

## 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 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22590239

研究課題名(和文) コバルトクロライド誘発網膜神経障害モデルを用いた再生治療に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Study of regeneration treatment with cobalt chloride-induced retinal degeneration model.

研究代表者

丹羽 雅之 (NIWA MASAYUKI)

岐阜大学・医学部・教授

研究者番号：40156146

研究成果の概要(和文): 本研究から一定の低酸素状況下での ES 細胞培養は神経細胞分化を促進すること、さらに自殺遺伝子の導入は奇形種発現を抑制する有力なツールとなることを明らかとした。また網膜神経細胞への障害は ES 細胞の生着率を高めることも明らかとした。しかしながら、CoCl<sub>2</sub> の網膜への投与は、視細胞のみに選択的に障害性を与えるものの、その程度が激しく網膜再生モデルとして必ずしも適していないことも示唆された。一方、NMDA 投与による網膜神経節の選択的な障害は、ES 細胞の移植後一部ではあるものの、ネットワーク形成を伴う神経節細胞への分化が認められるなど、網膜障害モデルとしての有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文): The ultimate goal of this study is treatment of retinal degeneration by regeneration. As a pre-stage, we constructed suitable regeneration condition using retinal degeneration model treating with CoCl<sub>2</sub> or NMDA. The results indicate hypoxia condition might be good for neuronal differentiation, and herpes simplex virus-thymidine kinase transgene transfected ES cells is good for prevention of expression of teratoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：再生医学、中枢神経、網膜、神経障害、ES 細胞、コバルトクロライド、NMDA、奇形種発現

### 1. 研究開始当初の背景

網膜視細胞は眼球の後方に位置し、哺乳類において唯一の光センサーとして働く。網膜視細胞は錐体・桿体の2種類の細胞からなり、視覚において重要な役割を担っている。しかしながら網膜色素変性症や近年先進国で著しい増加を示している老人性黄斑変性症、糖

尿病性網膜症、網膜剥離症、網膜循環不全、緑内障など、遺伝性あるいは後天性の疾患により網膜視細胞が障害されると、著しい視力障害を来す (Berson EL, 1993. Invest Ophthalmol Vis Sci. 34, 1659-1676 ; Kennan A, et al. 2005. Trends Genet. 21, 103-110, etc)。現時点ではこれらの疾患に対

しては、その進行を遅らせる以外に根本的な治療法がないのが現状である。

一方、各種疾患における網膜視細胞の障害発現やその防御法の確立の研究には実験動物モデルが必須である。これまでもいくつかの実験動物モデルが開発されてきたが、そのほとんどすべてが先天的遺伝子異常モデルであり、現状では十分とはいえない。我々はすでに培養細胞に虚血状態を引き起こすと考えられているコバルトクロライドをマウスに眼内投与することにより、網膜視細胞に極めて選択的にアポトーシスを伴う細胞死を引き起こすことを見出し、新しいモデルとして確立し報告した (Hara A, Niwa M, et al. 2006. Brain Res. 1109:192-200)。本モデルは低分子物質コバルトクロライドを眼内に投与するという簡便な方法により、時期を限定して網膜視細胞障害を発現出来る長所を有す。これは我々が初めて見出した現象であり、世界的にも他に例が無い。本モデルは遺伝子変異が原因で網膜の視細胞等が広範に変性する疾患である、網膜色素変性症モデル等として期待される。これはすでに緑内障、糖尿病網膜症モデルとして確立された、NMDA 眼内投与による網膜神経節細胞障害モデルに匹敵する優れた網膜障害モデルと言えよう。

一方、我々は網膜を始めとする神経障害に対する治療の試みを以前より継続して行ってきており、アポトーシス阻害剤 (Hara, A. et al. 1998. J Cereb Blood Flow Metab. 18, 819-823)、代謝阻害剤 (Niwa M, et al. 1999. Life Sci. 64, PL193-198)、低体温 (Niwa M, et al. 1998. Brain Res. 794, 338-342; Wang X, et al. 2002. Neurol Res. 24, 730-735)、ラジカル消去剤 (Nakashima M, et al. 1999. Free Radic Biol Med. 26,722-972) などによる成果を報告した。

