪細胞は網膜移植における新しいドナー細胞に成り得る可能性が示唆された。一方、網膜外層に比較して網膜内層で観察することが出来たドナー細胞は少数であったこと。このことから、今回用いた2つのドナー細胞はグリア系の細胞に分化しやすい傾向にある事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Retinal transplantation with retinal glial cells or adipose cells as new donor cells, which have some characteristics of potent progenitor cells, was performed in mouse retinas. From these results, the donor cells were observed in the outer layer, which engrafted into host retinas strongly. Their cell bodies changed from round to flat shape and had dendrites and contact to each other. They looked like characteristics of retinal astrocytes. In this study, these donor cells may become new donor cells for retinal transplantation. On the other hand, few donor cells were observed in the inner layer. This result may suggest that these donors tend to differentiate into the retinal glial cells rather than the retinal neuronal cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：1) 網膜移植、2) グリア細胞、3) 脂肪細胞、4) ドナー細、5) GFPマウス

1. 研究開始当初の背景

ヒト成熟網膜は自己増殖能を殆ど有さない。そのため、種々の眼科疾患によって引き起こされた網膜障害は永久的な視力障害をもたらす。これらの難治性の網膜疾患に対して、傷害された網膜細胞を正常細胞に置き換える事が可能な網膜移植は、極めて有効な治療法である。これまでに、数多くの網膜移植における研究が行われ、それに伴いドナー細胞に関する研究も行われて来たが、現在においても、未だ有用なドナー細胞が見つからないため、臨床の場で実用化されていない。従って、網膜移植における新しいドナー細胞の開発は網膜再生医療分野において、今まさに切望されている研究課題である。

2. 研究の目的

今回我々は網膜移植治療における有用な新しいドナー細胞の開発を目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

1) ドナー細胞

成熟 GFP マウス (green fluorescein protein : バックグラウンド : C57BL/6 マウス (Okabe, 1997)) の生後 2~4 日のマウスの網膜を酵素処理して分離した後、グリア細胞の培養条件 (DMEM/F12, 10%FBS) で培養して純粋な網膜グリア細胞を得た。一方、脂肪細胞は生後 3-6 ヶ月の成熟マウスから皮下脂肪摘出して酵素処理した後、上述と同様の培養条件で培養し純粋な脂肪細胞を抽出した。それぞれ 10~14 日培養した後に、網膜移植のドナー細胞に使用した。

2) 宿主動物

GFP マウスのバックグラウンドと同型の野生型 C57BL/6 マウス (生後 3-6 ヶ月) を用いた。

3) グリアトキシンによる網膜移植前処置

網膜移植効率の向上を図るため、グリア細胞特異的傷害物質であるグリアトキシン (Sigma, St. Louis, MO) を移植前に低濃度投与して宿主網膜のバリアー形成能を排除することを試みた。この手法は、本研究責任者がハーバード大学、スケペンス眼研究所の Chen 博士に留学した際、我々が研究開発した方法である。グリアトキシンが宿主網膜のバリアー形成能を確実に排除しているかを確認するため、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体を用いた免疫組織化学法 (IHC) によって GFAP の発現が抑制されていること観察した。

4) 網膜移植

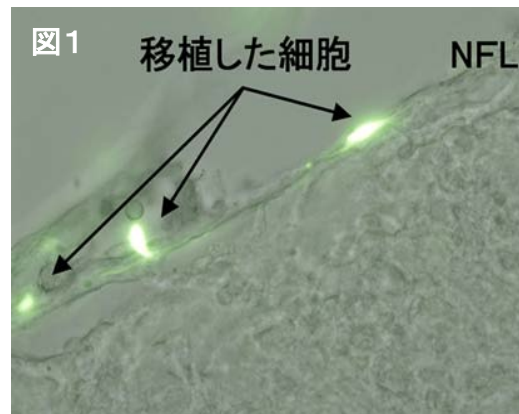
グリアトキシン治療 2 日後に、上述した GFP 陽性ドナー細胞を、グリアトキシンで治療した領域の網膜下に (細胞数 $1 \times 10^6 \sim 10^7 / \text{ml}$ $2 \mu \text{l}$) 作成したマイクロシリンジードルを用いて注入 (移植) した。

5) 網膜移植の評価

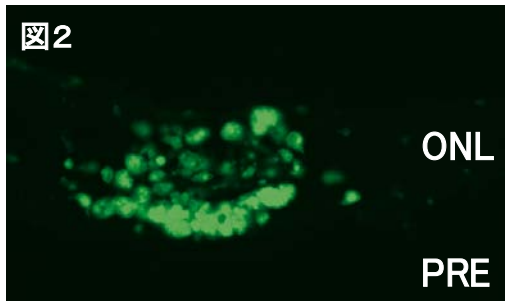
網膜移植後に網膜切片および網膜伸展標本を作製し GFP 陽性ドナー細胞の形態変化を観察した。

4. 研究成果

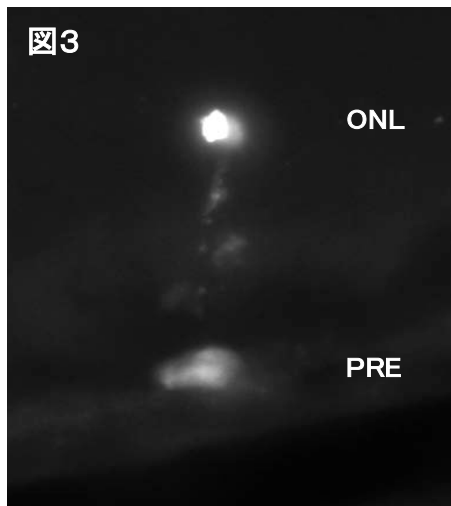
ドナー細胞である GFP 陽性網膜グリア細胞および脂肪細胞の形態変化を、網膜移植後の網膜切片及び網膜伸展標本を作製して検討した。その結果、移植 2 週後の網膜切片および網膜伸展標本において、ドナー細胞に用いた網膜グリア細胞および脂肪細胞が宿主網膜の内層および外層に GFP 陽性細胞として認められた。そのうち内層で観察された多くの GFP 陽性細胞は宿主網膜に生着していた。その細胞は扁平な細胞体を有し隣り合う細胞に突起を伸展させて互いにコンタクトをしていた。移植前の 2 つのドナー細胞は本来円形の細胞体を有するが、宿主網膜に生着したドナー細胞は明らかにその様相を変化させていた。解剖学的な位置とその細胞形態から網膜アストロサイト様の特徴を有しており、宿主網膜の表層に生着したドナー細胞は網膜アストログリア細胞に分化したと考えられた (図 1)。



一方、網膜内層にも多数の GFP 陽性ドナー細胞を確認することが出来た。しかし、多くのドナー細胞は一塊となって観察され、それらの細胞形態はドナー細胞本来の大きな細胞体を有したままの状態、網膜移植後の形態学的変化は認められなかった。また、宿主網膜の表層で観察されたドナー細胞のような神経突起様の伸展も認めることは出来なかった (図 2)。



しかし、ごく一部のドナー細胞ではあるが、宿主網膜の外層に進入して生着した GFP 陽性ドナー細胞を確認することが出来た。その細胞は本来の解剖学的位置に視細胞外節様の構造を有し、神経突起様の突起をのびし外顆粒層（視細胞層）に小型の細胞体を持っていた。その細胞形態は視細胞に酷似していた。従って、この結果から移植したドナー細胞が視細胞様の細胞に分化した可能性を示唆された（図3）。



(NFL：神経線維層、ONL：外顆粒層（視細胞層）、RPE：網膜色素上皮層)

本研究の結果より、今回の研究でドナー細胞として用いた「網膜グリア細胞および脂肪細胞」は網膜外層よりも内層、特に表層に生着しやすい性質を有している事がわかった。また、宿主網膜表層に生着したドナー細胞の多くは網膜アストロサイト様の形態へと変化をしていた。このことから、今回用いた2つのドナー細胞は網膜神経系の細胞よりもグリア系の細胞へ分化しやすい傾向にある事が示唆された。一方、ごく一部のドナー細胞ではあるが、視細胞様の形態へと分化したドナー細胞も少認められた事から、網膜神経系の細胞への分化能も有している可能性が示唆された。今後、更なる研究を行うことで宿主網膜への生着効率および網膜細胞への分化効率を高めることが必要である。本

研究で使用した2つのドナー細胞「網膜グリア細胞および脂肪細胞」はこれからの研究の積み重ねにより、今後の網膜移植治療における「有用な新しいドナー細胞」になりえる可能性を十分に有していると細胞であると考えられた。そのためにも、継続した更なる研究が必要であると思われた。

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)

1、高宮央、脂肪細胞を用いた新しい網膜移植治療、旭川医大研究フォーラム、査読無、2010、87—89

2、南喜郎、石子智士、籠川浩、高宮央、吉田晃敏、黄斑部分離網膜に内層裂孔を観察した先天網膜分離症-OCT、3DOCTを用いた検討、査読有、眼科臨床医報、2010、919-922

3、Takahashi A, Yoshida A, Nagaoka T, Kagokawa H, Takamiya A他、Macular Hole Formation in Fellow Eyes With a Perifoveal Posterior Vitreous Detachment of Patients With a Unilateral Macular Hole、査読有、Am J Ophthalmol、2011、Epub ahead of print

〔学会発表〕(計4件)

1、Ishiko S, Sato E, Kagokawa, Takamiya A 他、Changes in Fundus Appearance Relate to the Area of the Off - central Aperture in the Scanning Laser Ophthalmoscope、ARVO Annual Meeting 2010. 5. 1 Fort Lauderdale, USA

2、佐藤栄一、高宮央 他、加齢黄斑変性患者におけるAugmentation Indexを用いた動脈硬化の検討、第64回日本臨床眼科学会、2010. 11. 11、神戸

3、籠川浩幸、高宮央 他、視力良好な滲出型加齢黄斑変性に対するranibizumab硝子体投与の短期成績、第49回日本網膜硝子体学会、2010. 11. 26、大阪

4、佐藤栄一、高宮央 他、Strict controlで悪化した糖尿病網膜症への対応、第49回日本網膜硝子体学会、2010. 11. 26、大阪

〔図書〕(計1件)

籠川浩幸、高宮央 他、中山書店、眼科診療クオリファイ、加齢黄斑変性：診断と治療の最先端、専門医のための眼科診療クオリファイ4、2011

〔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：特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高宮央 (TAKAMIYA AKIRA)
旭川医科大学・医学部・特任講師
研究者番号：50400114

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：