

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15628

研究課題名(和文) ストレスによる眼内グリア細胞の分子的变化解明の試みと網膜変性疾患病態形成との関連

研究課題名(英文) Analysis of molecular basis of retinal glial cells and their roles in retinal degeneration diseases

研究代表者

渡邊 すみ子 (Watanabe, Sumiko)

東京大学・医科学研究所・特任教授

研究者番号：60240735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：視細胞、ミュラーグリア、マイクログリアを網膜から単離する手法を複数の表面抗原の組み合わせにより立ち上げた。正常、薬剤投与により網膜変性を誘導した網膜から、それぞれの細胞分画をセルソーターで精製し、RNA-seqを行った。変性時の、異なる細胞系列に特異的な遺伝子発現について明らかにした。さらに、視細胞変性後の時間軸に沿った遺伝子発現状態を各細胞系列ごとに検討し、細胞間の相互作用を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established technic to purify photoreceptor, Mueller glia, and microglia by using multiple cell surface antigens and a cell sorter. Then, these retinal subsets were purified from normal and photoreceptor-degenerated retina, and RNA-seq was performed using the fractions. Genes specifically up-regulated in each retinal subtype were identified by bio-informatics technics. Time course of gene expression was examined, and interaction of the subtypes through cytokines and chemokines during retinal degeneration was examined from the results.

研究分野：分子生物学 眼科学

キーワード：網膜 ミュラーグリア マイクログリア 変性 遺伝子発現 ヒストンメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経の病態の多くは加齢変化に伴い疾病の発症にいたるが、網膜も例外ではない。加齢性黄斑変性、糖尿病性網膜症、緑内障など、失明原因の上位をしめる網膜疾患の多くが加齢に従って発症し、病態が進展する。加齢、すなわちストレスの蓄積はホルモン分泌異常やサイトカイン濃度の変化として説明され、その病態への関与が多数報告されている。網膜疾患でも慢性的な炎症環境の病態発症への関与が近年議論されているが、末梢のシステミックなストレスによる炎症が、網膜内局所の炎症にいたる分子基盤についての解明は遅れている。

網膜は数種類に大別される神経細胞と、網膜色素上皮細胞、ミューラーグリア(MG)、マイクログリアといった非神経細胞で構成される。網膜変性疾患は、神経細胞の変性疾患で、神経変性のメカニズム研究とその保護、予防や治療への応用をめざした多数の研究が蓄積してきた。一方で、加齢によって引き起こされる中枢神経変性疾患のドライバーとしてマイクログリアの役割が指摘されている。マイクログリアは、加齢によって弱く活性化をうけ、ケモカイン、サイトカインを分泌し眼内局所の慢性炎症状態を起こすが、その慢性活性化のトリガーのメカニズムは不明である。我々は視細胞変性をタモキシフェンにより任意の時期に誘導できるマウスを樹立しその検討の過程で、MG、マイクログリアが短時間で活性化され「眼内グリアネットワーク」ともいべき相互作用により眼内炎症環境を変えていくことを観察している。一方で、我々は網膜の発生・維持におけるヒストンリジンメチル化の役割に注目し、H3K27me3が双極細胞の一部の成熟に必須で、さらに視細胞維持をはじめとした網膜の恒常性の維持に重要であり、その破綻が視細胞変性に至ることを見いだした。

## 2. 研究の目的

網膜を含む中枢神経の病態の多くは加齢変化に伴い疾病の発症にいたる。本研究では、網膜神経細胞変性病態について、神経細胞そのものを研究対象として治療戦略をたてるという従来の王道の戦略ではなく、加齢や全身のストレスが、眼内グリア細胞であるミューラーグリア、マイクログリアにヒストンメチ

ル化、遺伝子発現の変異として蓄積し、眼内炎症環境の変化をおこし、神経変性病態発症のドライバーとなる可能性を仮定し、これを検証し、分子変異を明らかにする事を目的とする。また、その過程でのミューラーグリア、マイクログリアの相互作用についても検討し、眼内グリア細胞ネットワークの神経変性病態発症での役割を解析する。本研究で期待される成果は、グリア細胞を標的とした、網膜変性疾患、さらには脳疾患の「予防薬」開発に繋がるのみならず、網膜変性疾患の最も早期の病態の指標となる事が期待され、早期診断、発症リスク予測に重要な情報を提供する事が期待される。

## 3. 研究の方法

ストレスモデルマウス、加齢マウス、あるいはこれらのマウスに網膜変性誘導薬剤を投与し、視細胞変性のオンセットと進展を野性型と比較する。同時に、ミューラーグリア、マイクログリアの数、増殖、形態、網膜内での位置を検討し、ストレス、加齢による変化の有無を検討する。ミューラーグリア、マイクログリアを正常、ストレス下、加齢マウスについて、視細胞変性を誘導する薬剤投与後に単離し、遺伝子発現パターンをRNA-seqで把握し、サイトカイン、シグナル、転写因子などを中心に特徴抽出を行う。その際、ミューラーグリア、マイクログリアの単離に適した表面抗原の探索をまず行う。ChIP-seqにより、ヒストン修飾に蓄積されるストレスの仮説の検証を行う。まずはミューラーグリア、マイクログリアの正常時、視細胞変性時のヒストン修飾を検討する。ミューラーグリア、マイクログリアの互いの機能連関を検討するために、それぞれを除去する薬剤をもちいて、*in vivo*でいずれかのグリア細胞を除去し、その上で、網膜変性誘導薬剤を投与し、他方のグリア細胞の増殖、形態、位置などの病理的検討、さらに遺伝子発現、ヒストン修飾の検討を行う。同時に視細胞変性のオンセット、進展について検討を加える。

## 4. 研究成果

まず入手できるストレスマウスについて網膜変性が起きているか検討を加えたが、網膜全体で検討したサイトカインの遺伝子発現レベルについては多少の差がコントロール

に比べて観察されたが、切片の免疫染色なども含む病理学的検討では網膜変性を示唆するような変化は観察されなかった。従って今回検討したマウスについては、網膜変性が自然発症する可能性は低いと考えられた。ストレスマウス、加齢マウスに網膜変性誘導薬剤を投与し、視細胞変性のオンセットと進展を検討したところ、ストレスマウスではサイトカインの発現に多少差があったが、個体差が大きく有意差のある一貫した傾向が観察されなかった。この検討は、より異なるストレスマウスを用いて再検討することを計画している。一方加齢マウスでは、ミュラーグリアの過剰活性化とマイクログリアの弱い活性化が観察された。加齢マウスについてはマウスが一年を過ぎると不安定で、これ以上の分子基盤の解析は困難であったため、まず、ミュラーグリア、マイクログリア特異的なRNA-seqを正常マウスと薬剤誘導性変性マウスで行った。視細胞、ミュラーグリア、マイクログリアを成熟マウスから単離する手法が確立していなかったため、様々な表面抗原を検討し、複数の表面抗原の組み合わせにより、視細胞、ミュラーグリア細胞、マイクログリア、その他の細胞に分離できる系を立ち上げた。これを用いて、正常マウス、薬剤(MNU)投与により網膜変性を誘導したマウスから、それぞれの細胞分画をセルソーターで精製し、RNA-seqを行った。この結果を解析し、変性時に、異なる細胞系列からどのようなサイトカイン/ケモカイン類が分泌されるのか？また特異的な遺伝子発現についてパイオインフォーマティクスの手法を用いて明らかにした。さらにこの情報に基づいて、視細胞変性後の時間軸に沿った遺伝子発現状態を各細胞系列ごとに検討し、細胞間のサイトカインなどを通じた相互の影響について検討している。ヒストン修飾について検討を加えるため、ミュラーグリアを単離してヒストンメチル化を検討することを行った。これについてはHes1-EGFPマウスを用いると、発生中の網膜からミュラーグリアを単離することが可能であることをまず確認し、続いて各種ヒストン修飾についてChIP-qPCRを行った。多数の遺伝子が、ミュラーグリア特異的なヒストン修飾を受けていることが明らかになり、これが網膜変性時にどのように変わっていくのか、さらに検討

を加えている。ChIP-seqを少量の細胞から行うことを同時に試みているが、十分量のサンプルを得ることができず、技術的な開発がまだ必要であると考えている。

さらにマイクログリアを除去する条件を様々に検討していたが、ある薬剤を混ぜたエサを作成しマウスに与えたところ、マイクログリアがほとんどすべて消失することが明らかになった。この時に薬剤投与により視細胞変性を起こし、視細胞、ミュラーグリアの挙動について検討を加えている。

## 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6件)

1. Ueno, T., Iwagawa, T., Ochiai, G., Koso, H., Nakauchi, H., Nagasaki, M., Suzuki, Y., Watanabe, S. (2017) Analysis of Muller glia specific genes and their histone modifications using Hes1-promoter driven EGFP expressing mouse. **Sci Rep**, in press
2. Koso, H., Tshako A., Lai, C. Y., Baba, Y., Otsu, M., Ueno, K., Nagasaki, M., Suzuki, Y., Watanabe, S. (2016) Conditional rod photoreceptor ablation reveals Sall1 as a microglial marker and regulator of microglial maturation, **Glia**, 64, 2005-2024
3. Ueno, K., Iwagawa, T., Kuribayashi, H., Baba, Y., Nakauchi, H., Murakami, A., Nagasaki, M., Suzuki, Y., Watanabe, S. (2016) Transition of differential histone H3 methylation in photoreceptors and other retinal cells during retinal differentiation, **Sci Rep**, 6, 29264

[学会発表](計11件)

2017年4月6日 招待講演:第121回日本眼科学会シンポジウム 網膜色素変性から学ぶこと 遺伝性網膜ジストロフィの疾患モデルの開発~病態解析と治療戦略の開発を目指して~

2016年9月25-29日 招待講演:Retinal Cell lineage specific modification of Histone H3 during retinal development, symposium "Retinal Neuroscience and Development" (RND), International Society of Eye Research (ISER), Tokyo

2016年6月2日 招待セミナー:Regulation of retinal differentiation by histone methylation SIMS, Soonchunhyang University, Korea

2016年6月1日招待セミナー：Roles of microglia during retinal degeneration, SIMS Soonchunhyang University, Korea

研究者番号：60240735

2016年4月11日 招待講演：「東北眼疾患病態研究会」網膜視細胞変性の分子基盤の解明を目指して—マイクログリアの役割とその治療標的としての可能性—東北大学長陵会館、仙台

2015年3月9日招待講演：順天堂眼アレルギー研究会、視細胞変性の分子基盤の解明を目指して、東京

2015年11月27日 招待講演：視細胞変性の病態メカニズムの理解と創薬をめざして、千葉メディカルセンター、千葉

2015年 Oct 29-30 招待講演：International Symposium on Allergy and Inflammation, Roles of microglia for progression of photoreceptor degeneration, Ooarai, Ibaraki

2015年10月2日 招待セミナー：視細胞変性におけるマイクログリアの役割とその治療標的としての可能性、長崎大学医歯薬学部、長崎

2015年9月5-6日招待講演：第35回眼薬理学会、視細胞変性におけるマイクログリアの役割とその治療標的としての可能性、モーニングセミナー、ソラシティカンファレンスセンター、東京

2015年 Feb 16-19 招待講演: Asia ARVO (The Association for research in vision and ophthalmology) 2015 meeting, Symposium "Epigenetics in ocular development and diseases), Yokohama

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 すみ子 (Watanabe Sumiko)  
東京大学・医科学研究所・特任教授