さらにはES細胞移植による再生治療にも挑戦してきた。ES細胞移植は極めて有用な治療法として期待できるが、i)移植細胞の生着率が低いこと、ii)奇形腫形成率が高いこと、iii)ES細胞を用いることによる倫理性、など克服しなければならない難題がある。このうちiii)の倫理的問題に関しては、最近手技が飛躍的に進歩しているiPS細胞をES細胞の代わりに用いることで問題回避できるとしても、i)およびii)の問題点は依然として大きく立ちはだかっている。我々はすでに網膜障害に対してES細胞移植を試み、一定の成果を報告した (Hara A, et al. 2004. Brain Res. 999, 216-221)。また網膜へのES細胞移植は正常網膜への移植に比し、網膜障害後の移植が有用であることを明らかにしてきた (Hara A, 2006. Brain Res. 1085, 33-42)。

## 2. 研究の目的

本研究は網膜神経障害に対する幹細胞による再生治療を成功に導くための基礎的研究である。コバルトクロライド、NMDAにより網膜を部位選択的に障害し、障害部位特異的にES細胞あるいはiPS細胞の移植により再生治療を行うことを目的とする。また移植後に発生する奇形腫形成の制御も併せて検討する。

## 3. 研究の方法

本研究では、(1)我々が確立したマウスコバルトクロライド誘発視細胞選択的障害モデルを用い、ES細胞ならびに今後樹立するiPS細胞の移植を試み、無障害網膜への移植と比較することにより生着率の向上の種々条件を構築する。その際平行してNMDA誘発神経節選択的障害モデルを用いた実験をあわせて実施する。我々はすでにCoCl<sub>2</sub>やNMDAのマウスにおける選択的障害発現条件を確立しているが、ES細胞、iPS細胞移植にふさわしい条件を確認する必要がある。

(2)(1)で試みたES細胞移植マウスにおける奇形腫の発生状況を検証し、以下i) )の奇形腫発現抑制の試みならびに )の奇形腫発現条件メカニズムの解明を検討する。

i)我々はすでにMethotrexate (MTX、葉酸拮抗剤、眼内悪性リンパ腫などに対する化学療法剤)の経硝子体的注入が、ES細胞移植に伴う奇形腫発現を抑制することを明らかにした(Hara A, et al. 2006. Brain Res. 1085,33-42)。そこで同様の手技により、網膜障害マウスへのES細胞移植に伴う奇形腫発現の抑制を試みる。

)自殺遺伝子導入ES細胞の応用：我々はすでに自殺遺伝子(herpes simplex virus-thymidine kinase transgene)導入によるES細胞奇形腫形成抑制をin vitroにて試み、すぐれた成果を認めた(Hara A, et al. 2008. Stem Cells Dev. 17, 619-627)。そこでこの手法をin vivoに應用する。すなわち自殺遺伝子導入ES細胞を細胞障害マウスに移植し、奇形腫発現の抑制を試みる。

)奇形腫発現における低酸素状態の関与の解明：近年、腫瘍内微少環境下での低酸素とcancer stem cellの関係、腫瘍浸潤、apoptosis耐性等が報告されており、ES細胞分化における奇形腫発現と微少環境下での低酸素状態の関係が極めて重要と考えられる。そこでES細胞分化と低酸素状態との関連をin vitroならびにin vivoにおいて検討する。

(3)(1)、(2)で試みたES細胞移植マウス奇形腫抑制の試みが網膜変性を修復し正常な網膜へ回復するかどうかを、組織学的及び電気生理学的に調べる。

#### 4. 研究成果

(1) マウスを用いた正常網膜および障害網膜へのES細胞移植を試みた。D3 ES cell は129Sv マウス由来で、D3 ES cell にelectro-poration法でGFPを導入しD3 GFP ES cell (以下ES細胞)を樹立した。コントロール実験として正常マウスを用い、ES細胞を経硝子体的に移植した。マウス網膜にCoCl<sub>2</sub>を処理することにより視細胞障害モデルを、NMDAを処理することにより網膜神経節細胞障害モデルを作成した。

(2) 次に奇形腫発現抑制処理を伴うES細胞移植を試みた。移植後ES細胞からの奇形腫発現を制御する目的で、ES細胞移植後、葉酸拮抗剤MTX処理による奇形腫発現抑制ならびに自殺遺伝子(herpes simplex virus-thymidine kinase transgene)導入ES細胞を樹立し、移植後の奇形腫発現の程度を検討した。結果、葉酸拮抗剤MTX処理による奇形腫発現抑制に一定の効果が認められた。この結果を踏まえ、ヒトES細胞のヌードマウスへの移植後MTX処理を試みた。MTX処理により、ヒトES細胞からの奇形腫形成発現が有意に抑制された。

