

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791676

研究課題名(和文)

網膜神経細胞再生を制御するメカニズムと毛様体扁平部の役割の解明

研究課題名(英文)

Regulatory mechanisms of neuronal regeneration in the retina and role of the pars plana.

研究代表者

西口 康二 (Nishiguchi Koji)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30447825

研究成果の概要(和文)：高濃度で存在する眼内液中のヘパラン硫酸は、血管内皮成長因子をはじめとする様々な成長因子やサイトカインとヘパリン結合ドメインを介して結合し、その生理活性を阻害する。その作用により、病的な網膜新生血管の硝子体内迷入が抑制されていることが判明した。さらに、眼内液中のヘパラン硫酸は、血管網を含めた正常な網膜組織の発達を制御している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The high concentration of heparan sulfate found in the intraocular fluid binds to various growth factors and cytokines including vascular endothelial growth factor through heparin-binding domain and thereby inhibits their physiological function. This mechanism proved to inhibit the aberrant invasion of pathological retinal vessels into the vitreous. Furthermore, intraocular heparan sulfate may regulate the development of retinal tissue including the vascular network.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,300,000 | 690,000   | 2,990,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 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：ヘパラン硫酸、血管内皮成長因子、糖尿病網膜症

## 1. 研究開始当初の背景

視力低下・失明の原因として網膜組織の不可逆的損傷・変化は重要である。特に網膜神経細胞がすでに失われてしまった場合、そのような病態に対する治療法が現在はない。それまでの研究で、発生の段階の正常マウスの毛様体扁平部では、視細胞を始めとする網膜神経細胞の分化が起こっていることを明らかにした。網膜視細胞の遺伝的異常により網膜

変性が起きるマウスでは、毛様体扁平部において、網膜神経細胞が組織形成後まで観察された。このような組織形成後の神経細胞が新生・分化する現象は、毛様体扁平部上皮にほぼ局限して起こった。従って、毛様体扁平部上皮が、網膜神経再生をもたらす特殊な環境を提供している可能性が示唆された。これまで、主に *in vitro* で報告されてきた再生神経系細胞の殆どが網膜神経細胞に特異的な形態的分化を伴わないものであった。こ

のような細胞をそのまま再生医療へ応用し、視機能回復を期待するのは無理があると考えられた。

一方、毛様体扁平部上皮で同定された杆体視細胞系や錐体視細胞系の細胞中には、視細胞に特徴的な内節・外節・神経突起などの構造を有する細胞が多数あった。この事実から、これらの細胞は、正常な視細胞への分化の過程にあると推定され、再生医療への応用という観点ではその研究価値は極めて高いと考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) 網膜組織形成後のマウスの毛様体扁平部において、網膜神経系の細胞の母体となる分裂可能な幹細胞の量と分布形態を解明する。

(2) 毛様体扁平部にある網膜神経系細胞の分化・増殖を制御する因子を特定し、その諸性質を解明する。正常な網膜の発達を制御するメカニズムを解明し、治療のターゲットなる分子を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 網膜組織形成後の毛様体上皮内における分裂能を有する網膜神経幹細胞の分布の解明

これまでの研究の結果から、網膜組織に障害がある状態では、毛様体扁平部に限って、網膜組織形成後も分裂細胞から網膜神経系細胞が新生することが確かめられている。しかし、これらの新生細胞を生み出すはずの分裂能を有する網膜神経幹細胞の存在部位やその分布は分っていない。H21年は、この問題を解明するために、下記のような実験を行った。

生後30日のマウスに、MNU (60 mg/kg) を投与することにより、網膜神経変性を誘発した。投与の1日、2日、3日あるいは7日後のいずれかの日に、BrdU (50mg/kg) を腹腔内注射し、分裂細胞をラベルした。さらに、その3時間、1日、あるいは1週間後のいずれかの時点で、眼球を採取し、BrdU、TUNEL、Pax6、Chx10 およびリカバリン陽性細胞の分布を、flat-mount および凍結切片で観察した。そのことにより、BrdU 陽性細胞と Pax6、Chx10 およびリカバリン陽性細胞の分布を、経時的に比較した。

