

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440125

研究課題名(和文) 網膜再生の両生類モデルを用いた幹細胞性の維持と細胞分化の機構

研究課題名(英文) Molecular analysis of the stem cell nature in the amphibian model of retinal regeneration

研究代表者

荒木 正介 (Araki, Masasuke)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00118449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：網膜組織をすべて除去しても再生可能な動物は、両生類だけである。研究代表者らは、従来、有尾両生類イモリにおいてだけ観察されていたこの現象がカエル(*Xenopus laevis*、*Xenopus tropicalis*)でもおこることを発見し、そのモデル培養系を確立して研究を進めている。本研究では、(1)再生起源となる色素上皮細胞がいかんして幹細胞化するのかを、細胞外基質や炎症との関係に注目して研究した。その結果、細胞外基質からの遊離および炎症性反応の惹起が再生に重要なステップである事を器官培養系を用いて明らかにした。またブタの虹彩組織を用い、虹彩由来の網膜幹細胞の特異な性質について研究した。

研究成果の概要(英文)：Amphibians are able to regenerate the whole retinal tissue when surgically removed. This ability had been considered to be limited only to the urodeles until Araki's group discovered that the complete regeneration occurs also in *Xenopus*. We established different organ-culture systems in which the retinal pigment epithelial (RPE) cells transdifferentiate into retinal cells. In the present study, we analyzed the interaction of RPE cells and basement membrane and the initiation of inflammatory response. The results indicate that inflammatory cytokines induce Matrix metalloproteinase (MMP) gene expression, which subsequently induces RPE cells to detach from the basement membrane. We also attempted to reveal the stem cell nature of the porcine iris tissue-derived cells by using the Matrigel embedding culture, and found that immediately after transferred to the culture, these cells differentiate into neural cells. This will favor the future analysis of stem cell nature of porcine RPE cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：網膜再生 網膜色素上皮細胞 虹彩 *Xenopus* ブタ

1. 研究開始当初の背景

(1) 両生類モデルによる網膜再生

研究代表者は1998年以来、両生類の網膜再生現象を研究しており、当初イモリの網膜再生を *in vitro* で再現することに成功し2004年に報告した。その後、アフリカツメガエルにおいても網膜の全再生がおこることをはじめて発見し、2009年に報告した。これは、有尾両生類以外の種で網膜全再生がおこる初めての報告であり、網膜の完全再生が他の動物でも可能である事を明らかにしたと言う点で、非常に意味のある発見であった。また、両生類のモデル動物であるツメガエルが研究材料として使えることも研究の展開に大きな意味をもつことになる。

再生の細胞・分子メカニズムを解明することは、再生研究を鳥類や哺乳類にまで発展させる上で重要である。そのためツメガエル網膜の再生が再現できる器官培養系を確立する事が必要で、これを用いて、再生現象を分子・細胞のレベルで詳細に解析した。結果、網膜の立体構造を再現できるゲル包埋器官培養法と細胞レベルで神経細胞分化や視細胞分化を再現できる平面器官培養法の2つの培養系を確立し、研究体制を整えた。

(2) トリおよびブタ虹彩組織の網膜幹細胞

上記と並行してトリや哺乳類の網膜再生の可能性を探索するために、両生類と同様の培養法を用いて、トリおよびブタの色素上皮組織や虹彩組織の器官培養をおこなって、網膜幹細胞が存在するのか、するとしたらどのような性質をもつのかを研究した。虹彩組織には神経幹細胞が存在するとすでに報告されている。今回の研究によって、この幹細胞が従来にないユニークな性質をもつことが明らかになった。

2. 研究の目的

(1) アフリカツメガエルは、成熟後も網膜を完全再生する。再生の起源細胞は主に網膜色素上皮 (RPE) 細胞である。RPE 細胞以外には毛様体幹細胞が周辺網膜を再生する。本研究では RPE がどのような条件の下で網膜幹細胞化するのかを上記の組織培養モデル系において研究した。眼球内の再生過程では、最初に RPE 細胞が元の色素上皮層から遊離し、網膜の除去手術の際に眼球内に残された網膜血管膜 (網膜の基底膜) に移動附着して、RPE 上皮層を形成する。再生はこの細胞シートから始まり、元の色素上皮層の RPE 細胞が再生することはない。このような観察から、RPE 細胞が幹細胞化するには、いったん基底膜から遊離し、別の基底膜に再附着することが必要であり、またその間、RPE 細胞同士の接着も消えることになる。このような過程で分子的に何が起きているかを明らかにする事により、RPE 細胞が網膜を再生する基本メカニズムを解明することが研究の目的である。

