

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592685

研究課題名(和文)黄斑疾患の発症機序における網膜幹細胞の関与

研究課題名(英文)Retinal stem cell in the pathogenesis of macular diseases

研究代表者

池田 恒彦 (IKEDA, TSUNEHICO)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：70222891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：中心窩に神経幹細胞が存在するという仮説のもとに、サル眼を用いて神経幹細胞マーカー(Nestin, PAX6, SOX2)の遺伝子発現を網膜各部位で調べた。カニクイザルの中心窩、赤道部、最周辺部の網膜を1mm×1mm摘出しRNAを抽出した。リアルタイムPCR法により各サンプル中の遺伝子発現を定量した。Nestinは中心窩に発現が最も多く、赤道部、最周辺部では少なかった。PAX6は、各部位で差は見られなかった。SOX2は最周辺部に最も発現が高く、赤道部、中心窩にいづくにつれて低下した。黄斑部にはNestin陽性の未分化な細胞が多く、種々の黄斑疾患の病態に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Based on the hypothesis that undifferentiated retinal stem cell (RSC)-like cells exist in the fovea, we investigated the expression sites of neural stem cell (NSC)-related genes in the monkey retina. Flat-mounted retina samples were prepared using cynomolgus monkeys eye. 1-mm x 1-mm blocks of the retina at the fovea, mid-periphery, and extreme periphery were excised. These samples were used for real-time polymerase chain reaction analysis of the NSC-related gene (nestin, PAX6, and SOX2) expression at each site. Nestin expression was high in the fovea, with a lower expression in the mid-periphery and extreme periphery. No differences in PAX6 gene expression were found in the fovea, mid-periphery, and extreme periphery. SOX2 expression was highest in the extreme periphery, with decreased expression in the mid-periphery and fovea. Our finding that nestin expression was highest in the fovea suggests that foveal retinal cells may be related to the onset of macular diseases

研究分野：分子生物学

キーワード：網膜幹細胞 遺伝子発現 黄斑部 リアルタイムPCR 黄斑円孔 黄斑上膜

1. 研究開始当初の背景

近年、中枢神経系にも幹細胞が存在することが報告され再生医療の面からも注目されている。網膜と毛様体の境界部いわゆる ciliary marginal zone には神経細胞、グリア細胞、視細胞への分化能を有する網膜幹細胞が存在することが報告されている。幹細胞はこのような組織の境界部以外に、小腸の陰窩 (crypt)、毛胞、皮膚の真皮などのなどの陥凹した部位にも存在し、また角膜上皮の幹細胞が存在する輪部へは血管の侵入が認められないように無血管の部位にも存在することが多いことなどより、筆者らは、このような解剖学的な所見を併せ持つ中心窩にも網膜幹細胞様の未分化な細胞が存在するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

サル眼を用いて神経幹細胞のマーカーであるネスチン、PAX6、SOX2 の遺伝子発現を網膜各部位でリアルタイム PCR 法により調べることを目的とした。

3. 研究の方法

1) サル眼網膜の摘出と RNA 抽出

カニクイザルを安楽死させた後、両眼球を摘出し、各々眼球を角膜輪部近くで半切り、角膜、虹彩、水晶体、硝子体を切除してアイカップを作成した。その後、網膜のフラットマウントを作成した、実体顕微鏡下で中心窩、中間周辺部、最周辺部の網膜を 1mm×1mm のブロックとして摘出した。摘出後 RNase の活性を抑え、細胞内の RNA を安定化させる目的で RNAlater に浸潤した後、RNA を抽出した。サンプルは -80 ディープフリーザーで保存した。

2) プライマーの設計と合成

タカラバイオ社プライマー設計システム (Perfect Real Time サポートシステム <http://www.takara-bio.co.jp/prt/intro.htm>) のアルゴリズムを用いて、目的遺伝子

(Nestin, PAX6, SOX2)、標準遺伝子 (GAPDH) に対するリアルタイム PCR 用のプライマーを設計した。

3) cDNA の合成

前処理後の各検体について、Prime Script® RT reagent Kit (Perfect Real Time, タカラバイオ Code:RR037A) を用いて cDNA を合成した。

4) リアルタイム PCR と検量線用サンプルの選定

合成した cDNA を鋳型として、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ Code:RR820A) を用いてインターカレーター法によるリアルタイム PCR 反応を目的遺伝子および標準遺伝子に対して行った。反応には Thermal Cycler Dice® Real Time System II (タカラバイオ Code:TP900) を使用し、Ct 値は、2nd Derivative Maximum (SDM) 法により算出した。得られた結果をもとに、遺伝子ごとに発現量が多いサンプルの中から検量線作成用サンプルを選定した。

5) リアルタイム PCR と検量線の作成

検量線用サンプルを 8 段階に段階希釈してリアルタイム PCR 反応を行い、得られた Ct 値と希釈系列から各解析対象遺伝子の検量線を作成した。

6) 各サンプルの Ct 値の測定

各サンプルとも total RNA 量に換算して 10ng 相当を 1 反応に用い、N=2 で反応を行った。得られた Ct 値と検量線から、各遺伝子の定量値 (Qty (SDM)) を算出した。

7) 相対定量値の算出

各サンプルについて、標準遺伝子の Qty (SDM) の平均値 (Qty Avg. (SDM)) を指標に目的遺伝子の Qty (SDM) の平均値 (Qty Avg. (SDM)) を標準化することにより、各サンプル中の目的遺伝子の相対定量値 (Rel. Qty (SDM)) を算出した。相対定量値の算出にはソフトウェア「Multiplate RQ」

(タカラバイオ)を用いた。

4. 研究成果

ネスチンは中心窩に発現が最も多く、中間周辺部、最周辺部では少なかった。PAX6は、中心窩、中間周辺部、最周辺部ともに差は見られなかった。SOX2は最周辺部に最も発現が高く、中間周辺部、中心窩にいくにつれて発現は低下した。今回の結果から、以前に我々が施行したサル眼の組織切片の結果(Sugiyama T, et al: Ophthalmic Res 2006;38(4):201-8.)と同様に、ネスチンの発現が中心窩で高いことを確認できた。しかしPAX6では各部位で遺伝子発現に差は見られなかった。Pax6は中心窩の形成に関与しており、網膜色素上皮に発現させると網膜細胞に分化転換(transdifferentiation)するとされている。おそらく発生の初期には中心窩網膜に高発現しているのではないかと考えられるが、成人サルでは差がなくなっているのかもしれない。SOX2についてはネスチンの結果とは逆で、中心窩から周辺にいくに従い遺伝子発現は増加した。SOX2は網膜幹細胞の自己複製をコントロールする転写調節因子として知られているが、ラットの成体の脳においては神経前駆細胞だけでなくアストロサイトにも発現していることが報告されている。網膜においてもアストロサイトなどのグリア細胞においてSOX2が発現しているという報告があるが、中心窩は無血管であり、アストロサイトが少ないために、SOX2の発現が低かった可能性が考えられる。

魚類と鳥類の成体網膜では傷害を受けると網膜全体に存在するミュラー細胞が神経前駆細胞様の細胞となって増殖し、網膜の神経細胞とミュラー細胞自身に分化することが報告されている。このような網膜の再生は哺乳類の網膜では起こらないと長く考えられてきたが、近年成体哺乳類の網膜でもミュラー細胞由来の再生が起こることも報告されている。今回の研究では網膜の全層を切除し

ているため、感覚網膜のどの細胞がネスチンを発現しているかは不明であるが、我々の以前のサル眼を用いたネスチンの免疫染色では内顆粒層およびこれに連続する中心窩にネスチン陽性細胞が多く見られた。このことは、感覚網膜内のミュラー細胞あるいは中心窩に存在するミュラーセルコーンにネスチンが発現している可能性が考えられる。網膜は機械的傷害や低酸素などの暴露をうけるとネスチン発現が亢進することが知られている。Bhatiaらは、成人の剖検眼を用いて、網膜の各部位において、ミュラー細胞における神経幹細胞マーカーの発現を免疫染色で調べている(Bhatia B, et al: Exp Eye Res. 2009;89(3): 373-82)。その結果Vimentinとネスチン共陽性の細胞は主に内顆粒層に見られたとしており、ミュラー細胞の可能性が高いとしている。また、Vimentinとネスチン共陽性の細胞は網膜最周辺部に多く、後極に向かって減少していたが、後極にも共陽性のミュラー細胞が相当数存在していたと報告している。しかし、この研究では中心窩周囲に限っての検討は行っていない。

胎生期のミュラー細胞はネスチン陽性であることが知られているが、成人になってもネスチン陽性のミュラー細胞は網膜のほぼ全域にわたって存在すると考えられる。今回の我々の結果では、中心窩は他の部位と比較してその数が相対的に多い可能性が考えられる。すなわち、ネスチン陽性細胞の網膜における分布の違いが疾患の発症に関与している可能性がある。現時点ではこれを網膜幹細胞であるとする根拠には乏しいが、もし黄斑部にネスチン陽性の未分化なミュラー細胞が多く存在するのが事実であれば、黄斑上膜、黄斑円孔、黄斑浮腫など、黄斑部に特異的に生じる疾患が多いこととの関連があるのかもしれない。今後、本研究をさらに発展させることで、黄斑疾患の病態が解明でき、新たな治療に結びつく可能性があると考え

られる。

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 4 件)

Ikeda T, Nakamura K, Oku H, Morishita S, Fukumoto M, Suzuki H, Kida T, Horie T, Sugiyama T. The role of tryptase and anti-type collagen antibodies in the pathogenesis of idiopathic epiretinal membranes. Clinical Ophthalmol 査読有 in press

Okubo A, Oku H, Horie T, Kida T, Sugiyama T, Nakamura K, Ikeda T. Changes in expression of nestin, CD44, VEGF, and glutamine synthetase by mature Müller cells after dedifferentiation. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics 査読有 in press.

Nakaizumi A, Fukumoto M, Kida T, Suzuki H, Morishita S, Satou T, Oku H, Ikeda T, Nakamura K. Measurement of serum and vitreous concentrations of anti-type collagen antibody in diabetic retinopathy. Clin Ophthalmol 20:543-547, 2015 査読有 10.2147/OPHT.S75422.

Kakurai K, Sugiyama T, Kurimoto T, Oku H, Ikeda T. Involvement of P2X7 receptors in retinal ganglion cell death after optic nerve crush injury in rats. Neuro Letters 532:237-241, 2013 査読有 10.1016/j.neulet.2012.11.060.Epub 2012 Dec 20

[学会発表](計 5 件)

Ikeda T, Nakamura K, Oku H, Morishita S, Fukumoto M, Suzuki H, Kida T, Horie T, Sugiyama T, Takai S. The role of tryptase and anti-type collagen antibodies in the pathogenesis of idiopathic epiretinal membranes. 2015 ARVO Annual Meeting, 2015.5.7, Colorado(USA)

池田恒彦, 森下清太, 福本雅格, 鈴木浩之, 喜田照代, 奥 英弘, 中村公俊, 高井真司. 特発性黄斑上膜の病態におけるトリプターゼと2型コラーゲン抗体の関与. 第119回日本眼科学会総会, 2015.4.16, ロイトン札幌(北海道札幌市)

池田恒彦. 糖尿病と自己免疫疾患. 第16回 Japan Macula Club, 2014.8.24, 蒲郡クラシックホテル(愛知県蒲郡市)

池田恒彦. 特発性黄斑円孔の発症機序. 第6回 Retinal Research Meeting,

2013.11.30, 東京 JP ホールタワー & カンファレンス5F(東京都千代田区)

池田恒彦. 臨床所見から考える網膜硝子体疾患の病態と治療. 第149回宮崎眼科医会講習会(招待講演). 2012.10.20, ホテルスカイタワー(宮崎県宮崎市)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

池田恒彦 (Ikeda Tsunehiko)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70222891

(2)研究分担者

奥 英弘 (Oku Hidehiro)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90177163

杉山哲也 (Sugiyama Tetsuya)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 20298764

栗本拓治 (Kurimoto Takuji)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50388815

(3)連携研究者

高井真司 (Takai Shinji)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80288703