

## 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31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22700403

研究課題名（和文） 網膜障害条件下でミュラー細胞の細胞周期再開を制御する遺伝子の探索と機能解析

研究課題名（英文） Screening and functional screening of the genes which regulate the proliferation of Muller glia in damaged retina.

研究代表者

須賀 晶子 (SUGA AKIKO)

独立行政法人理化学研究所・網膜再生医療研究開発プロジェクト・研究員

研究者番号：70450400

研究成果の概要（和文）：

本研究では、マウス系統間で網膜傷害時のミュラー細胞の増殖程度に顕著な差があること、また GSK3 阻害剤などの既知の増殖促進因子に対する応答性もマウス系統間で異なることが分かった。マイクロアレイを用いて網膜傷害後にミュラー細胞の増殖に伴って発現量が上下する遺伝子群を解析した結果、クロマチン結合遺伝子、自然免疫応答に関わる遺伝子の発現量が傷害後のミュラー細胞の増殖程度に対応して変化することが分かった。

研究成果の概要（英文）：

In this research, we showed that the degree of proliferation of Müller glia after retinal damage was significantly less in B6 mice compared to other mouse strains. Furthermore, addition of GSK3 inhibitor did not affect the proliferation of Müller glia in the damaged retina from B6 mice, whereas GSK3 inhibitor significantly increased the number of proliferative Müller glia in other mouse strains. By comparing the genome-wide gene expression in retinas after damage between B6 and other mouse strain, we found that the expression patterns of chromosome remodeling factors and components of innate immune system were different associating with the proliferation of Müller glia.

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	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：網膜、ミュラーグリア細胞、前駆細胞、再生

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系組織のグリア細胞は、神経細胞への栄養供給と老廃物や神経伝達物質のリ

サイクルによって神経細胞がいる環境の恒常性維持に関わっている。脊椎動物の網膜では、3種類のグリア細胞（ミュラー細胞、

アストロサイト、ミクログリア)のうち、主にミューラー細胞が神経性網膜の恒常性維持を担っている。一方、網膜が傷害を受けると、脳や脊髄で傷害時に見られる反応性アストロサイトと同様にミューラー細胞でGFAPの発現が上昇し、正常組織でのミューラー細胞の機能に重要な遺伝子の発現が低下する。このようなミューラー細胞は繊維性グリアとして網膜の神経細胞の生存を妨げると考えられてきた。しかし、2001年以降に、ニワトリ、ラット、マウス、ゼブラフィッシュで、網膜の傷害後早い時期にミューラー細胞が細胞周期を再開して増殖し、網膜前駆細胞様のマーカーを発現して、さらにその細胞の一部が網膜の神経細胞のマーカーを発現するようになることが報告されてきた。これらの報告とともに、ミューラー細胞は発生的には網膜神経細胞と共通の前駆細胞から分化すること、また網膜の層構造に対して放射状グリアのように突起を伸ばしていること、マウス成体ミューラー細胞の遺伝子発現を調べると網膜前駆細胞との類似が見られることから、ミューラー細胞がグリア細胞として機能するだけでなく網膜傷害時には神経細胞再生の供給源となる静止状態にある前駆細胞ではないかという仮説が出てきている。

私たちの研究室では傷害網膜に Wnt タンパクを添加すると傷害後のミューラー細胞の増殖を促進できることを報告していたが、Wnt タンパクやその後同定された上皮細胞成長因子 (EGF)、インスリンと繊維芽細胞成長因子 (FGF)、Shh などを正常網膜に投与しても細胞増殖は見られず、ミューラー細胞が静止状態から増殖状態に移行するには網膜傷害によって引き起こされる何らかのシグナルが必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

1) 本研究では哺乳類網膜では魚類、鳥類に比較して傷害後に増殖するミューラー細胞の数が顕著に少ないこと、またそれまでに同定されていたミューラー細胞に対する増殖促進因子が正常網膜でミューラー細胞の増殖を開始させられないことに注目し、マウス網膜でミューラー細胞の増殖を抑制している因子は何か、傷害によって生じる何がミューラー細胞の細胞周期を再開させるのかを明らかにすることを目指した。

また、マウス網膜では障害条件下でミューラー細胞のごく一部しか増殖しないことから、ミューラー細胞の中に増殖しやすい細胞群がいる可能性が考えられた。そこで細胞増殖を蛍光で可視化できる遺伝子改変マウス Fucci を利用して増殖のごく初期の段階の遺伝子発現を増殖していないミューラー細胞と比較すれば増殖しやすさに関連したミューラー細胞のサブタイプを分類できると予

