

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11323

研究課題名(和文) 失明疾患モデルにおけるグルタミン酸を用いた内在性幹細胞誘導による網膜再生法の確立

研究課題名(英文) Development of retinal regenerative therapy for blindness by inducing endogenous stem cells with glutamate

研究代表者

徳田 和央 (TOKUDA, Kazuhiro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50266863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：モデル動物の網膜組織において、休止している網膜幹細胞を、毒性の無い低濃度のグルタミン酸によって、誘導・活性化した。誘導時に特異的に発現するタンパク質群の解析結果から、誘導時には複数の因子によって代謝環境が制御され、エネルギー動態がリプログラミング(再構成)されることが示唆された。また、網膜組織から分離した細胞を用いて、同様に幹細胞誘導を行った。更に、失明疾患モデル動物においても、網膜内における細胞増殖制御のメカニズムを解明した。

一連の網膜幹細胞の形態評価に際し、既存の固定液では支障があり、網膜専用の固定液を新規に調製して使用した。この網膜固定液の有用性に関して、別途論文報告を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成体ラットの網膜には、休止している神経幹細胞が存在し、その内在性幹細胞は低濃度のグルタミン酸で誘導できることが明らかとなった。本研究で同定した幹細胞誘導時の特異的なタンパク質群および代謝動態を制御する因子を人為的に操作することで、効率的に内在性の網膜幹細胞が誘導出来る可能性が示唆された。

失明疾患に対する網膜再生医療が、細胞製剤を使用せず、自己の内在性神経幹細胞誘導で実現するという新たな可能性が示された。今後の研究継続により、低侵襲・低コストで効果が得られる新規の網膜治療法の確立と創薬(点眼薬や注射薬)への発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Retinal stem cells in the quiescent state were activated by glutamate at a non-toxic concentration in the matured ex vivo rat retina. By analysing the identified proteins which were up-regulated during stem cell induction, it was suggested that these proteins regulate cell cycle and metabolic state, leading to epigenetic and metabolic reprogramming during stem cell induction. The retinal stem cells were also induced from the primary cells of the mature rat retina and the cell properties were investigated. We further investigated the mechanism of retinal cell proliferation in the animal model of blindness. For accurate histomorphological evaluation of the retinal stem cells, we developed and reported a new fixative especially for the retinal tissues/cells.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜幹細胞 グルタミン酸 網膜再生 失明 タンパク質 酵素 代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、本邦の失明者の過半数は、加齢黄斑変性や緑内障など、神経細胞死による視機能障害によるものである。これらの疾患に対し、現時点で有効な治療はなく、網膜再生による治療法の開発が喫緊の課題である。加齢黄斑変性などの疾患では、外科的治療や分子標的治療の進歩により、網膜の広範な構造破壊は回避できるようになってきているものの、黄斑部における神経細胞の障害により失明している症例が多数存在する。こうした症例には、網膜の再構築をするのではなく、喪失した神経細胞を再生させ補填する治療方法が有用と考えられる。また、緑内障は網膜神経節細胞の消失が原因であるが、直径 1.5mm の黄斑部 (全網膜の数%) の神経節細胞のみ再生することが出来れば、視力が改善されると推察される。すなわち、広範な構造破壊を伴わない失明疾患の場合、黄斑部位の障害された網膜の細胞のみを再生すれば、著明な視力改善が期待できる。この着想を実現するため、具体的な研究方法を検討した。

哺乳類では、網膜神経細胞は再生しないと長らく考えられてきた。しかし、近年、成体網膜内に休止している網膜幹細胞の存在が明らかになった (Tropepe *et al.*, Science, 2000)。我々は、成体ラット網膜において、低濃度のグルタミン酸が、組織障害を生じる事なく網膜幹細胞を誘導することを報告した。誘導した幹細胞はミューラー細胞マーカーと共同在を示したため、本幹細胞はミューラー細胞由来と考えられた。この結果により、グルタミン酸を用いて内在性の網膜幹細胞誘導により網膜を再生させるという着想に至った。

2. 研究の目的

本邦の視覚障害者は約 164 万人、失明者は約 19 万人であり、今後更なる増加が予想されている。失明原因疾患の過半数は網膜神経細胞死によるが、現在のところ有効な治療法はなく、網膜再生による治療法の開発が急務である。我々は、成体ラット網膜の内在性網膜幹細胞を低濃度のグルタミン酸で誘導することに成功し、誘導に関与する 3 種類のタンパク質を同定して報告した。この研究を基盤として、(1)幹細胞遊走と(2)幹細胞数の増加、(3)神経細胞への分化誘導、(4)幹細胞誘導と分化に関与するタンパク質の機能、に関する解析を行う。更に、(5)失明疾患モデルにおいて内在性網膜幹細胞誘導による網膜再生法を確立する。

3. 研究の方法

グルタミン酸を用いた内在性網膜幹細胞誘導による網膜再生法の確立を目指し、以下を行う。

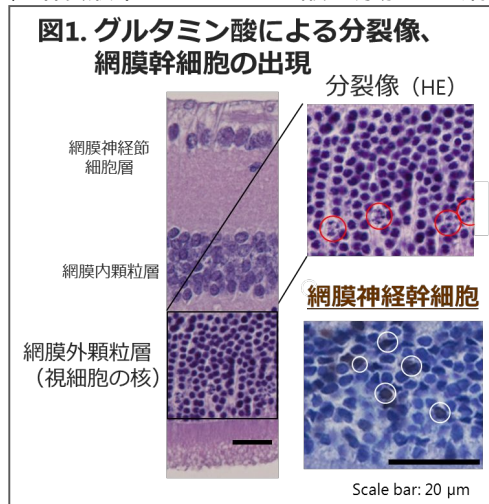
- (1)ミューラー細胞の遊走及び走化因子の検討
- (2)誘導する内在性網膜幹細胞数の増加法の検討
- (3)網膜神経細胞への分化の確認と特異的タンパク質の同定
- (4)幹細胞誘導及び神経細胞分化に関与するタンパク質の機能解析
- (5)失明疾患モデルでの網膜再生法の確立

4. 研究成果

成体ラットから分離した感覚網膜の組織培養を行い、培養液中にグルタミン酸を添加して網膜内に分裂細胞、神経幹細胞を誘導した(右、図 1)。対照群とグルタミン酸投与群の網膜からタンパク質を抽出して、プロテオーム解析を行い、誘導時に特異的に発現が上昇するタンパク質群を報告した。

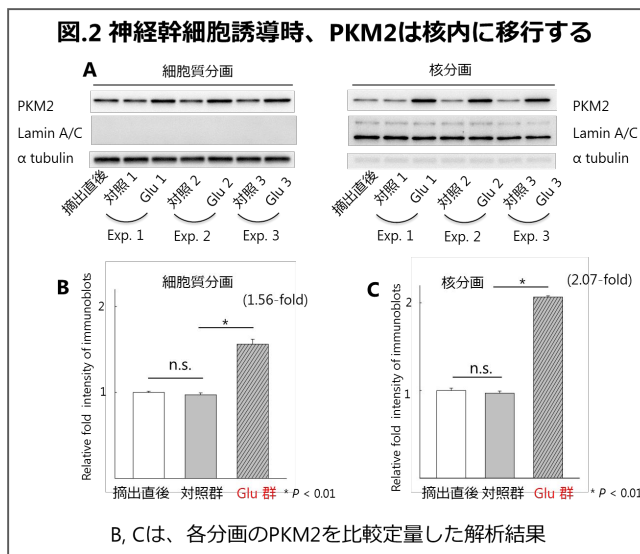
分化した神経細胞と比較して、神経幹細胞では糖質や核酸などの代謝が亢進することが報告されているため、幹細胞誘導時における代謝動態のダイナミズムを解析した。その結果、網膜幹細胞誘導時には、解糖系律速酵素の一つであるピルビン酸キナーゼ (PK) を含む複数の酵素が上昇していた。PK のアイソフォームの内、特に乳酸を増加させる M2 型 (PKM2) の発現が上昇し、実際に網膜内の乳酸も増加していた。更に、PKM2 の細胞内局在について解析をすすめ、網膜幹細胞誘導時には PKM2 が細胞質内から核内に移行することを明らかにした(次頁、図 2)。核内に移行した PKM2 は細胞増殖に関与する転写因子を促進することが報告されており、PKM2 が内在性網膜幹細胞誘導における幹細胞の増殖に関与している可能性が考えられた。

解糖系以外のエネルギー代謝動態についても検討し、幹細胞誘導時には、他の経路においても特有の酵素群の発現が変化することを明らかにした。エネルギー代謝全体を制御する因子の内、制御の上流に位置する候補を見つけており、この因子は前述の酵素である PKM2 と相互作用があることが確認出来ている。これらの結果は、論文として投稿し、現在 revise 中である。



一方、成熟ラット網膜から細胞を単離・継代するシステムを構築し、このシステムを用いて幹細胞誘導を行った。誘導した細胞において、遊走性・走化性を確認し、chemoattractant等の解析を行っている。更に、誘導する内在性網膜幹細胞数の増加法の検討においては、我々が保有する chemical compound において作用を有する候補があり、現在検討をすすめている。

失明疾患モデル動物における網膜再生法の検討については、加齢黄斑変性モデル動物を用いて実験を進めた。加齢黄斑変性モデルにおいて、網膜色素上皮の炎症や上皮間葉移行のメカニズムを解明し、報告した。



本研究における一連の神経幹細胞誘導時の網膜細胞・組織の評価に際し、既存の固定液を用いた網膜の固定では、核内微細構造が不明瞭で、神経細胞体や神経突起の腫脹を生じ、正確な対象評価が困難であった。そこで、網膜の形態学的評価に適切な固定液を新規に調製し、報告を行った（前頁、図1は、新規固定液を用いた網膜像）。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Kuhara K, Tokuda K, Kitagawa T, Baron B, Tokunaga M, Harada K, Terasaki M, Uehara O, Ohta T, Takai R, Hamada JI, Kobayashi M, Shimo T, Nagayasu H, Kuramitsu Y: CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) is down-regulated by active hexose-correlated compound in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 38(11): 6107-6111, 2018. 査読有

DOI : 10.21873/anticancer.12961

Shimada T, Nanimoto Y, Baron B, Kitagawa T, Tokuda K, Kuramitsu Y: Enzyme treated asparagus extract down-regulates heat shock protein 27 of pancreatic cancer cells. *In Vivo* 32(4): 759-763, 2018. 査読有

DOI : 10.21873/invivo.11305

Tokuda K, Baron B, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Tokuda N, Morishige N, Kobayashi M, Kimura K, Nakamura K, Sonoda KH: Optimization of fixative solution for retinal morphology: a comparison with Davidson 's fixative and other fixation solutions. *Jpn J Ophthalmol* 62(4): 481-490, 2018. 査読有

DOI : 10.1007/s10384-018-0592-7

Wang Y, Kuramitsu Y, Baron B, Kitagawa T, Tokuda K, Akada J, Maehara SI, Maehara Y, Nakamura K: PI3K inhibitor LY294002, as opposed to wortmannin, enhances AKT phosphorylation in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 50(2): 606-612, 2017. 査読有

DOI : 10.3892/ijo.2016.3804

Tokuda K, Kuramitsu Y, Baron B, Kitagawa T, Tokuda N, Kobayashi M, Kimura K, Sonoda KH, Nakamura K: Changes in metabolic proteins in ex vivo rat retina during glutamate-induced neural progenitor cell induction. *Mol Cell Biochem* 419(1-2): 177-184, 2016. 査読有

DOI : 10.1007/s11010-016-2769-z

〔学会発表〕(計17件)

徳田 和央: グルタミン酸を用いた神経前駆細胞誘導時における、ラット ex vivo 網膜内の代謝系タンパク質の動態変化. 第132回山口県眼科医会秋季総会, 山口県(翠山荘), 2018/11/18

Kobayashi Y, Orita T, Yamashiro C, Uchi-SH, Hatano M, Kobayashi M, Tokuda K, Yanai R, Takeda A, Ishibashi T, Sonoda KH, Kimura K: Inhibitional effect of TGF- β 2-induced EMT in RPE cells by an RAR- α agonist. ARVO 2018, USA (Hawaii), 2018/05/02

Ezaki T, Sagawa H, Tokuda N, Tokuda K, Yamashiro C, Kimura K, Owada Y: Induction of lymphangiomas by Freund 's Incomplete Adjuvant (FIA) in fatty acid binding protein (FABP)-3, 5 and 7 knock-out mice. *Experimental Biology* 2018, USA (San Diego), 2018/04/21

小林 正明, 徳田 和央, 小林 由佳, 山城 知恵美, 内 翔平, 波多野 誠, 木村 和

博：MRTF 阻害剤を用いた網膜色素上皮細胞による繊維性増殖の抑制．第 122 回日本眼科学会総会，大阪府（大阪国際会議場），2018/04/19

徳田 和央，Baron B，藏満 保宏，山城 知恵美，小林 正明，内 翔平，波多野 誠，徳田 信子，木村 和博：網膜組織の解剖学的評価に最適な新規固定液．第 122 回日本眼科学会総会，大阪府（大阪国際会議場），2018/04/19