### (2) 網膜組織分化へ与える因子の検討

本研究期間中に、ES細胞や ips 細胞を用いた網膜神経細胞の再生研究が急速に進展し

た。そのため、毛様体扁平部の網膜幹細胞の研究である本研究を計画どおり遂行する意義が薄れた。

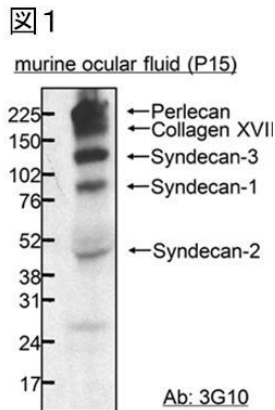
そこで、H22年度は②の検討項目に関連して、正常な網膜の発生を制御する因子について調べた。具体的には、網膜神経・血管の発達に影響を与えうる分子として、ヘパラン硫酸を始めとした眼内液中のグリコサミノグリカンの役割に着目した。まず、正常マウスを用いて、各日齢の眼内液中のヘパラン硫酸濃度をELISAで測定し、ウェスタンブロットを用いてそのコア蛋白の性質を調べた。ヘパラン硫酸を特異的に分解する酵素である heparanase III を発達段階のマウス眼内に注射し、その影響を検討した。生後7日齢から12日齢までの間、マウスを高濃度酸素負荷することにより病的な網膜血管の発達と網膜神経障害を来す高濃度酸素負荷マウスモデルを作成した。このモデルにおける、眼内ヘパラン硫酸濃度を測定し、内因性のヘパラン硫酸分解とヘパリンやヘパラン硫酸投与の影響を検討した。

網膜組織形成に重要な役割を果たす成長因子の一つである VEGF や黄斑変性への関与が示唆されている炎症性サイトカイン CCL2 とそのレセプターの結合に対するヘパリン、ヘパラン硫酸、眼内液の作用を *in vitro* で検討した。

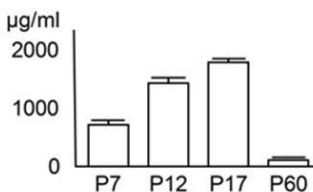
## 4. 研究成果

H21年度は、生後30日のマウスに、MNU投与し網膜変性を誘発した。そのマウスに BrdU を1日、2日、3日あるいは7日後に投与し、その3時間、1日、あるいは1週間後のいずれかの時点で、眼を組織学的に解析した。BrdU でラベルされた分裂細胞の数と分布は、いずれの時点で投与しても、いずれの時点で回収しても明らかな差はなかった。ラベルされた細胞の多くは毛様体皺壁部あるいは扁平部に存在した。その BrdU 陽性細胞中の神経幹細胞を同定するために抗 Pax6、Chx10 を抗体を用いて染色を行ったが、網膜表面の細胞が非特異的に染色され、信頼性のあるデータは得られなかった。リカバリン陽性細胞は毛様体上皮には非常に少なく、BrdU と共陽性の細胞はほとんどなかった。以上より、成体マウスにおける毛様体扁平部における神経再生現象は非常に限定的な役割を担っていることが予測された。

H22 年度は、生後 15 日齢のマウス眼内液を検体としてヘパラン硫酸のコアタンパクを検出する抗体でウェスタンブロットを行った。その結果、図 1 に示すように様々な種類のヘパラン硫酸が分泌されていることが明らかになった。さらに、眼内液中のヘパラン硫酸糖鎖濃度の変化を様々な日齢のマウスを用いて測定した (図 2)。

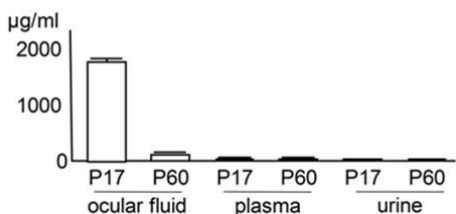


**図 2**



その結果、眼内液中のヘパラン硫酸濃度は、器官形成期の比較的若いマウスでは高く、逆に成体マウスでは低下することがわかった。次に、眼内液、血漿や尿を検体としてヘパラン硫酸濃度を比較した (図 3)。眼内液では、他の体液に比べてヘパラン硫酸濃度が非常に高かった。特に生後 17 日では、眼内液中のヘパラン硫酸は、尿中のそれに比べて 200 倍以上の濃度であった。