(2) 鳥類や哺乳類では、網膜の完全再生、つまり、全網膜を除いた場合、RPE 細胞をはじめとして周辺組織の細胞から網膜が再生することは全く報告がない。両生類型の網膜再生はこれらの動物では不可能であろうと考えられている。一方で、例えば、虹彩組織や毛様体組織には網膜幹細胞様の細胞が存在することが *in vitro* で証明されている。そこで、本研究では、トリやブタの虹彩組織細胞が幹細胞化するメカニズムをより詳細に研究し、今後 RPE 細胞が幹細胞化するには何が必要かを検討する基盤的な情報を得ることを目的として研究をおこなった。また、虹彩組織はヒトにおいても比較的容易に分離することが可能な組織で有り、移植等の目的に応用することも十分可能であると考えられ、研究の意義は大きい。

3. 研究の方法

(1-1) アフリカツメガエル (以下、ツメガエルと表示) の網膜を除去する手術をおこない、経時的に、眼球を摘出後、色素上皮層と脈絡膜を分離して、RNA を回収した。これを用いて、炎症性サイトカイン遺伝子の発現量および基質融解酵素 Matrix metalloproteinase (MMP) 遺伝子の発現量について定量的 PCR をおこなった。

(1-2) ツメガエル RPE 組織の組織培養をおこなった。方法は、ツメガエルの眼球を摘出後、RPE 組織を脈絡膜がついた状態で分離し、これを培養用の膜フィルター付きカップ (Millicell-CM, Millipore 社) 上に置いて培養した。培養液を加え、25 の培養器で培養した。色素上皮細胞の動きを経時的に観察し、記録後、固定、抗体による染色をおこなった。用いた抗体は、神経細胞の特異抗体 β -tubulin、細胞接着分子、Connexin43、N-cadherin、転写因子 Pax6、増殖マーカー BrdU である。

また、*in situ* hybridization を実施して、組織培養した RPE 細胞で MMP 遺伝子の発現を可視化した。

(1-3) 組織培養下で、阻害剤を用い、薬理学的実験をおこなった。MMP の活性阻害剤 1,10-phenanthroline (PNTL) や抗炎症作用をもつ Dexamethasone が神経細胞分化にどのような効果を持つか、調べた。

(2-1) トリ胚は孵化直前の 19 日胚を用い、虹彩を分離した。またブタは、京都市の屠畜場にて屠畜後 30 分以内の眼球を入手した。トリと同様に、虹彩組織だけを分離した。いずれの動物の虹彩組織も分離後、小さな断片に細切し (1mm 角程度)、タンパク分解酵素 Dispase にて 37 で 18~20 時間処理した。その後、培養液で Dispase をよく洗い落とし、マトリゲルに包埋して培養した。培養液は Dulbecco MEM に牛胎児血清 8% を添加するか、あるいは血清の代わりに無血清培養用添加

物 B27 を加えた。

(2-2)抗体による染色。培養開始後経時的に組織を固定し、抗体による染色をおこなった。用いた抗体は、神経細胞の特異抗体 β III-tubulin、視細胞マーカー、rhodopsin、iodopsin、および細胞増殖マーカー-BrdU である。

(2-3)定量的 PCR、RT-PCR を、幹細胞マーカー-Sox2、神経分化マーカー-NeuroD、Otx2 等についておこなった。

4. 研究成果

[その1]

(1)網膜除去後に RPE 細胞が色素上皮基底膜から遊離するのは MMP が関わっていると予想して、Xenopus の 8 つの MMP 遺伝子について経時的にその発現量を調べた(図1)。その結果、Xmmp9 と Xmmp18 の 2 つの遺伝子は、

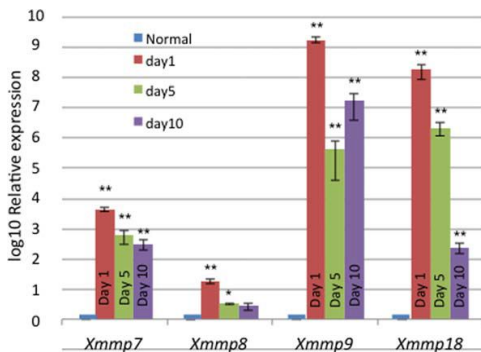


図1 PCR による MMP 遺伝子の発現

網膜を除去して 24 時間後には、極端に発現上昇することがわかり、これはその後も継続した。このことから、網膜を除去すると MMP 遺伝子発現レベルが急速に上昇し、その結果、RPE 細胞が、基質から遊離すると考えられた。実際に RPE 細胞で発現していることを培養組織で調べることにした(図2)。

(2)色素上皮を平面培養すると、周辺部から色素上皮細胞(RPE 細胞)が這いだし、培養フィルター上を遊走する。これらの細胞は、最初は上皮構造を維持しているが、次第に接着構造を失う。その後、神経分化が始まる。この過程でいつ MMP 遺伝子を発現するのかを調べたものが図2である。周辺部の RPE 細胞には Xmmp9 および Xmmp18 の高い発現があり、

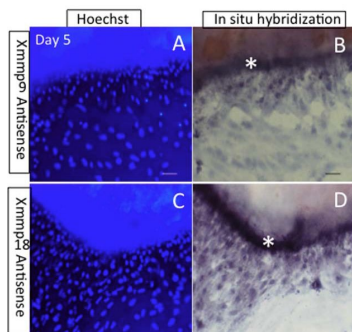


図2 MMP 遺伝子の発現(B, D)

周辺部から這い出した直後の細胞にもまだ高い発現が認められるが、その後急速に低下する。これは RPE 細胞の移動開始に実際に MMP 活性が機能していることを示唆している。そこで、もし MMP 活性を抑制し、移動を阻害すると何が起こるかを検討した。

(3)MMP 活性阻害剤、1,10-PNTL の効果を、培養組織に投与することによって調べた。PNTL を投与すると、培養組織の周辺部から RPE 細胞が遊走しなくなった。また、2 週間後の神経細胞分化を β III-tubulin 陽性細胞の数は、大きく減少した(図3)。

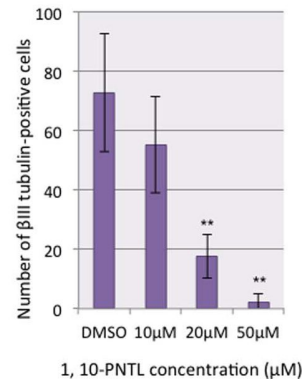


図3 MMP 活性阻害剤と神経分化

さらに、MMP 阻害剤 PNTL が、RPE 細胞の接着構造維持や転写因子 Pax6 の発現にどのような効果があるのかを Connexin43 や N-cadherin の抗体を用いて調べた。その結果、MMP 活性を阻害することによって、形成されるはずの Gap 結合が形成されず、また Pax6 も発現されず、その結果、神経細胞分化が抑制されると考えられた。また、PNTL は RPE 細胞の増殖をかなり抑制した。

これらの実験結果から、RPE 細胞が増殖し、網膜を再生するためには、MMP 遺伝子が発現し、その結果として細胞移動と上皮の再形成がおこることが必要であると強く示唆された。この事は、実際に眼の中で網膜再生がおこるときに、最初に RPE 細胞がブルー膜から遊離し、次に、基底膜に再接着し上皮形成すること、また、遊離しない RPE 細胞は再生過程に入ることなく RPE 細胞の性質を変えないという観察とよく対応している。

(4)では次に、網膜を除去すると何故 RPE 細胞に MMP 遺伝子が発現するのか、について検討を加えた。網膜除去後の眼内組織をよく観察すると、RPE 細胞層に隣接した脈絡膜で強い炎症反応が観察される。そこで、網膜除去にともなって脈絡膜に炎症反応が発生した結果、RPE 細胞で MMP 遺伝子が発現すると仮定し、検討をおこなった。実際に、このような現象(炎症により MMP 発現の上昇)は炎症組織や再生過程でよく知られており、治癒の一過程でもある。

