

平成 22 年 4 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791257

研究課題名（和文）正常眼圧緑内障モデル、網膜特異的 BDNF および cfos ノックアウトマウスの解析

研究課題名（英文）Normal tension glaucoma model: Characterization of retinal neuron specific BDNF and cfos knockout

研究代表者

小林 剛（KOBAYASHI TAKESHI）

愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：70380285

研究成果の概要（和文）：網膜組織特異的脳由来神経栄養因子ノックアウトマウスと網膜組織特異的 cfos ノックアウトマウスの網膜神経節細胞の変化を検討した。網膜組織特異的脳由来神経栄養因子ノックアウトマウスの場合、神経節細胞数は網膜周辺部より減少した。網膜組織特異的 cfos ノックアウトマウスの網膜神経節細胞の減少は網膜組織特異的脳由来神経栄養因子ノックアウトより速かった。網膜組織特異的 cfos ノックアウトマウスの網膜神経では網膜組織特異的脳由来神経栄養因子が発現していなかった。cfos はマウス網膜において、網膜組織特異的脳由来神経栄養因子を含む他の神経保護因子の上流に存在すると考えられる。正常眼圧緑内障の予防には神経保護の転写因子の検討が必要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Retinal neuron specific (Brain-derived neurotrophic factor) BDNF and cfos knockout were studied to characterize the phenotypical change in retinal ganglion cells (RGC). In BDNF knockout, RGC gradually decrease from peripheral portion of retina by aging. Reduction ratio of RGC in cfos knockout was higher than that of RGC in BDNF knockout. Neural retina of cfos knockout did not express mBdnf. It suggest cfos is upstream of BDNF and other neuroprotective factor in the mouse retina. For preventing normal tension glaucoma, neuroprotective transcription factor should be analyzed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：緑内障、正常眼圧、網膜、脳由来神経栄養因子、cfos、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

緑内障は我が国における中途失明原因の第

1位であるが、人口の高齢化により、今後さらに増加することが予想される。最近の疫

学調査によれば、40歳以上の17人に1人が緑内障であり、その半分以上を正常眼圧緑内障が占めることが我が国の大きな特徴である。よって正常眼圧緑内障の病態を解明し、長期的な治療戦略を確立することは日本における高齢者の生活の質の向上に繋がることとなる。しかしながら、現在までのところ、緑内障治療に結びつく明かなエビデンスは眼圧を下降させること以外にはないが、これだけでは正常眼圧緑内障に対応することは困難であり、その病態を解析するための何らかの実験動物モデルが模索されていた。BDNFは脳より発見された神経活性因子で網膜にも存在しNGF、NT-3とともに最も網膜神経節細胞のアポトーシスを抑制する因子として注目されている。しかもBDNFは現在、正常眼圧緑内障の原因遺伝子の最有力候補とも考えられている。我々は、角膜実質のケラトサイト特異的なノックアウトを作成する目的で28系統のkeratocan promoter Cre mouseを作成したが、偶然その1つに神経網膜に生直後よりCreを発現する系統を発見し、これをKC1と命名した。今、このKC1と目的の遺伝子をloxP elementで挟んだmouse (floxed mouse)とを交配すると、網膜特異的に目的の遺伝子をノックアウトしたマウスが得られる。このstrategyに沿って、今回、我々は網膜特異的BDNFノックアウトと網膜特異的cfosノックアウトを作成し、それらのマウスに正常眼圧緑内障に極めて類似した病態が観察されることを見いだした。

2 . 研究の目的

網膜特異的 BDNF ノックアウトと網膜特異的 cfos ノックアウトを用いて網膜における BDNF および cfos の役割を詳細に検討し正常眼圧緑内障の治療に役立てる。