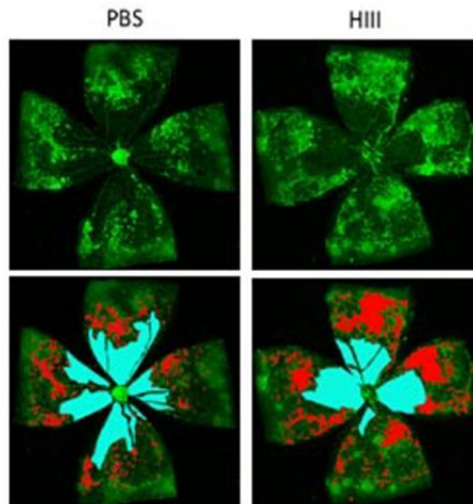
**図 3**



眼内のヘパラン硫酸の網膜組織形成における役割を調べるために heparanase III を生後 3 日齢および 5 日齢の正常マウスの眼内に投与し、3-5 日後回収した目を分析した。しかし、heparanase III 投与眼では、対照眼に比べて、明らかな差は認められなかった。次に、生後 7 日から 12 日まで 80%酸素にマウスを暴露した直後に、heparanase III を眼内投与した。すると、heparanase III 投与眼で

は、対照眼に比べて異常血管の発達が約 3 倍増加していた (図 4)。一方、同じ眼の血管でも、網膜内の生理的網膜血管は酵素投与の影響は受けなかった。heparanase III とヘパリンを同時に眼内に注射すると、heparanase III の効果は完全に中和された。

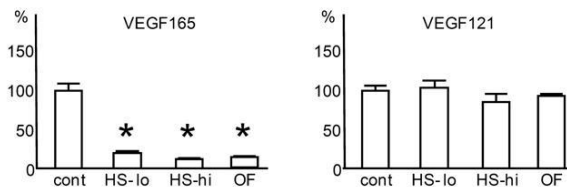
**図 4**



次にヘパリン結合蛋白で強力な血管新生作用を有する VEGF の濃度を heparanase III 投与眼で測定したが、対照眼に比べて差はなかった。

さらに、in vitro で VEGF、CCL2 とプレート表面にコーティングしたヘパリン及び VEGFR1、VEGFR2、CCR2 の結合に対する可溶性ヘパラン硫酸、眼内液の作用を検討した。ヘパラン硫酸、眼内液はともに VEGF と VEGFR2 の結合を阻害した (図 5)。一方 VEGF と VEGFR1 の結合に対しては影響を及ぼさなかった。また、ヘパラン硫酸、眼内液はともに CCL2 と CCR2 の結合を阻害した。

**図 5**



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件) 全て査読有り

1. Tomida D, Nishiguchi KM, Kataoka K, Yasuma TR, Iwata E, Uetani R, Kachi S, Terasaki H.

Suppression of choroidal neovascularization and quantitative and qualitative inhibition of VEGF and CCL2 by heparin.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 in press

2. Kataoka K, Nishiguchi KM, Kaneko H, van Rooijen N, Kachi S, Terasaki H.

The roles of vitreal macrophages and circulating leukocytes in retinal neovascularization.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52:1431-8

3. Yasuma TR, Nakamura M, Nishiguchi KM, Kikuchi M, Kaneko H, Niwa T, Hamajima N, Terasaki H

Elevated C-reactive protein levels and ARMS2/HTRA1 gene variants in subjects without age-related macular degeneration  
Mol Vis. 2010;16:2923-30

4. Nishiguchi KM, Kataoka K, Kachi S, Komeima K, Terasaki H

Regulation of pathologic retinal angiogenesis and inhibition of VEGF-VEGFR2 binding by soluble heparan sulfate.

PLoS ONE. 2010;5:e13493.

5. Nakamura M, Sanuki R, Yasuma TR, Onishi A, Nishiguchi KM, Koike C, Kadowaki M, Kondo M, Miyake Y, Furukawa T.

TRPM1 mutations are associated with the complete form of congenital stationary night blindness.

Mol Vis. 2010;16:425-37.

[学会発表] (計 2 件)

1. Nishiguchi KM Regulation of pathologic retinal angiogenesis in mice and inhibition of VEGF-VEGFR2 binding by soluble heparan sulfate.

ARVO (Ft. Lauderdale, FL, USA)

2010/5/2

2. 西口康二 グリコサミノグリカンによる病的網膜血管新生の抑制

第 14 回眼分子生物学研究会 (大阪)

2010/2/13

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ヘパリン結合性蛋白に対する生理活性阻害剤

発明者: 西口康二

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特許出願 2010-073967 号

出願年月日: 2010/3/29

国内外の別: 国内

○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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

西口 康二 (Nishiguchi Koji)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30447825

(2) 研究分担者 なし  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし  
( )

研究者番号: