

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5月27日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659311

研究課題名（和文）網膜前駆細胞を標的とした網膜芽細胞腫の治療法開発

研究課題名（英文）New Therapy for Retinoblastoma by Targeting Retinal Progenitor Cells

研究代表者

植村 明嘉（UEMURA AKIYOSHI）

神戸大学・大学院医学研究科・特命助教

研究者番号：30373278

研究成果の概要（和文）：

網膜前駆細胞は神経細胞やミュラーグリア細胞に分化すると増殖を停止するが、網膜芽細胞腫では網膜前駆細胞が未分化性を維持したまま無秩序に増殖すると考えられる。このため、網膜前駆細胞の増殖・分化を制御する分子メカニズムの解明が、網膜芽細胞腫に対する新たな治療法の開発につながると期待される。本研究では、核受容体 Tlx およびチロシンキナーゼ型受容体 VEGFR2 が、網膜前駆細胞およびミュラーグリア細胞の増殖・分化・恒常性維持に必要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Retinoblastoma is caused by deregulated proliferation of retinal progenitor cells, which normally differentiate into all types of retinal neurons and Müller glia. Therefore, it is expected that molecular mechanisms which regulate differentiation and proliferation of retinal progenitor cells can be novel targets to treat retinoblastoma. In this research program, we demonstrated that the nuclear receptor Tlx and the receptor tyrosine kinase VEGFR2 are co-expressed in retinal progenitor cells, and disruptions of these genes similarly resulted in abnormal development and impaired homeostasis of mouse retinal tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	540,000	3,440,000

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：網膜芽細胞腫、網膜前駆細胞、ミュラーグリア細胞、Tlx、VEGFR2

1. 研究開始当初の背景

網膜芽細胞腫では、放射線療法・眼球局所療法・化学療法の進歩によって眼球温存率が飛

躍的に向上した。

しかし、いずれの治療法においても重篤な副作用が問題となっており、腫瘍細胞に対して特異性・有効性の高い薬剤の開発が待望されている。

網膜芽細胞腫の発症および病態進展には、網膜前駆細胞の分化・増殖を制御する分子メカニズムの異常が示唆されているが、我々はこれまでに核受容体 Tlx が網膜前駆細胞の分化・増殖を制御することを報告している。

(Miyawaki, Uemura, et al. J Neurosci. 2004; Uemura, et al. J Clin Invest. 2006)

さらに、網膜芽細胞腫の培養細胞株において Tlx の発現が確認されている。

(Kato, et al. Mol Cell Biol. 2008)

ことから、網膜芽細胞腫の発症・進展における Tlx の関与が示唆される。

また、発生期の網膜前駆細胞がチロシンキナーゼ型受容体 VEGFR2 を発現することから、網膜前駆細胞における Tlx と VEGFR2 シグナルの機能的相関が予想された。

2. 研究の目的

本研究では、発生期マウスの網膜前駆細胞に発現する Tlx および VEGFR2 の発現局在および機能を解明することにより、網膜芽細胞腫に対する新しい治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス網膜における発現解析

① in situ hybridization 法 および免疫染色法

② Tlx-LacZ レポーターマウス

③ VEGFR2-LacZ レポーターマウス

④ VEGFR2-GFP レポーターマウス

(2) Tlx 遺伝子欠損マウスおよび網膜特異的 VEGFR2 遺伝子欠損

(Dkk3Cre;VEGFR2-flox)

マウスの表現型解析

① 網膜薄切標本および網膜フラットマウント標本における組織学的解析

② 成体マウスにおける網膜電図 (ERG) 検査

(3) 培養神経幹細胞における機能解析

① 成体ラット海馬由来神経幹細胞における遺伝子導入およびルシフェラーゼ・レポーター解析

4. 研究成果

(1) 発生期マウス網膜における Tlx および VEGFR2 の発現

発生期マウスの網膜では、Tlx および VEGFR2 が同一の網膜前駆細胞に発現することが確認された。

さらに網膜神経細胞 (神経節細胞、アマクリン細胞、双極細胞、水平細胞、視細胞) への

分化に伴って、いずれの遺伝子発現も低下し、最終的に成体網膜のミュラーグリア細胞が Tlx および VEGFR2 を恒常的に発現することが観察された。

(2) Tlx および VEGFR2 遺伝子欠損による網膜異常

通常の VEGFR2 ノックアウト (KO) マウスは、血液および血管の発達異常により胎生中期に致死となるため、網膜の解析が実施できない。本研究では、マウス網膜前駆細胞にて Cre 遺伝子組換え酵素を発現する Dkk3Cre トランスジェニックマウス (大阪大学・古川貴久博士より供与) と、VEGFR2 コンディショナル KO マウス (神戸大学・平島正則博士より供与) との交配により得られた

Dkk3Cre;VEGFR2-flox マウス

を解析し、網膜神経細胞およびミュラーグリア細胞における VEGFR2 シグナルの機能について検証した。

Dkk3Cre;VEGFR2-flox マウス

では出生率に異常を認めず、正常に発育したが、網膜神経細胞数が減少するために網膜厚が菲薄化することが明らかとなった。

さらに Dkk3Cre;VEGFR2-flox マウス

における網膜電図検査では、生後1ヶ月時点でコントロール群と差を認めないのに対し、生後6ヶ月時点では光刺激に対する応答が完全に消失することが確認された。

また、生後6ヶ月時点で神経網膜の顕著な菲薄化に伴う網膜血管の退縮が認められた。

これらの結果は Tlx-KO マウス

(米国 Salk 研究所・Ruth T Yu 博士より供与) の表現型と酷似する

(Miyawaki, Uemura, et al. J Neurosci. 2004; Uemura, et al. J Clin Invest. 2006)

ものであり、Tlx および VEGFR2 が階層的または協調的に網膜前駆細胞およびミュラーグリア細胞の増殖・分化・生存を促進することが示唆された。

(3) Tlx による MASH1 転写促進

成体ラット海馬由来の培養神経幹細胞では、Tlx が MASH1 遺伝子の転写を促進することにより、神経細胞への分化を能動的に促進することを明らかにした。

(4) 研究成果の意義と今後の展望

本研究の成果により、VEGFR2 が網膜神経組織の発生および恒常性維持に不可欠であることが明らかとなった。

今後は、VEGFR2 および Tlx の機能的相関を明らかにするとともに、これらの分子が網膜芽細胞腫の新たな治療標的となり得る可能性につき、さらに検証を進めることを予定している。

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 1 件)

① Elmi M, Matsumoto Y, Zeng ZJ, Lakshminarasimhan P, Yang W, Uemura A, Nishikawa S, Moshiri A, Tajima N, Agren H

Funa K

TLX activates MASH1 for induction of neuronal lineage commitment of adult hippocampal neuroprogenitors

Mol Cell Neurosci.

45:121-131, 2010.

査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植村 明嘉 (UEMURA AKIYOSHI)

神戸大学・大学院医学研究科・特命助教

研究者番号：30373278

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

① 東 範行 (AZUMA NORIYUKI)

国立成育医療センター・眼科・医長

研究者番号：10159395

(4) 研究協力者

鮎 恵子 (FUNA KEIKO)

スウェーデン Göteborg 大学