(3) ES細胞の奇形腫形成のメカニズムを明らかとするため、ES細胞の奇形腫形成における微少環境の低酸素の影響を検討した。

[in vitroでの検討] ES細胞を様々な酸素濃度下で三次元培養し、低酸素度とES細胞の奇形腫分化の程度を解析した。低酸素環境下では、コントロールに比べ神経マーカーならびにastrocyteマーカーが強く発現し、stem cellsマーカーの発現ならびに非神経マーカーの発現は低かった。これらの結果は低酸素環境でのES細胞の培養は神経細胞への分化に適していることが示唆された。

以上の結果より、一定の低酸素状況下でのES細胞培養は神経細胞分化を促進すること、さらに自殺遺伝子の導入は奇形腫発現を抑制する有力なツールとなることが明らかとなった。また網膜神経細胞に一定の障害を与えることはES細胞の生着率を高めることも明らかとなった。しかしながら、コバルトクロライドの網膜への投与は、視細胞のみに選択的に障害性を与えるものの、その程度が激しく網膜再生モデルとして必ずしも適していないことも示唆された。一方、NMDA投与による網膜神経節の選択的な障害は、ES細胞の移植後、一部ではあるものの、ネットワーク形成を伴う神経節細胞への分化が認められるなど、網膜障害モデルとしての有用性が示唆された。

#### 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 8 件)

Aoki H, Hara A ら、Keratinocyte stem cells but not melanocyte stem cells are the primary target for radiation-induced hair graying. *J Invest Dermatol*. 査読有、155 巻、2013、inpress

Aoki H, Hara A ら、Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis. *Development*. 査読有、139 巻、2012、667-677

Goda W, Hara A, Niwa M ら、PBN fails to suppress in delayed neuronal death of hippocampal CA1 injury following transient forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci Lett*. 査読有、517 巻、2012、47-51

Aoki H, Hara A ら、Functionally distinct melanocytes populations revealed by reconstitution of hair follicles in mice. *Pigment Cell Melanoma Res*. 査読有、24 巻、2011、125-135

Aoki H, Hara A ら、Protective Effect of Kit Signaling for Melanocyte Stem Cells against Radiation-Induced Genotoxic Stress. *J Invest Dermatol*. 査読有、131 巻、2011、1906-1915

Satoh K, Niwa M, Hara A ら、Increase of galectin-3 expression in microglia by hyperthermia in delayed neuronal death of hippocampal CA1 following transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett*. 査読有、504 巻、2011、199-203

Satoh K, Niwa M, Hara A ら、Galectin-3 expression in delayed neuronal death of hippocampal CA1 following transient forebrain ischemia, and its inhibition by hypothermia. *Brain Res*. 査読有、1382 巻、2011、266-274

Hara A, Niwa M ら、Folate antagonist, methotrexate induces neuronal differentiation of human embryonic stem cells transplanted into nude mouse retina. *Neurosci Lett*. 査読有、477 巻、2010、138-143

#### [学会発表](計 2 件)

佐藤国夫、原 明、丹羽雅之、低体温および高体温は一過性前脳虚血後の遅発性神経細胞死およびGalectin-3発現に影響を及ぼす。第86回日本薬理学会年会、2013.3.23、博多

Niwa M, Satoh K, Hara A, Galectin-3 contributes to delayed neuronal death of hippocampal CA1 following transient

forebrain ischemia, 10th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, 2011.9.13-17, Prague, Czech

[図書](計 2 件)

Hara A, Niwa M, 他. Human embryonic stem cells transplanted into mouse retina induces neural differentiation.. In: Tumors of the central nervous system. Springer, Stem Cells and Cancer Stem Cells, 2 巻, Part 4, 2012, 291-298.

Niwa M, Hara A 他. Hypothermia and Hyperthermia affect neuronal degeneration, delayed neuronal death and microglial activation following transient forebrain ischemi. In. Hypothermia: Prevention, Recognition and Treatment: ed Delgado JIV and Garza VGF, Nova Science Publish; 2012

6 . 研究組織

(1)研究代表者

丹羽 雅之 (NIWA MASAYUKI)

岐阜大学・医学部・教授

研究者番号：40156146

(2)研究分担者

原 明 (HARA AKIRA)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10242728