

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791273

研究課題名（和文）マウス無色素上皮の培養系ならびにそれを用いた抗緑内障薬のスクリーニング系の確立

研究課題名（英文）Primary culture of mice non-pigmented ciliary epithelium and establishment of the screening system of anti-glaucoma medications by using mice non-pigmented ciliary epithelium in vitro.

研究代表者

結城 賢弥（YUKI KENYA）

慶應義塾大学・医学部・研究員（非常勤）

研究者番号：00365347

研究成果の概要（和文）：我々はマウス毛様体のexplant cultureを行い、少なくとも色素上皮細胞の培養を行うことが可能であった。また毛様体全体を単一細胞に分離し培養を行った。その結果と無色素上皮と思われる細胞は得られなかったが、sphere形成を伴う細胞集団が得られた。神経提細胞由来細胞がGFPにより蛍光を発するP0Cre-GFPマウスを用いて同様に毛様体を培養したところGFP陽性のsphereが形成された。毛様体に神経提細胞由来の神経幹細胞が存在すると思われた。

研究成果の概要（英文）：We tried to cultivate non-pigmented ciliary epithelial cells by explant of ciliary body. However, only pigmented ciliary cells were obtained. In the experiment, we observed sphere formation of GFP-positive cells from ciliary body of P0cre-GFP mice. This showed that neural stem cell from neural crest presents in the ciliary body of mice.

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	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：無色素上皮・緑内障・毛様体・アクアポリン・眼圧

1. 研究開始当初の背景

## (1) 緑内障の疾患としての重要性

緑内障は、日本人の中途失明原因の第一位の疾

患である。また、日本緑内障学会を中心として岐阜県多治見市にて行われた大規模疫学調査において日本人の40歳以上の緑内障の有病率は5%であ

ることが報告された(多治見スタディ)。またスタディでの緑内障新規発見率は89%であり、日本には約500万人の潜在患者がいると推測されている。緑内障は眼圧が上昇することにより、篩状板にて神経線維束が圧迫され、それにより神経節細胞死が生じるとされている。実際、アメリカにおいて行われた多施設無作為化前向き研究において、眼圧を30%下降させることにより、80%の症例において少なくとも5年間緑内障性視神経症の進行が停止すると報告された。

### (2) 研究対象としての毛様体無色素上皮

眼圧は、眼球内の毛様体において産生される房水によって維持・調節されている。房水は毛様体上皮において拡散、限外ろ過、能動輸送の三つのメカニズムによって産生されると考えられている。その中でも房水産生に最も大きな影響を与えているものが能動輸送である。能動輸送は、毛様体の毛様体無色素上皮に存在する  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  ATPase によって  $\text{Na}^+$  を後房に輸送し、電気的バランスをとるため  $\text{Cl}^-$  や  $\text{HCO}_3^-$  を後房に分泌し、その結果、浸透圧が上昇し、毛様体実質から後房への水のアクアポリン等を介する水の輸送が生じ、房水が産生される。無色素上皮が毛様体における房水産生、ひいては眼圧調整を行っているのである。しかし、毛様体における房水産生の制御機構に関してはいまだ不明な点が多い。その原因として、*in vitro* における房水産生系が存在しないことが考えられる。我々はまず毛様体無色素上皮培養系を確立し、無色素上皮における房水産生機序を明らかにしようと考えた。

### (3) 無色素上皮培養系確立の意義

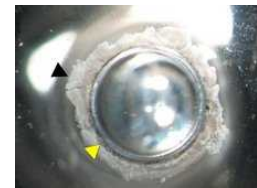
研究においては、対象となる細胞の培養が非常に重要である。毛様体無色素上皮細胞の培養に関しては、豚や rat の無色素上皮細胞の培養に関する報告は見られるものの、マウス無色素上皮細胞の培養は困難とされている。マウスは遺伝子が解明されており、抗体等の試薬が多く存在する。ま

た遺伝子改変マウスも多く存在するため多くの実験が可能である。それゆえマウスの毛様体無色素上皮細胞の培養を可能にすることは、無色素上皮における房水産生機構の解明に大きく貢献し、新たな薬物の開発、それによる緑内障の進行抑制を行うことができるかもしれない。

### 2. 研究の目的

我々の研究室では、これまでに角膜上皮、角膜内皮、角膜上皮幹細胞、角膜実質幹細胞の培養系を確立している。マウスの無色素上皮細胞は図1の様にマウスの眼球を赤道部に断面をいれ、水平

断とし下方から観察すると、黄矢印から黒矢印が毛様体扁平



部であり、黄矢印から水晶体までが毛様体ひだ部である。毛様体ひだ部に存在する無色素上皮をシー

図1 マウスの毛様体黄矢印から水晶体までが無色素上皮細胞である。

ト状に採取し、培養を行う。培養法はラットの無色素上皮培養にしたがって行う予定である。マウスはラットや豚と比較し、安価かつ大量に手に入り、遺伝子が解明されているので、マウス無色素上皮培養系の確立により、ラット等で困難であったノックアウトマウスにおける無色素上皮細胞の動態等を研究することが可能になる。

無色素上皮細胞上には  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  ATPase、 $\text{Cl}^-$  チャネル、アクアポリン1、アクアポリン4などの酵素やタンパクが多く発現している。しかし、これらの酵素や膜チャネル、イオン輸送体に関する機能は必ずしも明らかになっていない。マウスの無色素上皮細胞の培養系を確立することにより、これらの膜チャネルタンパクの房水産生における役割を検討することが可能となる。続いて培養マウス無色素上皮細胞を抗緑内障薬スクリーニング系と

して用いる。特にアクアポリン阻害薬の抗緑内障薬としての機能を検討する予定である。SiRNA にてアクアポリン欠損無色素上皮細胞を作成し、房水産生量および房水成分の変化を調べることが可能となる。またアクアポリン阻害薬という新たな作用機序による抗緑内障薬の可能性を検討できると考えた。

ラタノプロスト、ピマトプロスト、トラボプロスト等のプロスタグランジン系点眼薬が新たに開発されて約 10 年が過ぎようとしているが、抗緑内障薬としては、十分な眼圧下降が得られていない。マウス無色素上皮細胞培養系の確立ならびにアクアポリン阻害薬等の新しい機序による抗緑内障薬の開発は眼科学、緑内障学、ならびに世界で 7000 万人が罹患している緑内障患者の救済に貢献できると考える。

### 3. 研究の方法

生後 20 日のマウスを用いる。初めにマウスの眼球をマウスから型どおりに摘出する。続いてマウスの眼球を赤道部にて割断する。マウス毛様体ひだ部は肉眼的に観察することができ、同部より繊細なセッシを用いてシート状に無色素上皮をはがす。シート状にはがれた無色素上皮を 0.5mm 程度の大きさに切り、血清培地中に入れる。血清培地中にコラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、NaCl 等をいれ、培養に適切な濃度とする。コラゲナーゼやヒアルロニダーゼは毛様体無色素上皮に接着している硝子体を取り除くためである。その後、培養を行う。培養法は水晶体に連続した毛様体無色素上皮を explant culture する方法と、酵素処理によって分散化させた細胞を培養する方法を行う。培地には角膜実質細胞の培養に用いている無血清培地の他、DMEM を中心とした市販培地を用いた。接着培養系で増殖細胞が得られない場合は、角膜実質幹細胞培養法と同じ sphere culture 法を検討する。

毛様体上皮は角膜実質細胞と同じ神経堤由来細胞の可能性もあるとされており、実質細胞と同様な sphere culture 法で培養できる可能性もある。薬剤スクリーニングには、sphere culture した細胞を分散させて接着培養系を用いる。

### 4. 研究成果

我々はマウス毛様体の explant culture を行い、少なくとも色素上皮細胞の培養



図 1 毛様体から進展する色素上皮細胞と思われる細胞

を行うことが可能であった(図1)。右下方の充実

組織が explant culture を行った毛様体である。毛様体を中心に色素細胞と思われるものが増殖する様子が観察される。またCOPsの conditioned medium を用いても同様の結果が得られた。ただ増殖してくる細胞が無色素上皮か色素上皮かの判別が困難であったので、続いて、無色素上皮細胞と、色素上皮細胞との選別を試みた。具体的には、アクアポリン4が無色素上皮特異的に発現しているとの既報をもとにアクアポリン4を無色素上皮細胞のマーカーとして用いた。アクアポリンは房水産生にも関与していると考えられ機能的にも無色素上皮のマーカーとして適していると考えられた。

まずマウスの眼球の切片を作成し、アクアポリン4が無色素上皮に特異的に発現しているかの確認を

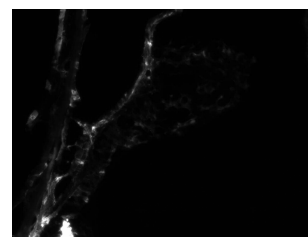


図 2 毛様体、虹彩、網膜に GFP で蛍光を発する細胞が存在している。(P0cre GFP マウス)

行ったが、免疫染色が困難であり、さまざまな方法を試みたが無色素上皮のマーカーを発見すること

が出来なかった。それゆえ結果的に無色素上皮の

みを選択的に培養することが出来なかった。また無色素上皮をセッシにて選択的にシート状にはがして培養を試みたが、対象が小さいためと、色素上皮との癒着が強固で分離が困難であった。それゆえ毛様体全体をディスペーゼ処理により単一細胞に分離しCOPsのconditioned medium中で培養を行った。その結果と無色素上皮と思われる細胞は得られなかったが、sphere形成を伴う細胞集団が得られた。我々は神経提細胞由来細胞がGFPにより蛍光を発するPOCre-GFPマウスを用いて同様に毛様体を培養したところGFP陽性のsphereが形成された(図2)。毛様体に神経提細胞由来の神経幹細胞が存在すると考えられた。今後、本神経幹細胞を用いて視細胞・網膜神経節細胞への分化誘導を試みる予定である。

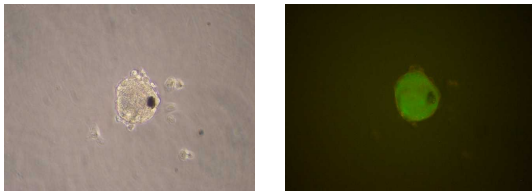


図2 左; sphere を形成する神経幹細胞と思われる細胞塊 図2 右; POCre-GFP マウス由来のGFPにて蛍光を発する sphere を得られた。

#### 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

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

結城 賢弥 (YUKI KENYA)

慶應義塾大学・医学部・研究員(非常勤)

研究者番号：00365347

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし