

機関番号：17201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791691

研究課題名 (和文)

網膜色素上皮からの神経網膜細胞の再生

研究課題名 (英文)

Neurotization from dedifferentiated chick retinal pigment epithelium.

研究代表者

岩切 亮 ( IWAKIRI RYO )

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：30404130

研究成果の概要 (和文)：

ニワトリ胚から網膜色素上皮を単離し培養された培養網膜色素上皮細胞に対して、Mtif に対する siRNA を用いた脱分化の条件を検討した。異なる濃度の Mtif に対する siRNA を用いて検討を行ったが、 $\alpha\beta$ -Crystallin の発現を抑制することはできなかった。ニワトリ胚からの網膜色素上皮細胞の完全な脱分化には、Mtif 以外の発現抑制が必要と考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

To estimate suppression of Mitf by small interfering RNA induces dedifferentiation of chick embryonic retinal pigment epithelium at multiple conditions of siRNA concentrations. In every conditions of siRNA concentration, expression of  $\alpha\beta$ -Crystallin was not suppressed. To dedifferentiated chick retinal pigment epithelium completely, some factors could be needed to suppress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,900,000	570,000	2,470,000
22年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：網膜色素上皮、Mitf、bFGF、脱分化、神経網膜、再生

## 1. 研究開始当初の背景

眼科領域における難治性の疾患のひとつとして網膜色素変性症がある。広範に視細胞や網膜色素上皮の変性をともない、視機能障害をきたす遺伝性疾患である。これらに対する有効な治療法はまだ確立されていない。現在考えられている治療法として、遺伝子治療もあるが、網膜の変性が進行してしまった症

例に対しては無効である。また、加齢性黄斑変性症では網膜色素上皮の萎縮に伴い網膜下に新生増殖し中心視力の著しい低下をきたす。PDT治療により新生血管の退縮は期待できるが、後に残された神経網膜と網膜色素上皮の萎縮には現在有効な治療法がない。

これらの疾患の視機能回復には新たな神経網膜の供給が必要となる。視細胞移植、網

網膜色素上皮移植等の細胞源としては、網膜色素上皮細胞、胎児網膜細胞、ES細胞、毛様体細胞、虹彩色素上皮細胞等が考えられている。

網膜は10層の層構造からなっており、網膜色素上皮はその最外層に位置している。網膜血液関門の形成や視細胞のメンテナンス等、視機能維持に多くの役割を果たす重要な細胞である。また、神経網膜と同じ神経外胚葉由来の組織であり、その根源を同じくしている。

イモリにおいては眼球から外科的に水晶体と神経網膜を除去しても、網膜色素上皮が脱分化細胞となり分裂・増殖を繰り返し、最終的に整然とした層構造とシナプス形成、光受容器としての機能を伴った網膜、及び水晶体が再生されることが知られている (Saito T. et al. *Retinal Degeneration and Regeneration*. 165. 1996)。

この再生過程での神経細胞の発現順序は、他の多くの脊椎動物網膜の発生過程でも同様である。このことから、発生過程と再生過程における神経網膜細胞の分化にかかわる分子メカニズムは、その多くが共通していると考えられている。

イモリよりも高等な生物の場合、成熟した固体での網膜の再生はおこらないが、網膜色素上皮を単独に分離培養した系では、神経網膜細胞や水晶体細胞に分化転換する能力を持つことが知られている。この網膜色素上皮細胞の分化転換に関しては、ニワトリ胚網膜色素上皮細胞の培養転換系を使った研究により多くの知見が得られている。(Ito. Y et al. *Developmental Biology* 115.353-362. 1986、Nguyen. M et al. *Development* 127.

3581-3591. 2000、Mochii. M et al. *Developmental Biology* 193. 47-62. 1998)

ニワトリ胚から網膜色素上皮を単離し培養された培養網膜色素上皮細胞にbFGFを添加すると、脱分化(dedifferentiation)が誘導される。この細胞は接触増殖抑制能も失う。さらにbFGFを加えた培養を続けることで樹状突起を持った神経網膜細胞または、水晶体様構造を持つ水晶体細胞に分化転換(transdifferentiation)される。また、脱分化細胞からbFGFを除くと、色素を伴った網膜色素上皮へと再分化(redifferentiation)する。このbFGFによる分化転換能はヒトの網膜色素上皮でも確認されている。これらの細胞特性を示すマーカーとして、網膜色素上皮ではTyrosinase、MMP115(melanosomal matrix protein115)(分化した色素上皮のマーカー)、Pp344(網膜色素上皮特異的に発現するマーカー)、神経網膜ではChx10、neurofilament、MAP5、水晶体細胞では $\alpha$  $\beta$ -Crystallin等がある。脱分化細胞ではNeurofilamentや $\alpha$  $\beta$ -Crystallin等の発現は認めず、MMP115の発現は抑制されている。この網膜色素上皮の分化、脱分化の際に、Mitf(microphthalmia-associated transcription factor、網膜色素上皮細胞、メラノサイト、破骨細胞、肥満細胞の分化に関与している)とPax6(眼の発生初期に発現する転写因子で眼におけるマスターコントロール遺伝子とされており、神経網膜の分化時にも発現する)の発現は相補的な関係にある。またbFGFの添加による脱分化は網膜色素上皮細胞にMitfを過剰発現させることで抑制され、脱分化細胞にMitfを過剰発現させることで網膜色素上皮への再分化を誘導することがわかっている。

これを踏まえ、我々は、網膜色素上皮の脱

分化させるには、Mitf の抑制が重要な因子であると仮定し、RNA 干渉により網膜色素上皮の Mitf を抑制させ、脱分化細胞に導き、 $\alpha\beta$ -Crystallin の発現を認める水晶体細胞への分化転換を確認できた。(Iwakiri R et al: Experimental Eye Research. 81: 15-21, 2005.)

神経網膜の発生に関わる因子として otx2 が知られている。otx2 は神経網膜の伸展、増殖に関与するといわれており、脱分化細胞に過剰発現させることで神経網膜への分化転換へ導くことができるかもしれない。

## 2. 研究の目的

本研究の目標は、網膜色素上皮を脱分化細胞から神経細胞への分化転換を導く因子を解明し、確立することである。先に述べた分化転換系は主にニワトリ胚を用いた系であり、同様な遺伝子は哺乳類にも存在する。組織の操作性が高いニワトリ胚による神経細胞への分化転換系を確立し、生体ラットを用いた系への応用を検討している。

冒頭に述べたような網膜や網膜色素上皮の萎縮性疾患に対し、その治療には神経網膜や網膜色素上皮の供給が必要となる。神経網膜の細胞源を他の組織で行なった場合、組織の移植操作が必要となる。その結果、拒絶反応をはじめとした組織の炎症反応により、残存網膜細胞とのシナプス形成の大きな障害となりうる。

これに対し、網膜色素上皮は神経網膜直下に存在する細胞であり、既存の網膜色素上皮細胞を遺伝子操作によって神経網膜への分化転換がコントロールできるようになれば、移植操作に起因する諸問題は解決されると考えている。しかし、脱分化細胞となった網膜色素上皮は、多様な分化能と旺盛な増殖能を有しており、網膜下での瘢痕や増殖組織の形成につながる恐れがある。正確で強力な分化

転換系を確立することがこれらの有害事象をなくす唯一の手段である。

我々は、ニワトリ胚網膜色素上皮細胞を分離培養し、RNA 干渉により Mitf を抑制させ、脱分化細胞へ誘導し、 $\alpha\beta$ -Crystallin の発現を認める水晶体細胞への分化転換を確認した。(Iwakiri R et al: Experimental Eye Research. 81: 15-21, 2005.)。しかし、脱分化細胞から、いかにして目的の細胞へ分化転換を促すかについてはわかっていない。Otx2 は神経網膜の発達段階で多く発現している。このような遺伝子を脱分化細胞に過剰発現させることで神経網膜への分化転換を導くことができるかもしれない。本研究では Otx2 のような神経網膜の発達段階で多く発現している遺伝子を脱分化細胞に過剰発現させ神経網膜への分化転換を促すことを中間目標とする。神経網膜への分化転換系を確立したうえで、生体ラットの網膜色素上皮から神経網膜への分化転換を促すことを当面の最終目標とする。

## 3. 研究の方法

### 平成 21 年度

まず、ニワトリ胚網膜色素上皮細胞の分離培養系を用いて、RNA 干渉により Mitf を抑制させ、脱分化細胞へ誘導するための諸条件を再確認する。現時点では水晶体細胞への分化転換が起こってしまうので、安定した脱分化細胞を得るための条件を設定する (RNA 干渉を行う時期、試薬の量など)。

神経網膜への分化転換を導く因子として otx2 をはじめとしたいくつかの候補があるので、これらの遺伝子を組み込んだウイルスベクターを作成し、脱分化細胞に感染させ、過剰発現させる。その後の細胞を Chx10、neurofilament、MAP5 などの神経網膜に特異的なマーカーで免疫組織染色を行う。神経網膜への分化転換を確認できたら、Real time

RT-PCR とウエスタンブロッティングでそれぞれのベクターの効率を検討する。

この段階で我々が候補に挙げた遺伝子で神経網膜への分化転換を導けない場合は、目標遺伝子の再検索を行なう。つまり、ニワトリ胚網膜色素上皮細胞の培養液中に bFGF を添加し神経網膜への形質転換を促し、マイクロアレイで目標遺伝子の再検索を行なう。得られた新たな目標遺伝子を組み込んだウイルスベクターを作成し、上記の方法でより確実な標的因子とベクターの設定を行なう。

## 平成 22 年度

前年行なったニワトリ胚での系を参考にして、ラットの網膜色素上皮を分離培養し、ラットにおける網膜色素上皮の脱分化、形質転換系を確認する。ラット用のベクターを作成し形質転換の効率を確認する。

最終的には、生体ラットを用いて、網膜下に試薬を注入し、Mitf の RNA 干渉により網膜色素上皮を直接脱分化させ、ウイルスベクターで標的遺伝子の過剰発現を行ない、神経網膜への形質転換を促す。

ラットは高価であり、また、網膜色素上皮の分離が困難で他の細胞の混在によるバイアスが懸念される。本研究では最初はすでに実績のあるニワトリ胚を用いて、網膜色素上皮から神経網膜への形質転換を誘導する系の確立を目指す。神経網膜の発達において鳥類と哺乳類は同調する部分が多く、最初からラットを用いてスタートするよりも効率がよいと考えている。

## 4. 研究成果

ニワトリ胚網膜色素上皮細胞を分離培養し、RNA 干渉により Mitf を抑制させ、脱分化細胞へ誘導し、 $\alpha\beta$ -Crystallin の発現を認める水晶体細胞への分化転換を確認した条件を

元に、濃度等を調整して脱分化をより進める検討を行った。今回の検討においては RNA 干渉を行う、siRNA の濃度を倍量、2 倍量、3 倍量で検討を行った。それぞれの濃度において、回収した細胞における  $\alpha\beta$ -Crystallin の発現抑制の検討を行ったが、いずれの濃度においても  $\alpha\beta$ -Crystallin の発現を認めており、今回の検討においては、Mitf の RNA 干渉による、網膜色素上皮の脱分化においては濃度以外の要素があることが考えられた。一方で Mitf の RNA 干渉による網膜色素上皮細胞の水晶体細胞への分化転換は、比較的安定しており、他の抑制因子との併用により、完全な脱分化を引き起こす可能性が示唆された。

## 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 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：  
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

岩切 亮 (IWAKIRI RYO)  
佐賀大学・医学部・講師  
研究者番号：30404130

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：