

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861656

研究課題名(和文) 網膜傷害時におけるミュラー細胞の脱分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of inhibition of Muller cell dedifferentiation and proliferation

## 研究代表者

齋藤 文典 (SAITOH, FUMINORI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：50435723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：視細胞変性モデル動物におけるミュラー細胞の増殖制御機構について解析を行った。視細胞変性に伴い、ミュラー細胞でNotch1および2の遺伝子発現が誘導されることを確認した。視細胞変性後に多くのミュラー細胞は増殖するが、Notch阻害剤により細胞増殖は阻害された。Notch2は蛋白レベルでの発現検出が出来たが、Notch1は検出限界以下であった。初代培養ミュラー細胞を用いてNotch1蛋白について解析した結果、プロテオソームの阻害剤によりNotch1蛋白量が増加した。これらの結果から、プロテオソーム系を介した分解によるNotch1の制御機構が、哺乳類において網膜再生阻害の要因であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the mechanism of Muller cell dedifferentiation and proliferation in rodent models of photoreceptor damage. We examined expression Notch1 and Notch2 at mRNA and protein levels after photoreceptor damage. We found that expression of Notch1 and Notch2 mRNA are highly induced. Notch2 protein expression is also changes, accordingly. In contrast, we didn't detect Notch1 protein. We found that expression of Notch1 protein leveles increase with proteasome inhibitor. Our findings reveal that the degradation of Notch protein by ubiquitin-proteasome system may be one of the mechanisms that limit retinal regeneration in mammals.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ミュラー細胞 網膜

### 1. 研究開始当初の背景

魚類などの下等脊椎動物では、網膜のグリアであるミュラー細胞が網膜内在性の幹細胞として組織の維持、修復に関わることが知られている。特にゼブラフィッシュでは、網膜傷害後にミュラー細胞が脱分化し、神経細胞を再生して視機能が完全に回復することから、網膜再生のモデルとして研究が進められている。一方、哺乳類のミュラー細胞も網膜傷害後に増殖し、神経細胞に再分化することが報告されているが、その再生能力は極めて乏しい。細胞増殖を促進する Wnt シグナルを活性化することで、ミュラー細胞の増殖は亢進するが、視機能を回復するには、新生細胞の数が不十分である。哺乳類網膜の再生能が抑制されている原因は全く不明であり、再生医療への応用を実現するためには、その分子基盤の解明が必須である。

当研究室では、アルキル化剤である MNU を投与することで視細胞変性モデルを作製し、哺乳類のミュラー細胞の増殖と神経再生を制御する分子機構について解析を進めている。ラットでは視細胞変性後にほぼ全てのミュラー細胞が細胞周期に進入する。ところが、細胞周期に入ったミュラー細胞は即座に DNA 損傷を起こし、アポトーシスが誘導されてミュラー細胞数は逆に減少した(申請者ら、未発表データ)。この結果より、哺乳類のミュラー細胞は脱分化に必要な因子が欠如しており、神経再生には至らないと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、哺乳類の網膜再生の阻害に関与する分子を同定し、さらに、それらの分子を遺伝子操作により改変することにより、ミュラー細胞の脱分化と神経再生の賦活化を試みる。

### 3. 研究の方法

ラット (Wistar) にアルキル化剤 Methyl Nitrosourea (MNU) を腹腔内に単回投与 (70 mg/kg BW) 視細胞変性を誘導した。MNU 投与後の網膜を採取し、4% PFA で固定し免疫組織学に、また組織を新鮮凍結して mRNA を抽出し定量的 RT-PCR に、さらに、タンパク質を抽出して、ウェスタンブロットに用いた。

各 Notch の活性化ドメインをタンパク発現ベクターにサブクローニングした。また、各 Notch のノックダウン用のプラスミドは Sigma より購入した。これらのプラスミドと、レンチウィルスのパッケージング用のプラスミドを HEK293T 細胞に遺伝子導入し、各ウィルスベクターを作製した。

生後 12 日目のラットの網膜を分散培養し、高純度の初代ミュラー細胞を培養し実験に用いた。

### 4. 研究成果

(1) 視細胞変性後の Notch の mRNA の変化  
MNU 投与後の網膜で Notch 1 および 2 の発現の誘導が見られた (図 1)。

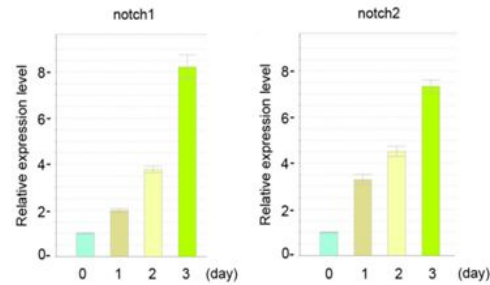


図 1 : MNU 投与後 1 から 3 日目の各 Notch の mRNA の変化を定量的 RT-PCR で解析した。各サンプルは GAPDH で基準化した。グラフは、MNU 投与なしのサンプルにおける各 Notch の量の相対値。

(2) 視細胞変性後の Notch のタンパク質の変化  
MNU 投与後の網膜で Notch2 をタンパクレベルで検出した。Notch2 の発現は (1) の mRNA の変化と相関していた。それに対して、Notch1 はタンパクレベルでは、ほとんど検出出来なかった (図 2)。

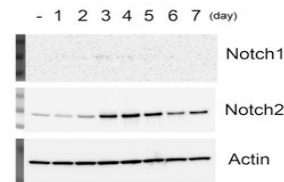


図 2 : MNU 投与後 1 から 7 日目の各 Notch のタンパク質の変化をウェスタンブロットで解析した。

(3) 視細胞変性後のミュラー細胞における Notch のタンパク質の変化  
MNU 投与 3 日後にミュラー細胞で Notch2 が発現することが明らかになった。それに対して、Notch1 はほとんど検出出来なかった (図 3)。

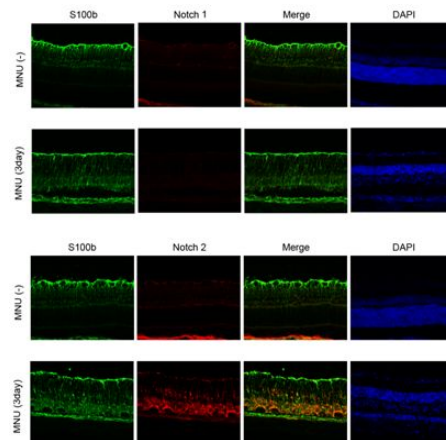


図 3: MNU 投与 3 日後の各 Notch の変化。各 Notch (赤)、ミュラー細胞を S100β (緑) および核 (青) で染色した。

(4)視細胞変性後の Notch の機能の解析  
Notch が視細胞変性後のミュラー細胞の増殖に影響を与えるかどうかを解析した。DAPTの投与によりMNU投与4日後のSOX9陽性のミュラー細胞の数および、4日目に細胞周期（S期）の細胞数が減少した。

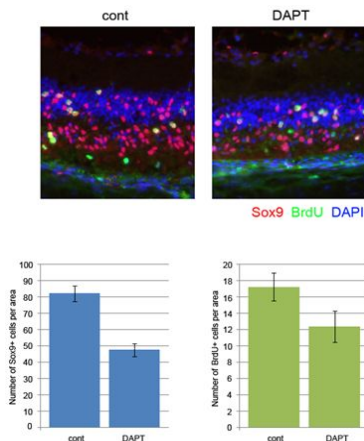


図4：Notchの阻害剤によるミュラー細胞の増殖能の変化 Notchの阻害剤であるDAPTを硝子体内に投与した後、MNUを腹腔内に投与し視細胞の変性を誘導した。4日後に増殖している細胞をBrdU(緑)でラベルし、ミュラー細胞のマーカであるSOX9(赤)および核(青)で染色した。

(5)ミュラー細胞の増殖に対する各Notchの役割  
ミュラー細胞の増殖に各Notchが関与しているかどうかを解析するために、Notchシグナルの下流因子であることが知られているHes遺伝子の遺伝変化を指標として解析を行った。レンチウイルスベクターを用いて活性型のNotch1を過剰発現させた初代培養ミュラー細胞で、Hes5の発現誘導が見られた(図5(左))。別の細胞種のNeuro2Aで各Notch強制発現させた結果、Notch1と2でHes5の発現誘導が見られることから(図5(右))、ミュラー細胞ではNotch1の活性化が増殖に重要であると考えられる。

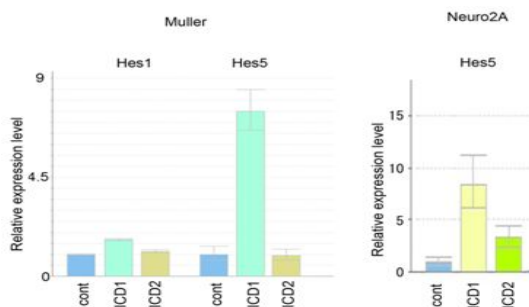


図5：各Notchの活性化によるミュラー細胞でのHesの発現変化 初代培養ミュラー細胞(左)またはNeuro2A細胞(右)に、レンチウイルスベクターを用いて各活性型Notchを過剰発現させたのち、Hes1およびHes5発現量を定量的RT-PCRで解析した。各サン

プルは、GAPDHで基準化した。グラフは、GFPを発現するコントロールベクターにおける相対値。

(6)Notch1のタンパクレベルでの発現制御を受けているかどうかの解析 Notch1が翻訳後修飾により発現制御されているかどうかを、初代培養ミュラー細胞を用いて解析した。ミュラー細胞をMG132で処理することで、Notch1のタンパク量が増加することが明らかになった。Notch1の増加はNH<sub>4</sub>Clの処理では見られなかった(図6)。また、MG132処理によるNotch1のmRNAの変化は見られなかった(データ記載なし)。

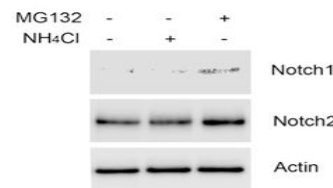


図6：初代培養ミュラー細胞をプロテアソーム阻害剤であるMG132または、リソソーム阻害剤であるNH<sub>4</sub>Clで処理した後、Notchのタンパク質をウェスタンブロットで解析した。

(7)視細胞変性後に発現が誘導させるユビキチンリガーゼの解析 Notchがプロテアソーム系で分解されるためには、ユビキチンリガーゼによるユビキチン化が必要である。このことから、Notchのユビキチン化に関与することが報告されている各ユビキチンリガーゼの、視細胞変性後の発現変化を解析した。その結果、ユビキチンリガーゼDeltexの発現が視細胞変性後に誘導されることが明らかになった(図7)。

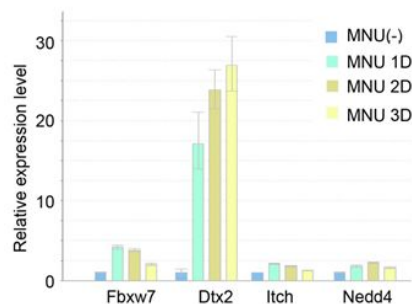


図7：MNU投与後1から3日目の各ユビキチンリガーゼのmRNAの変化を定量的RT-PCRで解析した。各サンプルはGAPDHで基準化した。グラフは、MNU投与なしのサンプルにおける各ユビキチンリガーゼ量の相対値。

#### 4. 結論

視細胞変性後にミュラー細胞は脱分化し

細胞周期へ進入し増殖するが、神経細胞への再分化の前に DNA 損傷を起こし細胞死が誘導される。

本研究から、視細胞変性後のミュラー細胞の増殖には Notch1 の活性化が必要であることが明らかになった。しかしながら、Notch1 の半減期は非常に短いことから、ミュラー細胞の脱分化にも影響すると考えられる。今後、Notch の安定化と視細胞再生に向けて研究を進めていきたい。

## 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)

[学会発表](計5件)

蔣池かおり、齋藤文典、蔣池勇太、藤枝弘樹「網膜傷害時におけるミュラーグリアの食能獲得」第120回日本解剖学会・全国集会、2015.3.23、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

須藤則広、齋藤文典、藤枝弘樹「マウス網膜発生期におけるエピジェネティック因子群の発現解析」第120回日本解剖学会・全国集会、2015.3.22、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

野村かおり、齋藤文典、早川亨、根岸春樹、藤枝弘樹「網膜変性後 Muller グリアに起こる DNA 損傷と細胞死について」第36回日本神経科学学会、2014.6.20、京都国際会議場(京都府・京都市)

野村かおり、齋藤文典、蔣池勇太、藤枝弘樹「網膜の変性による Muller グリアの細胞周期進入と DNA 損傷応答」第119回日本解剖学会・全国集会、2014.3.29、自治医科大学(栃木県・下野市)

須藤則広、齋藤文典、藤枝弘樹「マウス網膜発生期におけるエピジェネティック因子群の発現解析」第119回日本解剖学会・全国集会、2014.3.28、自治医科大学(栃木県・下野市)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

齋藤 文典 (SAITOH FUMINORI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：50435723