

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号： 15101  
 研究種目： 基盤研究（C）  
 研究期間： 2010～2012  
 課題番号： 22590174  
 研究課題名（和文） 眼球の組織発生とサイズ決定に関わるコンドロイチン硫酸種の同定と機能解析  
 研究課題名（英文） Identification and functional analysis of chondroitin sulfates involved in sizing and development of eye  
 研究代表者  
 上原 正人（UEHARA MOSATO）  
 鳥取大学・農学部・教授  
 研究者番号： 30032311

## 研究成果の概要（和文）：

眼球の組織発生とサイズ決定深く関わるコンドロイチン硫酸種を同定し、その機能を解析した。糖鎖はコンドロイチン-4-硫酸、コンドロイチン-6-硫酸および、それらのプロテオグリカンが発生期間の全体を通して網膜で分布していた。とりわけ、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンのデコリンは眼球全体に豊富に存在していた。胚齢 5.5 日目（HH ステージ 28）に抗デコリン抗体を眼球に注入したところ、眼球拡張が著しく抑制された。しかし、網膜の構成細胞や強膜細胞は硝子体の容積に関わらず増殖し、眼球の容積に対して過剰となったためにヒダの形成や肥厚が起こった。これらより、デコリンは硝子体の拡張の調節を介して眼球容積の決定に関与していると考えられる。

## 研究成果の概要（英文）：

We tried to identify chondroitin sulfates closely related sizing and morphogenesis of eye and analyze its function. Chondroitin-4-sulfate and chondroitin-6-sulfate and its proteoglycans were distributed in the retina throughout the developmental periods. Especially, decorin, one of the chondroitin sulfate proteoglycans, were present in abundance in the entire eyeball. Injecting anti-decorin antibody in vitreous cavity on embryonic day 5.5 (HH stage 28), the expansion of chick embryo eye was significantly suppressed. However, proliferation and cell proliferation of retinal cells were occurred regardless of the suppression of eye expansion. The sclera was also thickened and inhibited eye expansion. These results indicated that decorin involved in the determination of retinal formation and eyeball volume and sizing through the regulation of the expansion of the vitreous body.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医学

科研費の分科・細目： 基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード： 網膜、眼球、糖鎖

### 1. 研究開始当初の背景

これまで糖鎖は間葉系組織や中枢神経系の形態形成や恒常性の維持が主たる役割と考えられていた。しかし近年は、糖鎖が神経細胞の増殖や分化を強力に制御する因子であることが明らかになってきた。細胞増殖や分化に関わる糖鎖の発見とその機能の解明は、細胞の分化・成熟ステージの人為的制御すなわち、器官・組織の再生を容易にし、早期の創傷治癒も望める。

本研究の開始当初は、中枢神経での糖鎖の発現や機能については解明が進められていたが、眼についての研究はほとんど未着手のであり、とりわけ網膜の秩序だった層形成や増殖、眼球形成に寄与する糖鎖の情報は皆無であった。

### 2. 研究の目的

発生途中の網膜にはコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸(CS/DS)が、部位・時期特異的に発現分布しており、眼球構造(網膜、強膜)と眼球サイズを規定しているようだ。しかし複数ある CS/DS のうち、どの種類の CS/DS が眼球発生に影響を与えるか、そしてそれらが発生・成長過程のどの部位で、どの時期で、いかなる作用を発揮しているのかは、ほとんどが未解明のままである。

本研究では、発生過程での眼球構造とそのサイズ決定に関わる CS/DS 種を同定し、その機能を解析することを目的とした。加えて、眼球穿刺によって形成されるニワトリ胚眼球の形態が、抗デコリン抗体を注入したものと極めて類似していたことより、両者を比較しすることで、網膜や眼球の増殖や形態形成に糖鎖が及ぼす影響を検索した。

### 3. 研究の方法

マウス網膜の CS/DS 鎖および CS/DS プロテオグリカンの時間的・空間的変遷を免疫組織学的に調査した。材料は胎齢(E)12 および 18 日および生後(P)7、42 および 120 日のマウス眼球のパラフィン切片を作成し、ビグリカン、アグリカン、ケラタン硫酸、コンドロイチン-4-硫酸(C4S)、コンドロイチン-6-硫酸(C6S)に対する抗体を用いてこれら因子を検出した。

また、胚操作が容易なニワトリ網膜を用いて実験を行った。過去の予備実験で、網膜形成が開始する HH Stage 28 (E 5.5 に相当)に抗デコリン抗体を注入したところ翌日に、網膜が色素上皮より剥離し、硝子体腔内にヒダを形成したことから、網膜を含めた眼球各部位での分布と、網膜形成に及ぼすデコリンの役割を改めて注意深く検索した。

さらには、抗デコリン抗体注入によって、硝子体が産生を抑制され眼内圧の低下を誘導したことから、眼球を穿刺して硝子体を流

出させ、人為的に眼内圧を低下させた場合の、網膜の類似点および相違点を比較した。

### 4. 研究成果

胎齢 18 日(E18)では、C4S、C6S およびビグリカンが網膜と視神経に存在していた。生後 7 日(P7)ではアグリカンとビグリカンは視神経、内顆粒層、神経節細胞層に分布し、C4S は網膜全体と視神経にびまん性に存在した。C6S は視神経細胞層で強陽性を示した。P42 では、ビグリカンの分布域は視神経細胞の豊富な領域を占めた。アグリカンは内および外顆粒層、外網状層および神経節細胞層で強い陽性反応を示した。C4S と C6S は網膜と視神経の両部位で認められたが、とりわけ C6S が視神経細胞層に強く認められた。これらの CS/DS 鎖およびプロテオグリカンの時間的・空間的分布の変遷は、網膜や視神経組織を構成する細胞の分化や形成に深く関与していると考えられる。なお、ケラタン硫酸は、検索したすべての期間を通じて、網膜中にその存在を検出できなかった(図1)。

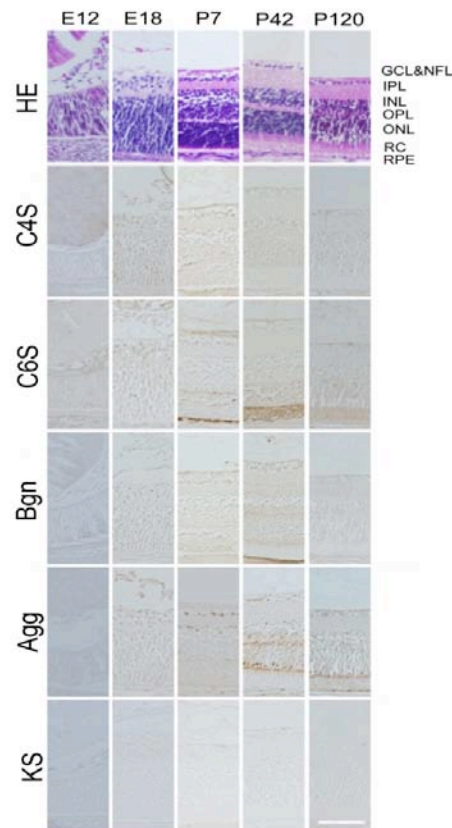


図1 マウス網膜の発生発達に伴う糖鎖分布の変遷

ニワトリの眼球においてデコリンは角膜および強膜に存在し、網膜や毛様体でも確認された。抗デコリン抗体注入眼球では眼球の容積が著しく減少した。その際、網膜にはヒダが形成され硝子体腔に陥入し、また強膜軟

骨は肥厚していた。眼球の拡張は硝子体の拡大による眼内圧の上昇に伴って起こることが知られている。抗デコリン抗体の注入により眼球が拡張しなかったことから、デコリンは発生段階の硝子体の拡張の主要な因子であろう。網膜を構成する細胞および強膜細胞は硝子体の容積に関わらず増殖し、眼球の容積に対して過剰となったためにヒダの形成や肥厚が起こった可能性が高い。これらより、デコリンは硝子体の拡張の調節を制御することで、眼球容積の決定に関与していると考えられた (図2)。

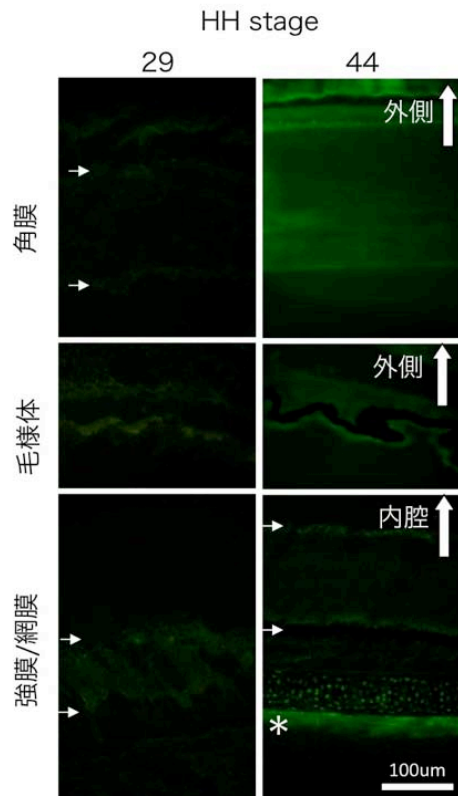


図2 ニワトリ眼球各部位のデコリンの分布 (HH stageの29は6日齢、44は18日齢に該当する)

眼球穿刺によって、眼内圧を低下させると眼球の拡張が著しく抑制された。また、網膜はヒダを形成し、硝子体腔内に突出した。この形態は抗デコリン抗体を注入したものと極めて類似していた。また、網膜の分化マーカーである Pax6 および Visinin の分布部位を検索したところ、抗デコリン抗体を注入したものは注入3日目で内顆粒層となる部位により強い Visinin 陽性反応を認め、一方、Pax6 は、視神経細胞となる部位にコントロールでは陽性反応を検出したのに対し注入眼で消失し、別の部位、すなわち網膜内顆粒層や外顆粒層となる部位に反応が現れた。一方、穿刺処置した網膜の両因子は分布部位および

発現量に差がなかった。このことは、デコリンが網膜の増殖や分化を直接的あるいは間接的に制御していることを改めて示すとともに、穿刺による眼圧の低下は網膜の増殖や分化に影響を及ぼさないことを示唆している (図3)。

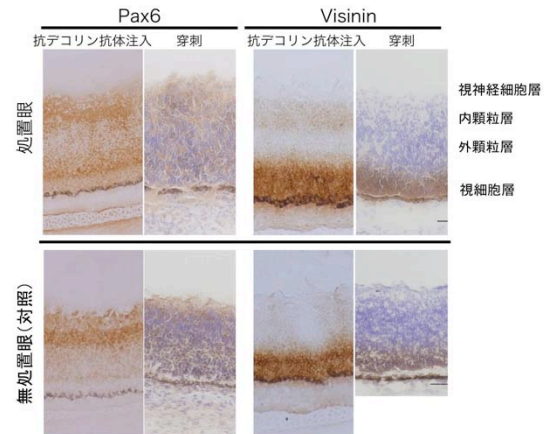


図3 網膜のヒダは抗デコリン抗体を注入しても、穿刺して眼内圧を低下させても形成されるが、網膜分化マーカーの分布パターンは異なる。

以上のことより、眼球では様々な糖鎖が部位時期特異的に分布していること、とりわけ、デコリンが、眼球の形態形成に関与し、網膜の分化や眼球サイズの決定の際の鍵となる重要な因子であることが示された。

## 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2件)

① Ali SA, Hosaka YZ, Uehara M Spatiotemporal distribution of chondroitin sulfate proteoglycans in the developing mouse retina and optic nerve, *Journal of Veterinary Medical Science*, 73:13-18, 2011

② Ali SA, Hosaka YZ, Uehara M Expression of small leucine rich proteoglycans in the developing retina and kinetic acid-induced retinopathy in ICR mouse, *Journal of Veterinary Medical Science*. 73: 439-445, 2011

[学会発表] (計4件)

① 保坂善真、田中智子、上原正人 発生早期の眼圧低下が眼球拡張と網膜形成に及ぼす影響 第118回日本解剖学会学術集会 2013年3月29日 (かがわ国際会議場 香川県)

② Tanaka Tomoko, Hosaka Yoshinao Z, Uehara Masato, Effect of intraocular pressure on expansion and morphogenesis in

chick embryo eye. 第4回アジア獣医解剖学会 2012年10月25日(ブーケット、タイ)

③ ALI Safwat Ali Mohamed、保坂善真、上原正人 Spatiotemporal distribution of chondroitin sulfate proteoglycans in the developing mouse retina and optic nerve第150回日本獣医学会学術集会 2010年9月21日(帯広畜産大学、北海道)

④ 岩佐歩、保坂善真、上原正人 ニワトリ胚眼球におけるデコリンの分布と眼球サイズに与える影響 第150回日本獣医学会学術集会 2010年9月21日(帯広畜産大学北海道)

[その他]

ホームページ等

<http://staff.muses.tottori-u.ac.jp/muehara/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上原 正人 (UEHARA MASATO)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30032311

### (2) 研究分担者

保坂 善真 (HOSAKA YOSHINAO)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00337023

### (3) 連携研究者

田村 純一 (TAMURA JUNICHI)

鳥取大学・地域学部・教授

研究者番号：30221401