

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592049

研究課題名（和文） 網膜幹細胞の維持に関わる細胞間相互作用とその分子シグナルの解明

研究課題名（英文） The study for cell-cell interaction and molecular signals about maintenance of retina stem cell

研究代表者

福島 美紀子（FUKUSHIMA MIKIKO）

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：10284770

研究成果の概要（和文）：網膜再生治療の臨床応用に向けた基礎研究として網膜組織幹細胞の分化、増殖に関わる分子の探索を、ノックアウトマウスを用いて解析した。網膜幹細胞の維持にはヘパラン硫酸プロテオグリカンが関与していること、分化に関しては gp130 を介した分子シグナルが関わっていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The retinal tissue progenitor cell was analyzed as a basic research for the clinical application of the retina regeneration therapy. The search for the molecule was related to proliferation and differentiation of the retinal progenitor cell, and was analyzed by using the knockout mouse. Then it was clarified to the maintenance of the retinal progenitor cell of the role of the heparan sulfate proteoglycan, and relations of the molecular signal through gp130 for the differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,600,000	480,000	2,080,000
21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
22年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：再生医学、細胞・組織、神経科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症は本邦の失明原因の上位にあり、患者数は増加の一途にある。既に重篤な状態に陥り、機能喪失した網膜疾患に対する有効な治療法は現時点ではない。

(2) 難治網膜疾患に対する新たな治療戦略のひとつとして、幹細胞網膜移植が試みられている。成体眼内に網膜組織幹細胞が発見され、拒絶反応を回避できる移植細胞源として注目されている。

2. 研究の目的

網膜幹細胞の分化増殖能に影響を与える眼内因子の探索を行ない、疾患モデル、傷害網膜での網膜再生に関わる分子メカニズムを明らかにすることで、網膜再生の制御機構を細胞分子レベルで解明する。

3. 研究の方法

(1) 網膜幹細胞単離法の確立

① sphere assay による単離
発生過程の終脳から細胞を単離して EGF, FGF 下で浮遊培養すると神経幹細胞が細胞塊 (sphere) として得られる。この sphere assay

法により、胎生マウス網膜、成体マウス毛様体組織 から網膜幹細胞を単離する。

② Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) を用いた side population(SP)細胞の単離

幹細胞が Hoechst 33342 で低染色性であることから、Hoechst33342 で染色後、FACS で二次元展開して得られる SP (Side Population) 細胞の獲得をマウス胎仔網膜、成体毛様体で行う。

(2) 幹細胞の分化・増殖に影響を与える眼内因子の探索

① ノックアウトマウスを用いた解析

ヘパラン硫酸プロテオグリカンが幹細胞の増殖維持に関わる分子であることが示唆されている。発生過程の網膜神経細胞特異的に Ext-1 をノックアウトされる Ext-1 コンディショナルノックアウトマウス(dickkopf homolog 3(Dkk3)-Cre;exostosin

(Ext1)^{flox/flox} から、網膜幹細胞を単離し、増殖能について sphere assay、FACS による SP 細胞の単離を行なう。また発生過程の網膜分化について免疫染色を行い分化への影響について組織学的に検討する。さらに発生過程における軸索成長について組織学的検討と網膜切片を器官培養し、Netrin-1、Slit-2 に対する各軸索誘導因子に対する反応をみる。同様に Homeodomain-interacting protein kinase (HIPK) 分子についてノックアウトマウスの網膜発生過程を組織学的に検討する。

② グリア分化に関する転写制御因子の解析 神経幹細胞において bone morphogenetic protein(BMP)、leukemia inhibitory factor(LIF)の2分子はグリア分化に関わる分子であることが明らかにされている。LIF のレセプターである gp130 ノックアウトマウスについて発生過程の網膜内グリアの分化を組織学的手法で解析し、gp130 が網膜内のグリア分化に影響しているかを観る。また網膜幹細胞における LIF、BMP これらの分子の影響について検討するために胎仔マウス網膜より得られた網膜幹細胞を用いリシフェラーゼアッセイを用いた GFAP プロモータ解析、網膜切片をサイトカイン添加下で器官培養し、組織学的解析を行なう。

4. 研究成果

(1) 網膜幹細胞単離法の確立

① sphere assay による単離

マウス胎仔終脳から sphere assay にて神経幹細胞を単離する同様の方法を用いて成熟マウス毛様体組織より網膜幹細胞の単離を行なった。得られた細胞塊より 2 次 sphere の形成ならびに網膜特異的の神経マーカーであるロドプシン陽性細胞への分化が認められ、組織網膜幹細胞の能力を有する細胞の存在が確認された。

② Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) を用いた side population(SP)細胞の単離

FACS で二次元展開して得られる side population (SP) 細胞の獲得をマウス胎仔網膜、成体毛様体で試みた。マウス胎生 16 日網膜では SP 細胞が同定された (図 1)。

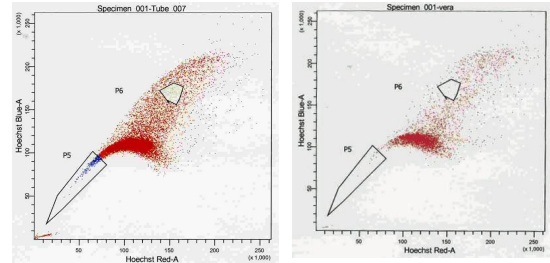


図 1 マウス E16 網膜の SP 細胞

(2) 幹細胞の維持・分化に関わる分子の探索

① Ext-1 コンディショナルノックアウトマウス(Dkk3-Cre;Ext1^{flox/flox}) 胎生 18 日網膜にて、網膜幹細胞の単離を行なった。Wild type と比較して Dkk3-Cre;Ext1^{flox/flox} では sphere assay、SP 細胞ともに網膜幹細胞数は著明に減少する傾向が認められ、ヘパラン硫酸が網膜幹細胞の維持、増殖に関与する分子であることが示唆された。発生過程の網膜における免疫組織学的検討では Dkk3-Cre;Ext1^{flox/flox} では網膜特異的ニューロンへの分化に異常は認められなかった。網膜層構造の異常、軸索伸長の異常が観察された (図 2)。HIPK KO では網膜発生過程において異常が認められた。

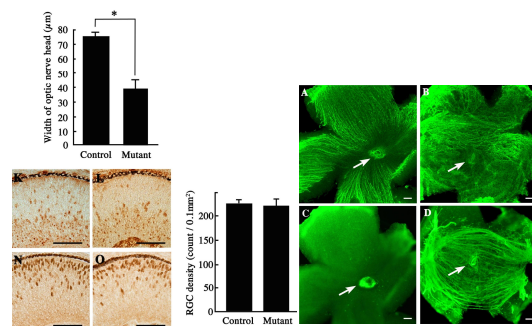


図 2 Dkk3-Cre;Ext1^{flox/flox}E13 網膜における神経節細胞の軸索進展

② グリア分化に関する転写制御因子の解析

gp130 KO では P O 網膜において GFAP 陽性アストロサイトの数は wild type に比較して減少しており、gp130 KO ではグリア分化が抑制されることが判った。発生過程の網膜においてアストロサイトの分化には gp130 を介したシグナルが関与していることが明らかになった (図 3)。

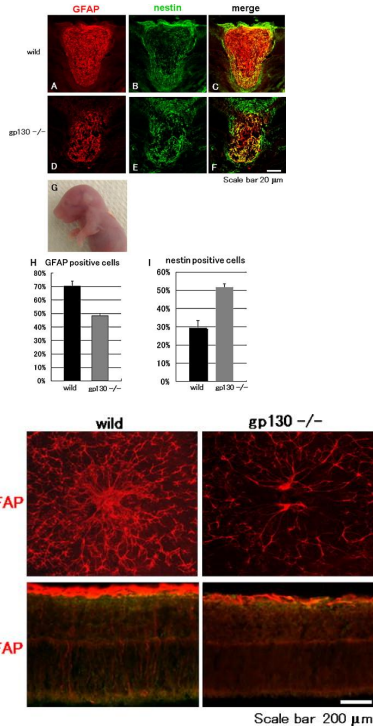


図3 gp130 KO P0網膜でのGFAP陽性細胞

マウス E18 網膜を分離し、sphere assay を行い、網膜前駆細胞を単離した。胎仔終脳由来神経幹細胞にてアストロサイトへの分化促進効果が明らかにされている BMP、LIF 添加下で網膜前駆細胞の培養を行い、アストロサイトへの分化の影響をみたところ、神経幹細胞と同様のグリア分化促進効果が認められた。さらに GFAP プロモータアッセイにて BMP と LIF のグリア分化誘導効果が相乗的であることが明らかになった (図4)。網膜前駆細胞においても神経幹細胞と同様の LIF、BMP のグリア分化誘導効果が認められた。

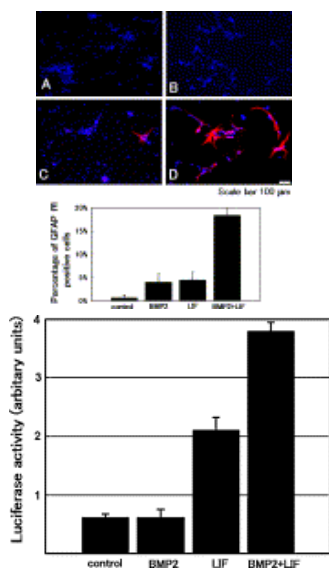


図4 網膜前駆細胞における分化誘導効果

以上の実験が網膜幹細胞の増殖維持にはヘパラン硫酸プロテオグリカンが関与していることが示唆された。また神経幹細胞で観察される効果と同様の、LIF、BMP のグリア分化への影響が明らかにされ、網膜幹細胞のグリア分化に関して gp130 を介した分子シグナルが関わっていることが明らかになった。

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 5 件)

- ① Takihara Y, Inatani M, Hayashi H, Adachi N, Iwao K, Inoue T, Iwao M, Tanihara H. Dynamic imaging of axonal transport in living retinal ganglion cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52: 3039-45, 2011.
- ② Hara R, Inomata Y, Kawaji T, Sagara N, Inatani M, Fukushima M, Tanihara H. Suppression of choroidal neovascularization by N-acetyl-cysteine in mice. *Curr Eye Res.* 35: 1012-20, 2010.
- ③ Inoue T, Kagawa T, Inoue-Mochita M, Isono K, Ohtsu N, Nobuhisa I, Fukushima M, Tanihara H, Taga T. Involvement of the Hipk family in regulation of eyeball size, lens formation and retinal morphogenesis. *FEBS Lett.* 2010 584:3233-8, 2010.
- ④ Fukushima M, Setoguchi T, Komiya S, Tanihara H, Taga T. Retinal astrocyte differentiation mediated by leukemia inhibitory factor in cooperation with bone morphogenetic protein 2. *Int J Dev Neurosci.* 27: 685-90, 2009.
- ⑤ Inomata Y, Fukushima M, Hara R, Takahashi E, Honjo M, Koga T, Kawaji T, Satoh H, Takeya M, Sawamura T, Tanihara H. Suppression of choroidal neovascularization in lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor type 1-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50: 3970-6, 2009.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Inatani M. Heparan sulfate: the key regulator of optic nerve guidance. Nakajima Award Lecture APSEG-molecular pathology I. APAO AAO Joint congress 2009. May 16, 2009, Bali.

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 美紀子 (FUKUSHIMA MIKIKO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：10284770

(2) 研究分担者

稲谷 大 (INATANI MASARU)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40335245
行徳 雄二 (GYOUTOKU YUJI)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10420639

(3) 連携研究者

井上 俊洋 (INOUE TOSHIHIRO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：00317025

(4) 研究協力者

井上 みゆき (INOUE MIYUKI)
熊本大学・大学院自然科学研究科・
グローバル COE リサーチアソシエイト