

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09790

研究課題名(和文) 低リスク網膜再生を実現する内在性幹細胞活性化 - CRMP群のリン酸化制御 -

研究課題名(英文) Endogenous stem cell activation for retinal regeneration with minimal risk - Phosphorylation regulation of CRMP group -

研究代表者

徳田 和央 (Tokuda, Kazuhiro)

山口大学・大学院医学系研究科・学術研究員(寄附金)

研究者番号：50266863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：低濃度のグルタミン酸を用いて、網膜内に休止している細胞を活性化し、活性化に関与する網膜内のタンパク質群を同定し報告を行っている。同定したタンパク質群を制御する因子や、細胞を取り巻く代謝の関連因子、エネルギー因子や制御を担う因子の解析に関する研究を進めた。内在性幹細胞の活性化時に変化する因子の動態変化、細胞接着分子や分泌タンパク質などの細胞外基質の変化が明らかになった。一連のシグナル群が細胞内制御機構のネットワークとして、網膜の内在性神経前駆細胞を活性化、細胞のリプログラミングを促進している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、その際には特異的なタンパク質群が発現することを報告してきた。本研究で明らかになった幹細胞活性化を支持する代謝動態を制御する因子や細胞環境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、自己の内在性神経幹細胞誘導で実現する可能性が示された。今後の研究継続により、低侵襲で効果が得られる新規の網膜治療法の確立と創薬への発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that a subtoxic concentrations of glutamate application led to neural progenitor cells and a group of proteins within the retina that was involved in progenitor cell activation. We conducted research on the analysis of factors that control the protein group, factors related to cellular metabolic networks, energy factors, and factors responsible for cell regulations. We found that changes in the dynamics of factors that work during activation of endogenous stem cells, as well as changes in extracellular matrix such as cell adhesion molecules and secreted proteins. Series of signaling cascades may act as a network of intracellular control mechanisms to activate endogenous neural progenitor cells in the retina and promote cell reprogramming.

研究分野：再生医療

キーワード：網膜再生 内在性幹細胞 タンパク質 リプログラミング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

網膜疾患に対する治療が進歩する中、黄斑部の神経細胞の変性が残存し、失明や視機能障害に至る症例が多数存在する。国内の視覚障害者数は増加し、2030年には200万人に達するとされている。網膜再生を目的とする根治的治療法の開発は喫緊の課題であり、iPS細胞など網膜への幹細胞移植に関する研究が盛んに行われている。

一方で、研究代表者は、休止している網膜幹細胞が網膜内に存在するという報告に注目してきた。自己の内在性網膜幹細胞を活性化することができれば、移植をせずに視機能を改善できる。しかし、幹細胞の活性化の機序や活性化に関与するタンパク質は明らかにされていない。

研究代表者らは、モデル動物の内在性網膜幹細胞を活性化する方法を確立し、特異的に発現が上昇するタンパク質群を同定した。また、幹細胞の維持に重要な代謝制御因子を見出した。更に、シグナル因子間のネットワーク解析を行い、網膜幹細胞活性化に関与するタンパク質群を明らかにした。このタンパク質修飾の解析により、幹細胞の活性化に特異的なリン酸化部位の候補が挙がってきた。この結果により、特異的なタンパク質群のリン酸化制御により内在性網膜幹細胞が活性化を行い、低リスクの網膜再生法を確立するという着想に至った。

### 2. 研究の目的

特異的なタンパク質群のリン酸化制御により内在性網膜幹細胞を活性化させ、低リスクの網膜再生法を確立することを目的に、(1)網膜幹細胞活性化時における特異的なタンパク質群の作用機序を解明する、(2)幹細胞活性化時におけるタンパク質群のリン酸化修飾部位を同定する。(3)眼内の生体細胞を幹細胞化するタンパク質群リン酸化制御酵素を同定することを行う。

### 3. 研究の方法

研究目的の各項目において、

(1) 網膜幹細胞活性化時における特異的なタンパク質群の作用機序解明については、モデル動物を用いて、タンパク質群遺伝子の制御を行う。

(2) 幹細胞活性化時におけるタンパク質群のリン酸化修飾部位同定については、網膜幹細胞活性化における特定タンパク質のプロテオーム解析を行う。

(3) 眼内の生体細胞を幹細胞化するタンパク質群リン酸化制御酵素同定については、3次元培養システムを用いて、幹細胞を活性化する酵素を選択する。

### 4. 研究成果

低濃度のグルタミン酸を用いて、内在性の網膜前駆細胞を活性化し、活性化に関与する網膜内のタンパク質群を同定し報告を行っている。同定したタンパク質群を制御する因子や、細胞を取り巻く代謝関連因子、エネルギー因子や制御因子の解析に関する研究を進めた。

研究実施計画に基づき、眼内の内在性前駆細胞の活性化と活性化因子群の検討を行った。培養細胞を用いた解析では、網膜から細胞を単離した複数の種類の生体細胞を使用し、細胞共培養システムや特殊な培養シートを用いた3次元培養システムなどのモデルを用いた。

また、生体においては自己網膜再生能を有する Zebrafish を用い、同定したタンパク質群の遺伝子の発現を制御して、網膜幹細胞活性化における前駆細胞の活性化と形態変化並びに細胞内シグナル分子の核内移行などの解析を行った。

血清応答因子 (SRF) に結合して転写を制御する SRF コファクターのうち、Myocardin-related transcription factor-A (MRTF-A) の役割とレチノイン酸受容体作動薬の一つである Retinoic acid receptor alpha、細胞接着分子や分泌タンパク質などの細胞外基質の変化などを中心に研究を進めた。細胞の増殖、分化・成熟の段階において、トランスフォーミング増殖因子 を介したシグナル伝達経路により、アクチンダイナミクスに関連して MRTF-A の細胞内局在変化などがみられ、細胞内制御機構のネットワークが示された。

また、最終目標である生体内での網膜再生法の確立のため、自己増殖を伴う細胞を用いて Epithelial-Mesenchymal Transition に関する検討を行い、この過程で細胞外基質の変化と細胞の可塑性がどのように制御されているかを解析した。線維芽細胞などの非免疫系細胞が関与する免疫応答や線維性増殖・線維化瘢痕制御などの観点から、これら因子のメカニズムを含む作用機構を検討し、結果を報告した。

内在性幹細胞の活性化時には、MRTF-A の細胞内局在変化や、レチノイン酸受容体作動薬の一つである Retinoic acid receptor alpha、細胞接着分子や分泌タンパク質などの細胞外基質の変化が見られた。一連のシグナル群が網膜内のタンパク質群の発現やリン酸化が細胞骨格、特にアクチンダイナミクスにも相互に関与している可能性が示唆された。網膜の内在性神経前駆細胞の活性化、細胞のリプログラミングを促進する細胞内制御機構のネットワークの一部が明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 YAMASHITA SHIN-NOSUKE, TANAKA YOSHIATSU, KITAGAWA TAKAO, BARON BYRON, TOKUDA KAZUHIRO, PAUDEL DURGA, NAKAGAWA KOJI, OHTA TOHRU, HAMADA JUN-ICHI, KOBAYASHI MASANOBU, NAGAYASU HIROKI, KURAMITSU YASUHIRO	4. 巻 43
2. 論文標題 Down-regulating Effect of a Standardized Extract of Cultured Lentinula edodes mycelia on Cortactin in Prostate Cancer Cells Is Dependent on Malignant Potential	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1159 ~ 1166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16261	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 KITAGAWA TAKAO, ISLAM SHAJEDUL, BARON BYRON, TOKUDA KAZUHIRO, PAUDEL DURGA, OHTA TOHRU, NAKAGAWA KOJI, KOBAYASHI MASANOBU, OKADA FUTOSHI, KURAMITSU YASUHIRO	4. 巻 43
2. 論文標題 A Standardized Extract of Cultured Lentinula edodes mycelia Up-regulates COX-2 in Inflammation-related Malignant Progressive Fibrosarcoma Cell Clone QRsP-11	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1239 ~ 1244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16270	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamashiro C, Tokuda K, Kobayashi Y, Higashijima F, Yoshimoto T, Ohta M, Ogata T, Ashimori A, Kobayashi M, Hatano M, Uchi SH, Wakuta M, Kimura K	4. 巻 11
2. 論文標題 Benzalkonium chloride-induced myofibroblastic transdifferentiation of Tenon's capsule fibroblasts is inhibited by coculture with corneal epithelial cells or by interleukin-10	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 16096-16096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94852-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Y, Tokuda K, Yamashiro C, Higashijima F, Yoshimoto T, Ohta M, Ogata T, Ashimori A, Hatano M, Kobayashi M, Uchi SH, Wakuta M, Kimura K	4. 巻 11
2. 論文標題 Inhibition of epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelial cells by a retinoic acid receptor- agonist	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 11842-11842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-90618-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 KUHARA KEISUKE, KITAGAWA TAKAO, BARON BYRON, TOKUDA KAZUHIRO, SAKAMOTO KAZUHIKO, NAGANO HIROAKI, NAKAMURA KAZUYUKI, KOBAYASHI MASANOBU, NAGAYASU HIROKI, KURAMITSU YASUHIRO	4. 巻 18
2. 論文標題 Proteomic Analysis of Hepatocellular Carcinoma Tissues With Encapsulation Shows Up-regulation of Leucine Aminopeptidase 3 and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Genomics - Proteomics	6. 最初と最後の頁 307 ~ 316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cgp.20261	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wakuta M, Nomi N, Ogata T, Ohta M, Yamashiro C, Hatano M, Yanai R, Tokuda K, Kimura K	4. 巻 258
2. 論文標題 A Trinity regimen with aflibercept for treatment-naive neovascular age-related macular degeneration: 2-year outcomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 1663-1670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-020-04745-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐久間 彩乃, 山城 知恵美, 徳田 和央, 長谷川 実茄, 濱田 和花, 東島 史明, 吉本 拓矢, 小林 由佳, 芦森 温茂, 寺西 慎一郎, 湧田 真紀子, 林 謙一郎, 木村 和博
2. 発表標題 BACによるHTFの形態変化に対するHCEの影響
3. 学会等名 第24回眼創傷治癒研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳田 和央
2. 発表標題 目の健康と栄養
3. 学会等名 令和4年度山口県栄養士生涯教育基本研修会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山城 知恵美, 徳田 和央, 小林 由佳, 小林 正明, 波多野 誠, 永井 智彦, 寺西 慎一郎, 徳田 信子, 木村 和博
2. 発表標題 BACによるテノン囊線維芽細胞の形態変化に対する抗炎症性サイトカインの抑制効果
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 由佳, 山城 知恵美, 東島 史明, 吉本 拓矢, 緒方 惟彦, 芦森 温茂, 小林 正明, 波多野 誠, 湧田 真紀子, 柳井 亮二, 徳田 和央, 木村 和博
2. 発表標題 RAR- agonistによるRPE細胞におけるEMT抑制作用
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳田 和央, 山城 知恵美, 小林 由佳, 波多野 誠, 小林 正明, 藏満 保宏, 寺西 慎一郎, 山田 直之, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 網膜前駆細胞活性化におけるピルビン酸キナーゼM2アイソフォームの機能
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山城 知恵美, 徳田 和央, 小林 由佳, 小林 正明, 波多野 誠, 永井 智彦, 寺西 慎一郎, 徳田 信子, 木村 和博
2. 発表標題 点眼防腐剤によるテノン囊線維芽細胞の形態変化に対する角膜上皮細胞の抑制作用と機序
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 由佳, 山城 知恵美, 小林 正明, 波多野 誠, 徳田 和央, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 RAR- agonistによるsubretinal fibrosisの抑制作用
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 波多野 誠, 徳田 和央, 小林 由佳, 山城 知恵美, 内 翔平, 小林 正明, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 光誘因性の網膜変性モデルにおけるHSF1の神経保護性についての検討
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	清木 誠  (Seiki Makoto)  (50226619)	山口大学・大学院医学系研究科・教授   (15501)	
研究分担者	藏満 保宏  (Kuramitsu Yasuhiro)  (50281811)	北海道医療大学・医療技術学部・教授   (30110)	
研究分担者	木村 和博  (Kimura Kazuhiro)  (60335255)	山口大学・大学院医学系研究科・教授   (15501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	徳田 信子  (Tokuda Nobuko)  (70227578)	獨協医科大学・医学部・教授     (32203)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
マルタ	University of Malta			