寺西 慎一郎，徳田 和央，山城 知恵美，小林 由佳，守田 裕希子，永井 智彦，山田 直之，鈴木 克佳，木村 和博：点眼防腐剤によるテノン囊線維芽細胞の細胞毒性に対する角膜上皮細胞の抑制作用．第 122 回日本眼科学会総会，大阪府（大阪国際会議場），2018/04/19

徳田 和央：ラット ex vivo 網膜におけるグルタミン酸での神経前駆細胞誘導時の DRP-3 long isoform 発現増強について．2018 年度向月会総会，山口県（霜仁会館），2018/04/08

徳田 信子，山本 由似，児玉 孝憲，徳田 和央，木村 和博，坂東 康彦，天野 修，大和田 祐二：Fibroblastic Reticular Cells (FRC) における FABP7 の局在と機能．第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会，東京都（日本医科大学），2018/03/28

徳田 和央：眼科疾患とストレス適応．第 6 回難治性疾患トランスレーションセミナー「ゲノム解析を基盤とするがんと老化関連疾患の病態解明」，山口県（霜仁会館），2018/03/16

野田 健，折田 朋子，緒方 惟彦，吉本 拓矢，湧田 真紀子，徳田 和央，柳井 亮二，木村 和博：IgA 腎症に伴って網膜色素上皮障害をきたした 1 例．第 56 回日本網膜硝子体学会総会，東京都（東京国際フォーラム），2017/12/02

西本 綾奈，山城 知恵美，小林 由佳，内 翔平，小林 正明，波多野 誠，折田 朋子，徳田 和央，高橋 真紀子，高畠 隆，山内 一彦，内野 英治，木村 和博：フレーム間差分法を用いた硝子体混濁の定量化の検討．第 56 回日本網膜硝子体学会総会，東京都（東京国際フォーラム），2017/12/02

Tokuda K, Kuramitsu Y, Baron B, Teranishi S, Tokuda N, Kimura K: AHCC inhibits TGF- β -induced EMT in ARPE-19. 25th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine, 北海道（ロイトン札幌），2017/07/08

寺西 慎一郎，徳田 和央，徳久 佳代子，白石 理江，守田 裕希子，山田 直之，木村 和博，徳田 信子，鈴木 克佳：点眼防腐剤によるテノン囊線維芽細胞の角膜上皮細胞との共培養時における筋線維芽細胞への転換．第 129 回山口県眼科医会春季総会及び集談会，山口県（翠山荘），2017/05/28

小林 正明，内 翔平，波多野 誠，徳田 和央，柳井 亮二，木村 和博：網膜色素上皮細胞における IL-1 を介した無菌性炎症．第 121 回日本眼科学会総会，東京都（東京国際フォーラム），2017/04/07

波多野 誠，折田 朋子，徳田 和央，柳井 亮二，武田 篤信，石橋 達朗，園田 康平，木村 和博：RAR α アゴニストによる網膜色素上皮細胞の上皮間葉転換の抑制．第 121 回日本眼科学会総会，東京都（東京国際フォーラム），2017/04/07

徳田 和央，藏満 保宏，小林 正明，徳田 信子，寺西 慎一郎，木村 和博：グルタミン酸による網膜前駆細胞誘導時にペントースリン酸経路は亢進する．第 121 回日本眼科学会総会，東京都（東京国際フォーラム），2017/04/06

寺西 慎一郎，徳田 和央，徳久 佳代子，白石 理江，守田 裕希子，徳田 信子，山田 直之，鈴木 克佳，木村 和博：点眼防腐剤によるテノン囊線維芽細胞の角膜上皮細胞との共培養時における上皮間葉転換．第 121 回日本眼科学会総会，東京都（東京国際フォーラム），2017/04/06

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：園田 康平

ローマ字氏名：SONODA, Kohei

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：教授

研究者番号（8桁）：10294943

研究分担者氏名：藏満 保宏

ローマ字氏名：KURAMITSU, Yasuhiro

所属研究機関名：北海道医療大学

部局名：その他

職名：教授

研究者番号（8桁）：50281811

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。