眼球内で網膜除去すると、24 時間以内に、

炎症性物質 IL-1 や TNF- の発現が見られる。RPE 細胞の組織培養でもこれらの発現が見られ、それによく対応して Xmmp9, Xmmp18 の発現上昇が見られた (図 4)。つまり、まず炎症性因子の発現がおこり、それによって MMP 遺伝子が発現、その結果、RPE 細胞が移動開始すると予想される。この一連の流れを検証するために、培養下で抗炎症作用をもつ薬剤を投与し、その効果を調べた。ここでは、dexamethasone を用いた。

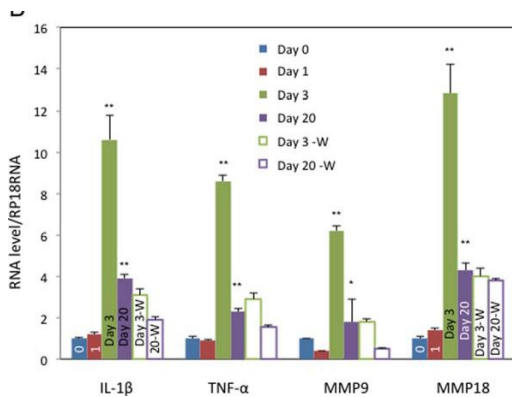
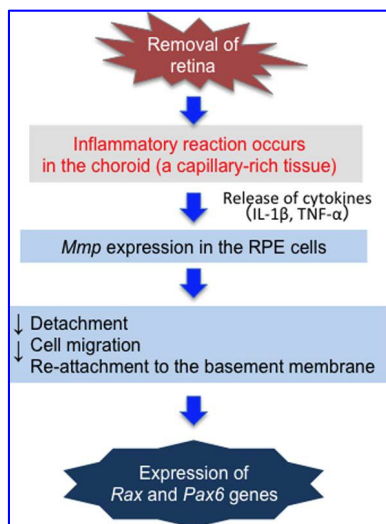


図 4 RPE 組織培養下での IL-1b, TNF-a, MMP 遺伝子の発現

結果、RPE 細胞層からの RPE 細胞の遊走はかなり抑制され、また神経細胞分化も相当に減少した。

(5) 仮説の提唱。

以上の実験の結果およびこれまでの研究代表者の研究成果より、研究代表者は、両生類における網膜再生の過程を次のように考えている。それを図示したものが下図である。



カエルやイモリの眼球から網膜を除去すると、当然ながら、出血や組織障害がおこる。その結果炎症反応が開始するが、とくに脈絡膜のように静脈性の血管が豊富な場所では強い炎症性反応が起こると考えられる。事実、組織像はそれを示している。脈絡膜に隣接し

ている色素上皮層では、炎症性サイトカインによって MMP 遺伝子の発現が誘導され、その結果、RPE 細胞は基底膜から遊離、遊走する。たまたま、すぐ近傍に RPE 細胞が接着できる網膜血管膜が残されているので、ここに定着し、RPE 細胞は上皮構造を再構築し、これらの変化にともなって Rax 遺伝子や Pax6 遺伝子など、網膜再生に必要な遺伝子が発現する。今後この仮説を生体内において検証することは、両生類以外の動物、鳥類や哺乳類で、なぜ両生類タイプの網膜再生がおこらないのか、どうすれば可能なのかを検討していく上で、大きな意味があると考えている。

[その2]

上記のカエル網膜再生の研究と並行してトリおよびブタの虹彩組織における網膜幹細胞について、研究を実施した。その意図は、将来、これらの動物の網膜再生研究を考える上で重要な情報をあたえてくれると考えたからである。ここでは、成熟ブタによる実験の結果を報告する。

(1) 急速な神経分化の開始。

虹彩組織は、非神経組織である。ところが、虹彩組織を Dispase 処理後、Matrigel に包埋して培養すると、遅くとも 48 時間後には、神経細胞の分化が確認された。一方、視細胞の分化は、これほど早い時期には認められなかったが、約 1 ヶ月後には多数のロドプシン陽性の細胞が出現した。つまり、虹彩内には網膜幹細胞様の細胞が存在することになる。従来の研究報告では、かなり複雑な手続きを経て、また時間をかけて虹彩から神経分化がおこるとされているが、今回、このような急速な分化現象を初めて見つけた。この過程を RT-PCR によっても解析し、培養にとまない、rhodopsin 遺伝子や神経特異遺伝子 NeuroD1、幹細胞遺伝子 Sox2 が培養にとまない発現する事を明らかにした。

さらに、予備的な実験では、Wnt シグナル賦活剤の BIO によって神経分化が抑制される。現在、そのメカニズムを詳細に研究中である。

(2) 継代培養による長期安定神経細胞株の分離。

マトリゲルで培養することにより、神経細胞の分化を確認できた。培養条件を、通常の平面培養にすると、神経分化や視細胞分化はおこらない。この状態で虹彩色素上皮としてよく増殖する。これを回収して Dispase 処理し、マトリゲルに包埋培養すると、神経分化が起こる。つまり、平面培養下では幹細胞状態で維持し、マトリゲル培養で分化させることが可能であると言える。

このようにしてきわめて長期にわたり (6 ヶ月~10 ヶ月)、平面培養したものをマトリゲル培養に移し、ほぼ全部の細胞が神経細胞に分化するような株 (?) を分離した。この成果は、今後の研究による解析を考える上で

も大変興味深いと考えている。

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5件)

- Royall L, Lea D, Matsushita T, Takeda T, Taketani S and Araki M (2017) A novel culture method reveals unique neural stem/progenitors in mature porcine iris tissues that differentiate into neuronal and rod photoreceptor-like cells. *Brain Res.* 1675: 51-60. (査読あり)
- Naitoh H, Suganuma Y, Ueda Y, Sato T, Hiramuki Y, Fujisawa-Sehara A, Taketani S and Araki M (2017) Upregulation of matrix metalloproteinase triggers trans-differentiation of retinal pigmented epithelial cells in *Xenopus laevis*: a link between inflammatory response and regeneration. *Dev. Neurobiol.* 77: 1086-1100. (査読あり)
- Kiyonaga-Endou K, Oshima M, Sugimoto K, Thomas M, Taketani S and Araki M (2016) Localization of Neurensin1 in cerebellar Purkinje cells of the developing chick and its possible function in dendrite formation. *Brain Res.* 1635: 113-120. (査読あり)
- Miyake A and Araki M (2014) Retinal stem/progenitor cells in the ciliary marginal zone complete the whole retina regeneration: A study of retinal regeneration in a novel animal model. *Dev. Neurobiol.* 74: 739-756. (査読あり)
- Matsushita T, Fujihara A, Royall L, Kagiwada S, Kosaka M and Araki M (2014) Immediate differentiation of neuronal cells from stem/progenitor-like cells of the avian iris tissues. *Exp. Eye Res.* 123: 16-26. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

- Masasuke Araki, Tamami Matsushita and Jorg Steinfeld: Regulatory mechanism of retinal cell differentiation from iris tissue stem cells of the chick. 第50回日本発生生物学会大会、2017年5月11日、東京。
- Masasuke Araki, Naitou Hanako and Matsushita Tamami: *Xenopus* model of retinal regeneration as an approach to the development of Mammalian ocular tissue stem cells. International

Meeting on Aquatic Model Organisms for human diseases and Toxicology Research. 2016 Mar.18th-19th, Okazaki. Masasuke Araki: Regeneration of the retina and tissue engineering of neural stem cells using a three-dimensional culture. 2015 Tissue Engineering Congress, 2015 Sep 8th-10th. London

荒木正介 アフリカツメガエル網膜再生モデルの有用性：これまでの成果を哺乳類網膜再生へいかにつなぐか？ 第1回次世代両生類研究会。2015年8月24日、岡崎市。

〔図書〕(計1件)

Araki M (2014) A model for retinal regeneration in *Xenopus*. In 'Xenopus Development' pp. 346-367 (eds by Kloc & Kubiak) John Wiley & Sons. Inc. New York.

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 正介 (ARAKI, Masasuke)
奈良県立医科大学・医学部・研究員
研究者番号：00118449

(2) 研究分担者

小林 千余子 (KOBAYASHI, Chiyoko)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：20342785

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()