

## 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 12 日現在

機関番号：82609

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890254

研究課題名（和文） 網膜グリアによる神経保護と再生能に関する研究

研究課題名（英文） Neuroprotection and regeneration by retinal glia

研究代表者

原田 知加子（HARADA CHIKAKO）

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・研究員

研究者番号：20435720

研究成果の概要（和文）：本研究では網膜 Müller グリア細胞あるいは周囲の神経細胞から、神経栄養因子受容体である TrkB が欠損する領域特異的ノックアウトマウスを作製した。それらの解析を通して、グリア細胞における神経栄養因子のシグナル伝達が神経保護と再生の両面において重要な役割を持つことを示した。さらに今後の研究にも応用可能な領域特異的マウスの作製と利用に道筋をつけることができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we prepared two conditional knockout mice, in which neurotrophic factor receptor (TrkB) is absent from retinal Müller glia or other neural cell types. By analyzing these mice, we found that neurotrophic factor signaling in glia is necessary for neuroprotection of surrounding retinal neurons and regeneration of glial cells into neural cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：グリア、神経保護、神経再生

## 1. 研究開始当初の背景

（1）神経細胞は最終分化を終えると増殖能・分化能が消失し、神経組織が障害を受けても再生しない。しかし近年では成熟脳に神経前駆細胞として radial glia が存在するのと同様に、網膜においても特異的グリアである Müller 細胞が神経細胞に分化可能と考え

られつつある（Fischer & Reh, Nat Neurosci, 2001; Ooto et al., PNAS, 2004）。

（2）しかし一方で Müller 細胞は他の網膜神経細胞が全て分化した後に出現することが知られており、発生過程の網膜前駆細胞と障害時の神経前駆細胞としての Müller 細胞との関係には不明な点も多い。加えて Müller

細胞は astrocyte、radial glia あるいは oligodendrocyte の性質を併せ持つ特殊なグリアと考えられており、その特異性・多面性が注目されているが、詳細な機能が解明されているとはいえない (Harada et al., Genes Dev, 2007)。

## 2. 研究の目的

網膜 Müller グリア細胞特異的に遺伝子欠損が可能な領域特異的ノックアウトマウスを作製し、網膜グリアが周囲の神経細胞の生死に関与するか、あるいは変性網膜において再生能を発揮するかを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 網膜 Müller グリア細胞に cre が発現する human GFAP-cre mouse を活用した (Zhu et al. Development, 2005)。そして網膜における主要な神経栄養因子である BDNF の受容体である TrkB に注目し、TrkB flox/flox : GFAP-Cre mouse (TrkB GFAP KO) を完成させた。

(2) 一方で網膜神経節細胞とアマクリン細胞から神経特異的に TrkB が欠損する TrkB flox/flox : ckit-Cre mouse (TrkB ckit KO) を作成した。

(3) 両マウスの眼球内にグルタミン酸を投与し、網膜神経節細胞死の定量を行った。

(4) さらに *N*-methyl-*N*-nitrosourea の腹腔内投与を行い、視細胞変性網膜を作製して、視細胞死の定量を行った。神経細胞の再生については、BrdU を取り込んだ Müller 細胞と神経細胞マーカーによる染色を行い、陽性細胞数を定量化した。

## 4. 研究成果

(1) 意外なことに、これら2種類のマウス網膜では、グルタミン酸毒性による網膜神経節細胞死は同程度であることがわかった。また TrkB GFAP KO mouse においては、BDNF が薬物投与による視細胞変性を抑制できないだけでなく、野生型マウスでは観察される Müller 細胞の増殖や視細胞マーカーの発現 (Müller 細胞から視細胞への分化転換) も観察されなかった。これらの結果は Müller 細胞における BDNF-TrkB シグナル伝達が神経保護と再生の両面において、重要な役割を持つことを示している。

(2) またこの遺伝学的モデルは、中枢神経系組織のグリアとニューロンで特異的に働く遺伝子の機能を、in vivo で調べられる系を提供している。

(3) 以上のように本研究ではグリアと神経栄養因子の機能の新たな側面について、今後の参考となる大きな知見を得ただけでなく、今後の研究で使用する重要な領域特異的ノックアウトマウスの作成と利用に道筋をつけることができた。

## 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 13 件)

1. Namekata, K., Kimura, A., Kawamura, K., Guo, X., Harada, C., Tanaka, K. and Harada, T. Dock3 attenuates neural cell death due to NMDA neurotoxicity and oxidative stress in a mouse model of normal tension glaucoma. Cell Death and Differentiation (in press) 査読有
2. Katome, T., Namekata, K., Guo, X., Semba, K., Kittaka, D., Kawamura, K., Kimura, A., Harada, C., Ichijo, H., Mitamura, Y. and Harada, T. (2013) Inhibition of ASK1-p38 pathway prevents neural cell death following optic nerve injury. Cell Death and Differentiation 20(2), 270-280, 2013. doi:10.1038/cdd.2012.122. 査読有
3. 原田知加子、原田高幸、網膜変性疾患と MAP キナーゼ、査読無、Clinical Neuroscience 31(6), 705-706, 2013.
4. 香留 崇、行方和彦、郭 暁麗、仙波賢太郎、橘高大二、川村和人、木村敦子、原田知加子、一條秀憲、三田村佳典、原田高幸、査読無、ASK1-p38 経路の阻害は視神経外傷後の神経細胞死を抑制する。日眼会誌 117(2), 161, 2013.
5. Katome, T., Namekata, K., Naito, T., Semba, K., Guo, X., Harada, C., Harada, T. and Mitamura, Y. Expression of promyelocytic

- leukemia protein and vascular endothelial growth factor in aqueous humor and vitreous fluid in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Research and Clinical Practice* 98(2), 9-11, 2012. doi:10.1016/j.diabres.2012.09.020. 査読有
6. Namekata, K., Watanabe, H., Guo, X., Kittaka, D., Kawamura, K., Kimura, A., Harada, C. and Harada, T. Dock3 regulates BDNF-TrkB signaling for neurite outgrowth by forming a ternary complex with Elmo and RhoG. *Genes to Cells* 17(8), 688-697, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2443.2012.01616.x. 査読有
7. Namekata, K., Harada, C., Guo, X., Kimura, A., Kittaka, D., Watanabe, H. and Harada, T. Dock3 stimulates axonal outgrowth via GSK-3 $\beta$ -mediated microtubule assembly. *Journal of Neuroscience* 32(1), 264-274, 2012. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4884-11.2012. 査読有
8. 行方和彦、原田知加子、郭 曉麗、木村敦子、橘高 大二、渡邊快記、原田高幸、査読無、Dock3 はグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )による微小管重合を介して軸索伸長を促進する. *日眼会誌* 116(5), 527, 2012.
9. Harada, C., Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Nakamura, K., Tanaka, K., Parada, L.F., and Harada, T. Glia- and neuron-specific functions of TrkB signalling during retinal degeneration and regeneration. *Nature Communications* 2: 189, 2011. doi: 10.1038/ncomms1190. 査読有
10. Guo, X., Harada, C., Namekata, K., Kimura, A., Mitamura, Y., Yoshida, H., Matsumoto, Y., and Harada, T. Spermidine alleviates severity of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52(5), 2696-2703, 2011. doi: 10.1167/iovs.10-6015. 査読有
11. 郭 曉麗、原田知加子、行方和彦、木村敦子、三田村佳典、吉田 寛、松本 陽、原田高幸、査読無、Spermidine 投与による実験的自己免疫性脳脊髄炎の軽症化. *日眼会誌* 115(8), 729, 2011.
12. 原田知加子、郭 曉麗、行方和彦、木村敦子、中村和昭、田中光一、Luis F. Parada、原田高幸、査読無、網膜の変性と再生過程におけるグリアおよび神経特異的な TrkB シグナルの機能解析. *日眼会誌* 115(7), 637, 2011.
13. 郭 曉麗、原田知加子、行方和彦、松沢 厚、Monsterrat Camps、Hong Ji、Dominique Swinnen、Catherine Jorand-Lebrun、Mathilde Muzerelle、Pierre-Alain Vitte、Thomas Rückle、木村敦子、神山邦子、松本 陽、一條秀憲、原田高幸、査読無、TLR-ASK1-p38 経路による神経炎症と脱髄症状の制御. *日眼会誌* 115(5), 485, 2011.
- [学会発表] (計 7 件)
1. Kazuhiko Namekata, Chikako Harada, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Takayuki Harada. The role of Dock3 in axon regeneration following optic nerve injury. XX International Congress of Eye Research (ISER 2012). 2012.7.24., Berlin, Germany.
2. Xiaoli Guo, Chikako Harada, Kazuhiko Namekata, Atsuko Kimura, Takayuki Harada. Session "Macrophages and microglial regulation of ocular inflammation" ASK1 inhibition ameliorates optic neuritis by modulating glial innate immunity. XX International Congress of Eye Research (ISER2012). 2012.7.23., Berlin, Germany.
3. 原田高幸、行方和彦、原田知加子. Dock3 によるマウス視神経軸索再

生効果の検討. 第 116 回 日本眼科学会総会. 平成 24 年 4 月 6 日  
東京国際フォーラム

(3) 連携研究者  
なし

4. Takayuki Harada, Xiaoli Guo, Kazuhiko Namekata, Luis F. Parada, Chikako Harada. Glia- and neuron-specific functions of TrkB signaling during retinal degeneration and regeneration. 8th World Congress of Neuroscience, International Brain Research Organization (IBRO). 2011.7.18., Florence, Italy.
5. Takayuki Harada, Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Kohichi Tanaka, Hidenori Ichijo, Chikako Harada. ASK1 deficiency attenuates neural cell death in a mouse model of normal tension glaucoma. The 26th Asia Pacific Academy of Ophthalmology (APAO) Congress. 2011.3.22., Sydney, Australia.
6. Kazuhiko Namekata, Chikako Harada, Xiaoli Guo, Takayuki Harada. Optic nerve regeneration is enhanced in Dock3 overexpressing transgenic mice. The 26th Asia Pacific Academy of Ophthalmology (APAO) Congress. 2011.3.22., Sydney, Australia.
7. Xiaoli Guo, Chikako Harada, Kazuaki Nakamura, Atsuko Kimura, Hidenori Ichijo, Takayuki Harada. ASK1 inhibition ameliorates optic neuritis by modulating glial innate immunity. The 26th Asia Pacific Academy of Ophthalmology (APAO) Congress. 2011.3.22., Sydney, Australia.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

原田 知加子 (HARADA CHIKAKO)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・研究員

研究者番号：20435720

##### (2) 研究分担者

なし