3 . 研究の方法

(1) KC1遺伝子の発現の検討

胎生期KC1遺伝子の発現を全身で確認するため、KC1雄とCre reporter mouse : ROSA-LacZ^{f/f} (Cre発現細胞をlacZ染色で確認できる)雌のtime-matingを行い、胎児(KC1/ROSA-LacZ^{f/w})を得た。これらの胎児をlacZ fix (0.2% glutaraldehyde、50mM EGTA、100mM MgCl₂、100mM sodium phosphate、pH 7.3、4)で7日間固定し、lacZ staining (0.5 mg/ml X-gal、5 mM potassium ferrocyanide、5 mM potassium ferricyanide、2 mM MgCl₂、0.01% sodium deoxycholate、0.02% Nonidet-P40、100 mM sodium phosphate、pH 7.3)で12時間染色し、実体顕微鏡で観察した。KC1遺伝子の成体の神経系における発現を確認するため、生後700日目までのKC1/ROSA-LacZ^{f/w} lacZ fixで経心臓灌流固定を行い、7日間後固定後、脳と眼組織を採取した。脳は30% Sucrose添加lacZ fixで2日間浸漬した後、凍結切片を作成した。(一般的にlacZ stainingに対する組織固定は短時間で行われることが多い。これは固定によりβ-Galactosidaseの活性が低下していくと考えられているためであるが、我々が用いているlacZ fixでは4ヶ月保存していても染色性に変化が見られないことを確認している。固定時間が短いと組織が崩れやすく、組織の観察に支障を来す。)脳の凍結切片をlacZ staining solution (2 mM MgCl₂、0.01% sodium deoxycholate、0.02% Nonidet-P40 (NP-40)、0.5 mg/ml X-gal、5 mM potassium ferrocyanide、5 mM potassium ferricyanide、100 mM sodium phosphate、pH 7.3)で1時間染色し、光学顕微鏡で観察した。眼球のlacZ stainingではwhole eyeでlacZ staining solutionを4で12時間反応させた後に、実体顕微鏡下で観察し、パラフィン切片を作成した。生後75

日目までの網膜神経の染色はオリエンタル酵母社製(MF)の飼料を用いた場合陽性細胞の比率の増加がHarlan社のTeklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet(2014)に比較して遅いことが解った。Cre陽性細胞の経時的变化が異なるとデータの解釈が困難となるため、今回はTeklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Dietに統一して研究を進めることとした。KC1/ROSA-LacZ^{f/w}の生後700日目のlacZ染色所見は予想に反し、視神経の染色が淡かったため、ROSA-LacZ^{f/w}のlacZ発現量を決定しているROSA26 geneの老齢マウスにおける発現を検討するため、ROSA-LacZ^{f/w}のloxPで挟まれた部分が全身で切り取られたROSA-LacZ^{d/w}を作成した。この鼠はROSA26 geneの発現に依存した β -Galactosidaseの発現がある。ROSA-LacZ^{d/w}を用い生後700日目と生後900日目のROSA26 gene自体の発現を検討した。

(2)網膜組織特異的 BDNF 及び cfos knockout の神経節細胞数の解析

KC1をBDNF floxed mouse(BDNF^{f/f})およびcfos flox mouse (cfos^{f/f})と交配し、KC1遺伝子を持ったfloxedのheterozygous(KC1/BDNF^{f/w}, KC1/cfos^{f/w})の雄を得え、これらとBDNF^{f/f}およびcfos^{f/f}の雌をそれぞれ交配して、KC1をもったfloxedのhomozygous(KC1/BDNF^{f/f}, KC1/cfos^{f/f})を得た。これらの網膜組織特異的BDNF knockout(KC1/BDNF^{f/f})とcfos knockout(KC1/cfos^{f/f})とそのlittermate control(それぞれKC1/BDNF^{f/w}とKC1/cfos^{f/w})を気温24±1、12時間昼、12時間夜の人工照明下(500Wの水銀灯を2器設置)生後700日目まで飼育した。眼球組織を4%paraformaldehydeリン酸緩衝液で経心臓灌流固定を行い、パラフィン切片を作成して、Hematoxylin-Eosin(HE)染色を行い、神経節細胞数を検討した。逆行性色素の取り込みに

よる神経節細胞数の検討では従来使用されているhydroxystilbamidine methanesulfonateに加え、true blue、aminostilbamidine、4',6-diamino-2-phenylindole(DAPI)、propidium iodide(PI)についても検討した。

(3)cfosの下流の因子の検討について

cfosの下流にBDNFが存在することは確認できたが、それ以外の因子については網膜組織を用いたマイクロアレイが必要である。今回は差が出やすいと考えられる75日目から100日目頃のサンプルを多数採取する予定であったが、鼠の交配が困難となり、KC1/cfos^{f/w}雄の作成から実験を始めている。

4. 研究成果

(1) KC1遺伝子の発現の検討

KC1/ROSA-LacZ^{f/w}生後75日目までの網膜神経のlacZ stainingはオリエンタル酵母社製(MF)の飼料を用いた場合陽性細胞の比率の増加がHarlan社のTeklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet(2014)に比較して遅いことが解った。

ROSA26 gene自体の発現を検討した結果、lacZ stainingの染色パターンは生後700日目と生後900日目の間に差は認められなかった。ROSA-LacZ^{d/w}のlacZ stainingの染色は、眼球においては角膜上皮で発現が弱く、網膜においても神経細胞では発現を認めるものの、発現量は生直後に比べ格段に少なくなっていた。脳においても、海馬の錐体細胞では強い発現が見られたが、他の神経細胞の発現は弱く、グリア細胞には発現を認めなかった。また脳内の視神経や視交叉上核の発現は極めて弱いことが解った。生後700日目のKC1/ROSA-LacZ^{f/w}とROSA-LacZ^{d/w}の結果を比較すると脳内では視神経、視索や視交叉上核、大脳皮質の1部でCreを発現した細胞があることが解った。一方眼球内においては、網膜神

経節細胞、双極細胞や視細胞ではほぼすべて Creを発現していることが解ったが、網膜内グリリア細胞やミュラー細胞、本来keratocan promoterが発現すべき、角膜実質内の keratocyteでは発現しているかを確認できなかった。我々が研究を開始したときには ROSA-LacZ^{f/w}が最も多くの細胞に、ほぼ均一に発現している (Cre reporter mouseとして最も優れている) と考えられていたが、高齢のマウスでは確認がCre発現細胞の確認が困難であることが解った。最近になり、B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo}/Jが入手可能になった。このマウスの場合、ROSA26 geneの発現をCMV enhancer/chicken beta-actin core promoter増強しているため、高齢のマウスでも確認が可能と言われている。またKC1/ROSA-LacZ^{f/w}でlacZ staining陰性の場合ROSA26 geneの発現の問題か、Creが発現していないかを区別できなかったが、B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo}/Jの場合、Creが発現した細胞またはその子孫細胞はEGFPを発現しそれ以外の細胞はtdTomatoを発現するため、flox geneの遺伝子の除去を鮮明に区別することが可能である。この鼠を使用したKC1の発現細胞の確認が必要であると考えられる。

(2)網膜組織特異的 BDNF 及び cfos knockout の神経節細胞数の解析

KC1/BDNF^{f/f} と KC1/cfos^{f/f} の網膜神経節細胞は littermate control に比べ周辺部から加齢により減少したが、減少の速度は KC1/cfos^{f/f} の方が速く、神経細胞保護に関わる下流の因子を多く持っていることが考えられる。

(3)cfos の下流の因子の検討について

今回の研究期間中にマイクロアレイの検討

はできなかった。

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4件)

1) Shiraiishi A, Kobayashi T, Hara Y, Yamaguchi M, Uno T, Ohashi Y
Rapid detection of Acanthamoeba cysts in frozen sections of corneal scrapings with Fungiflora Y
Br J Ophthalmol 93:1563-1565 2009年12月(査読有り)

2) Kobayashi T, Yoshioka R, Shiraiishi A, Ohashi Y
New technique for culturing corneal epithelial cells of normal mice
Molecular Vision. 15:1589-1593 2009年8月(査読有り)

3) Hara Y, Shiraiishi A, Kobayashi T, Kadota Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Ohashi Y.
Alteration of TLR3 pathways by glucocorticoids may be responsible for immunosusceptibility of human corneal epithelial cells to viral infections
Molecular Vision. 15:937-948 2009年5月(査読有り)

4) Suzuki S, Kobayashi T, Suehiro F, Tuyen BC, Tana TS
High Occurrence Rate of Tetracycline (TC)-Resistant Bacteria and TC Resistance Genes Relates to Microbial Diversity in Sediment of Mekong River Main Waterway
Microbes and Environments. 23(2):149-152. 2008年5月(査読有り)

[学会発表](計4件)

(1) 小林剛、白石敦、楊旅軍、白方裕司、橋本公二、大橋裕一
凍結保存細胞によるヒト培養角膜上皮シートの作製
第34回角膜カンファランス(仙台) 一般口演 2010年2月11日~13日

(2) 小林剛、白石敦、楊旅軍、白方裕司、橋本公二、大橋裕一

コラーゲンをを用いた角膜上皮培養系における上皮-実質間相互作用の検討

第8回日本再生医療学会総会(東京) 一般口演 2009年3月5日~6日

(3) 小林剛、白石敦、楊旅軍、白方裕司、橋本公二、大橋裕一

コラーゲンをを用いた三次元上皮培養系におけるゲル内実質細胞の増殖因子発現パターン

第33回角膜カンファランス(大阪) 一般口演 2009年2月19日~21日

(4) 小林剛、白石敦、原祐子、門田裕子、楊旅軍、白方裕司、橋本公二、大橋裕一

コラーゲンをを用いた培養ヒト角膜上皮シートの作製とその評価

第62回日本臨床眼科学会(東京) 専門別研究会 一般口演 2008年10月23日~26日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 剛 (KOBAYASHI TAKESHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：70380285