想していた。

## 3. 研究の方法

本研究では障害条件下での哺乳類網膜におけるミューラー細胞の増殖促進因子・増殖抑制因子を同定することを目的としたため、それまでにミューラー細胞の増殖およびミューラー細胞由来の網膜神経細胞再生モデルとして用いられることが多かったラットに比べて遺伝的な解析が容易なマウスをモデル動物として用いることにした。ミューラー細胞の増殖が見られるマウスの網膜傷害モデルは研究開始当初ウワバインの投与とN-メチルDアスパラギン酸の投与による網膜神経細胞傷害が報告されていたが、これらの追試および私たちの研究室でラット網膜の傷害モデルとして用いていたN-メチルニコソウレアの腹腔注射と網膜組織培養がマウスでも網膜傷害モデルとして使えるかどうかを検討し、網膜組織培養を用いることにした。この傷害モデルでは成体 (10 週齢) マウス眼球から神経性網膜を分離して培養すると視細胞に優先的にアポトーシスが見られるため、視細胞変性のモデルと考えられる。この傷害モデル確立の過程で当初予想していなかったマウス系統間でのミューラー細胞の増殖程度の顕著な差が見つかった。

ミューラー細胞の増殖促進因子・増殖抑制因子の同定にはミューラー細胞が増殖しやすいマウスと増殖しにくいマウスの間での遺伝子発現の差に基づいたマイクロアレイによる発現量の解析を用いた。

研究開始当初はミューラー細胞の増殖するサブタイプと増殖しないサブタイプの分離に細胞周期を蛍光で可視化できる Fucci マウスを利用する予定だったが、上記のようにマウス系統によってミューラー細胞の増殖程度が顕著に異なり、Fucci マウスの遺伝的背景である C57 BL/6 (B6) は障害条件下でもミューラー細胞がほとんど増殖しない系統だった。マウス系統ごとのミューラー細胞の増殖程度の比較と前駆細胞マーカーなどの遺伝子発現の確認に時間がかかったこと、また Fucci マウスを増殖しやすい系統のマウスと掛け合わせた F1 でなければミューラー細胞の増殖を確認できなかったことからミューラー細胞のサブタイプ同定のための Fucci マウスの利用は行わなかった。

## 4. 研究成果

### 1) 網膜傷害時のミューラー細胞の増殖程度にはマウス系統間で顕著な差がある

先の研究の方法で触れたようにマウス網膜でミューラー細胞の増殖が見られる傷害条件を検討した結果、網膜組織培養による傷害において、細胞増殖の指標である BrdU を取り込むミューラー細胞の数がマウス系統

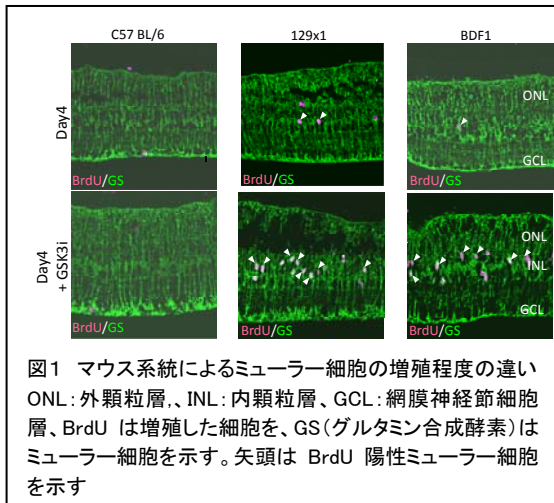


図1 マウス系統によるミュラー細胞の増殖程度の違い  
ONL:外顆粒層、INL:内顆粒層、GCL:網膜神経節細胞層、BrdU は増殖した細胞を、GS(グルタミン合成酵素)はミュラー細胞を示す。矢頭は BrdU 陽性ミュラー細胞を示す

によって大きく異なることが分かった(図1)。B6 マウスは網膜組織培養4日目のBrdU陽性ミュラー細胞の数が129マウスと比べて顕著に少なく、また129、BDF1、Balb/c、ICRマウスの各系統では網膜組織培養にWntシグナル活性化因子であるGSK3阻害剤を添加するとBrdU陽性ミュラー細胞の数が有意に増えるのに対し、B6マウスではミュラー細胞の増殖促進は見られなかった。

また、GSK3阻害剤だけでなく、網膜傷害時にミュラー細胞の増殖を促進するという報告がある上皮細胞成長因子(EGF)、繊維芽細胞成長因子(FGF)とインスリンの組み合わせ、FGFのみを同様に培地に加えた場合も、129マウス網膜ではミュラー細胞の増殖が促進されたのに対しB6マウス網膜では増殖の促進は見られなかった。

B6、129どちらの傷害網膜でも網膜前駆細胞に特徴的なPax6とChx10を共発現する細胞は検出され、また細胞周期のG1期のマーカーであるCyclinD1はB6、129どちらの網膜でも傷害後に発現が上昇してきたことから、B6マウス網膜のミュラー細胞はG1期からS期の間で止まってしまうと考えられた。ミュラー細胞由来の網膜再生研究ではマウスモデルを用いた報告がいくつかなされているが、ミュラー細胞の増殖が若いマウスでしか再現できない、in vivoでは見られない、など未だ再現性に議論が残る状態である。本結果はマウス系統による影響を初めて示したもので、実験系の確立に重要な意味を持つと考えられる。

2) ミュラー細胞の増殖に伴う網膜傷害後の遺伝子発現変化の特徴

ミュラー細胞の増殖を制御している仕組みを明らかにする目的で、傷害条件下でのミュラー細胞の増殖程度に差があったB6マウスと129マウスの網膜組織間での遺伝子発現をマイクロアレイを用いて比較した。遺

伝子発現の変化は大きく a) 傷害後 B6 マウス網膜で発現が上昇する遺伝子、b) 傷害後、129 マウス網膜で発現が低下する遺伝子、c) 傷害に関わらず B6 マウスで発現が高い遺伝子、d) 傷害に関わらず 129 マウスで発現が高い遺伝子、e) 傷害後、B6 マウスで発現が下がる遺伝子、f) 傷害後、129 マウスで発現が上昇する遺伝子、に分けられた。このうち(a)をミュラー細胞の増殖抑制因子候補、(f)をミュラー細胞の増殖促進因子候補、としてそれぞれの候補遺伝子の詳細を確認した。

興味深いことに、増殖促進因子候補には細胞内で機能するタンパク質をコードする遺伝子が多く含まれており、逆に増殖抑制因子候補には分泌性タンパク質やタンパク質の輸送に関わる因子が多く含まれていた。増殖促進因子候補をB6と129の間で発現量が大きい順に並べたところ、上位遺伝子に、発生中の脳の神経幹細胞の自己複製や神経分化に必要なクロマチン結合因子であるHmga2が含まれていた。in situ hybridizationによりHmga2は傷害された網膜の内顆粒層で一過的に発現が上昇し、さらに129マウス網膜では内顆粒層の一部の細胞で発現が維持されるのに対し、B6マウスではすぐに発現が下ることが分かった。逆に、増殖抑制因子候補には神経幹細胞の増殖を抑制する機能をもつクロマチン結合因子であるMbd1が含まれており、こちらは傷害後にB6マウス網膜の内顆粒層で発現が上昇した。これらの結果はミュラー細胞内のクロマチンレベルの変化が傷害後の増殖に関わること、またミュラー細胞が神経幹細胞・前駆細胞と同様の性質を獲得できる可能性を示している。

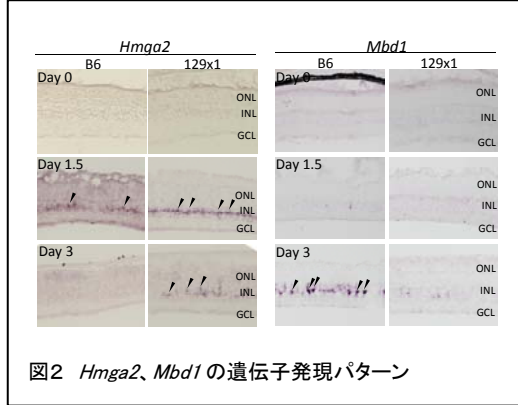


図2 Hmga2、Mbd1の遺伝子発現パターン

また、Gene Ontologyに基づくクラスタリングの結果、増殖促進因子候補には細胞周期を促進する因子が有意に濃縮されており、一方で増殖抑制因子候補には炎症や自然免疫応答にかかわる因子が有意に濃縮されていた。そこでToll様受容体(TLR)を介した自然免疫のシグナルがミュラー細胞の増殖に影響するかどうかを検討したところ、TLR4のリガンドであるリポ多糖を網膜組織培養

の培地に添加するとミューラー細胞の増殖が有意に抑制されることが分かった。TLR は細菌やウイルス由来の細胞壁成分や核酸を認識することが知られており、外界からの侵入物に対する初期の防御反応と考えられてきた。しかし最近の研究では神経幹細胞でもTLR が発現しており、神経幹細胞の増殖や神経細胞への分化傾向を制御していることも報告されている。TLR を介したシグナルがミューラー細胞の増殖をどのように制御しているのかは現在解析中である。またTLR などによる炎症応答の種間の違いが網膜再生能の違いに寄与しているとすれば、炎症反応のコントロールが哺乳類での網膜の再生を促す可能性が期待できる。

#### 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網膜再生と wnt シグナル

須賀晶子、高橋政代

医学の歩み 233 巻 10 号 p1037-1043、2010

(査読無)

[学会発表] (計2件)

##### ①Genetic difference in the proliferation of Müller glia after retinal damage in adult mouse

Suga A, Sadamoto K, Fujii M, and Takahashi M.

ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 10<sup>th</sup> Annual Meeting

Yokohama, Japan, June 13-16, 2012

##### ②Genetic influence on Müller glial cell proliferation after retinal damage in adult mouse

Suga A, Sadamoto K, and Takahashi M.

Stem Cells in Development and Disease 2011  
Berlin, Germany, September 11-14, 2011

[図書] (計1件)

##### ①網膜の幹細胞

須賀晶子

再生医療叢書 4 巻 p76-84、2013

産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：細胞膜透過性ダンベル型 rna およびその製造方法

発明者：阿部洋，伊藤嘉浩，阿部奈保子，鳥田美和子，中嶋裕子，須賀晶子，高橋政代

権利者：独立行政法人理化学研究所

種類：PCT/JP2011/056492

番号：

出願年月日：2011年3月11日

国内外の別：国外

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

須賀 晶子 (SUGA AKIKO)

独立行政法人理化学研究所・網膜再生医療研究開発プロジェクト・研究員

研究者番号：70450400

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし