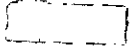


20030583



厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

網膜ニューロンの緑内障性障害 —それに対する保護と再生—

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 新家 眞

平成16(2004)年 4月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告	
緑内障性網膜ニューロン障害の性状と治療に関する研究 -----	1
新家 眞	
II. 分担研究報告	
1. 緑内障の病態と治療に関与する関連タンパクに関する研究 -----	24
三嶋 弘	
2. 網膜ニューロンの緑内障性障害に関する研究 -----	26
阿部春樹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	30
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	31

厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書

網膜ニューロンの緑内障性障害 —それに対する保護と再生—に関する研究

主任研究者 新家 眞 東京大学医学部 教授

研究要旨：網膜神経節細胞の周囲に存在する各種グリア系細胞の役割はほとんど明らかになっていないが、世界的にも当施設でのみ利用可能なマウスの安定した高眼圧緑内障モデル及びラット緑内障モデルを用いて、神経節細胞及び各種グリア系細胞相互作用の解明及び網膜特異的な神経細胞死の機序に関わる新規の分子の解明を進めることを目的とする。具体的な本年度のプロジェクトは以下7項目である。

- ① *in vivo* 実験系としてマウス高眼圧モデルの作成と眼圧測定
- ② マウス神経細胞死の生体内観察法
- ③ ラットの実験緑内障眼の確立
- ④ 網膜神経節細胞(RGC)初代培養系を用いた低酸素誘導神経細胞死に対する緑内障眼圧下降薬の眼圧非依存性神経保護効果の検討
- ⑤ RGC 初代培養系を用いた低酸素誘導神経細胞死に対するカルシウムチャンネル拮抗薬の神経保護効果の検討
- ⑥ グリア系ミューラー細胞における神経栄養因子の発現解析
- ⑦ 網膜肝細胞・前駆細胞の取得法と性状の検討

以下、プロジェクト毎に報告をまとめた。

分担研究者

三嶋 弘 広島大学医学部 教授
阿部 春樹 新潟大学医学部 教授

研究要旨

網膜神経節細胞の周囲に存在する各種グリア系細胞の役割はほとんど明らかになっていないが、世界的にも当施設でのみ利用可能なマウスの安定した高眼圧緑内障モデル及びラット緑内障モデルを用いて、神経節細胞及び各種グリア系細胞相互作用の解明及び網膜特異的な神経細胞死の機序に関わる新規の分子の解明を進めることを目的とする。具体的な本年度のプロジェクトは以下7項目である。

- ⑧ *in vivo* 実験系としてマウス高眼圧モデルの作成と眼圧測定
- ⑨ マウス神経細胞死の生体内観察法
- ⑩ ラットの実験緑内障眼の確立
- ⑪ 網膜神経節細胞(RGC)初代培養系を用いた低酸素誘導神経細胞死に対する緑内障眼圧下降薬の眼圧非依存性神経保護効果の検討
- ⑫ RGC 初代培養系を用いた低酸素誘導神経細胞死に対するカルシウムチャンネル拮抗薬の神経保護効果の検討
- ⑬ グリア系ミューラー細胞における神経栄養因子の発現解析
- ⑭ 網膜肝細胞・前駆細胞の取得法と性状の検討

以下、プロジェクト毎に報告をまとめた。

プロジェクト1. マウス緑内障モデルの確立

A. 研究目的：

高眼圧による神経細胞死の機序の解明のためには *in vivo* 動物モデルにより解析することが望ましい。マウスは、遺伝子改変および実験手段の多様性によりもっとも利用しやすい動物であるため、本研究ではまず緑内障モデルの確立を第一とした。共同研究者らが開発した高眼圧マウスを継代し、高眼圧性緑内障神経障害モデルとして利用可能かを確認することを目的とする。

B. 研究方法：

当所属機関の相原らが発見した collagen I alpha1 の matrix metalloproteinase 切断部位に遺伝子変異が組み込まれたマウス B6, 129-*Col1a1^{tm1Jae}* を米国より輸入し、継代飼育を行う。このマウス *Col1a1 r/r* は成長とともに高眼圧を呈することが既に相原らにより国外で確認済みである。今回国内で始めて継代することにより、再度高眼圧モデルとして使用可能かを確認する必要がある。そこで高眼圧の存在と視神経障害の有無を以下の方法で行った。

1. microneedle 法によるマウス眼圧測定

Homozygous B6, 129-*Col1a1^{tm1Jae}* (*Col1a1 r/r*) およびその wild type (*Col1a1 +/+*)を用いた。眼圧は微小ガラス針及び圧トランスデューサーを用いて 10時から14時の間に測定した。生後 12, 18, 24, 36, 54 週での眼圧を同一個体 (8 *Col1a1 r/r*, 7 *Col1a1 +/+*) で測定、さらに異なる個体の異なる週令での眼圧も測定した。上昇の指標として、眼圧上昇値と上昇期間の積算を用いた。

2. 電子顕微鏡組織切片による解析

視神経障害の有無、視神経線維障害パターン、視神経線維障害と視神経線維断面積の関係について以下のように検討した。

12 週の眼圧測定の後、固定し視神経断面上方がわかるよう強膜の一部を残して視神経を取り出した。Epoxy Resin 包埋した後、眼球後方 300 μm の部分で視神経横断面切片を作成し、電子顕微鏡を用いて 200 倍にて視神経断面を、視神経断面より 20 カ所 (中心 4 カ所、中間 8 カ所、周辺 8 カ所) を選び、10000 倍にて視神経線維、グリア細胞を撮影した。画像をデジタル化した後、NIH image を用いて視神経断面積、視神経線維密度、グリア細胞密度、視神経線維断面積を計測し、総視神経線維数、横断面あたりのグリア細胞数を計算した。

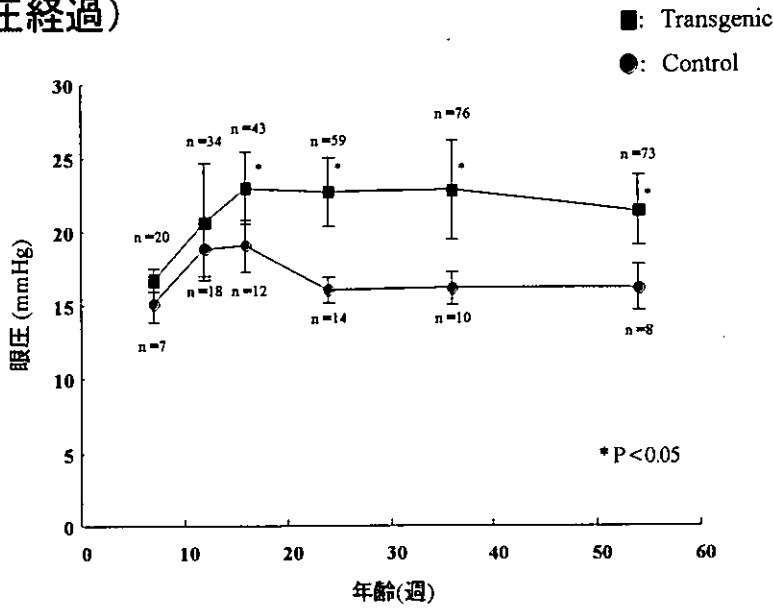
倫理面への配慮

動物実験に際しては Association for Research of Vision and Ophthalmology (ARVO) 決議を順守し十分な倫理的配慮を加えた。

C. 研究結果

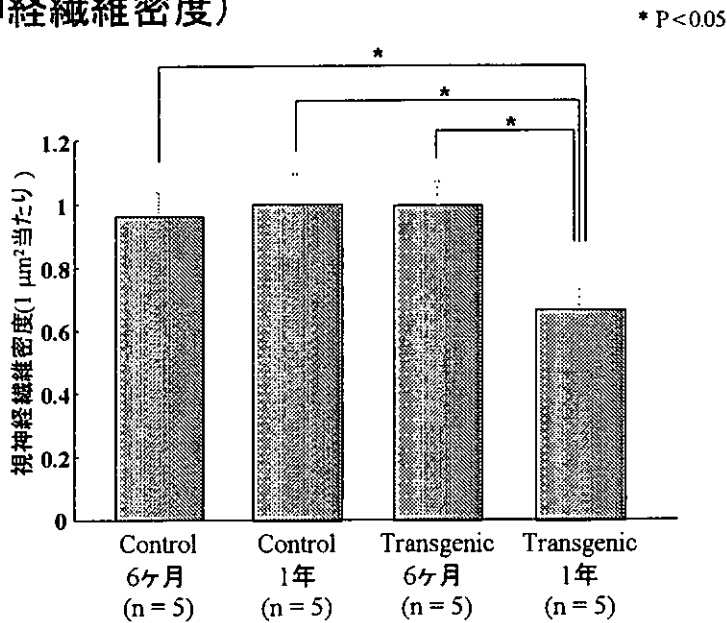
トランスジェニックマウスの眼圧は、コントロールと比べ、生後4ヶ月頃から有意に上昇し始め、約4-7 mmHg (約30-40%) 程度上昇していた。

(眼圧経過)



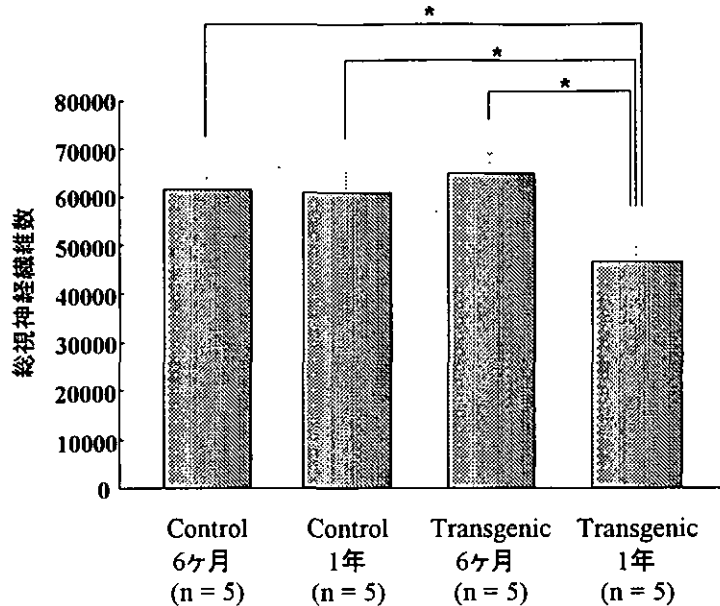
collagen type I トランスジェニックマウス、コントロールとして wild type マウスの視神経線維数を計測したところ、生後6ヶ月の視神経線維数に変化はみられず、生後1年のトランスジェニックマウスの視神経線維数の減少 (約20%) がみられた。

(視神経繊維密度)



(視神経繊維数)

*P<0.05



D. 考察

このマウスモデルは、眼圧上昇も軽度で個体差が比較的少なく、開放隅角であること、マウス寿命が約2年であることを考えると視神経線維減少もゆっくりであることなど、開放隅角緑内障のモデルとして有用であると思われる。今後は、視神経障害機序の細胞レベルでの検討、現在可能性が示唆されている神経保護薬剤の効果判定に有用なモデルになると考えられる。しかし、マウス視神経鞘には、collagen type I が分布しており、変異 type I collagen が、眼圧上昇とは別に直接視神経線維減少に影響した可能性も否定できない。いずれにしても collagen I が緑内障発症に重要な役割を果たしていることはまちがいない、これら関係を明らかにするためさらなる検討を行うべきであろう。

E. 結論

*Coll1^{r/r}*は高眼圧により視神経障害を来すことが判明した。高眼圧の経過と視神経萎縮の経過より慢性緑内障モデルとして有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

論文発表

Mabuchi F, Lindsey JD, Aihara M, Mackey MR, Weinreb RN. Optic Nerve Damage in Mice with a Targeted Type I Collagen Mutation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2004 45: 1841-1845.

学会発表

平成 15 年 9 月 第 14 回日本緑内障学会 マウスの高眼圧緑内障モデルの作成と緑内障研究への応用
平成 15 年 9 月 第 14 回日本緑内障学会 マウス高眼圧モデルにおける視神経障害の評価

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

プロジェクト 2. 緑内障性網膜神経細胞死の生体内観察系の確立

A. 研究目的:

高眼圧モデルマウスにより神経細胞死の組織学的な解析は可能であるが、一定の期間ののち障害を確認することができるのみである。従って患者経過診察により得られるような、経時的な神経細胞の障害を観察する系を確立することを目的とした。

B. 研究方法:

網膜神経節細胞 (RGC) に蛍光色素 (CFP) を発するように遺伝子改変されたマウス (CFP+/+) を高眼圧にするため、CFP+/+ と先述の Col1r/r を掛け合わせることを試みた。同時に生体蛍光顕微鏡を用いて、網膜蛍光眼底撮影を試みた。

倫理面への配慮

動物実験に際しては Association for Research of Vision and Ophthalmology (ARVO) 決議を順守し十分な倫理的配慮を加えた。

C. 研究結果

現在、CFP+/+マウスが十分確保できず、さらに継代飼育中である。マウスは直径約 3.5mm の小眼球であるため通常の光学系では焦点を合わせることができないことが判明した。そこで、マウス用の特殊コンタクトレンズを作成している。さらに、マウスの心拍、呼吸の影響で頭部が振動するため、高解像度の写真を得ることが困難であることが判明した。

D. 考察

光学系の改造については、マウス用の特殊コンタクトレンズを作成し、対処する予定である。また、マウスの頭部を固定するために固定具を導入する。CFP+/+マウスが十分量確保できたのちに再度試みる予定である。

E. 結論

RGC の生体内観察は蛍光色素を発現する RGC を利用することにより実現可能であると考えられる。高眼圧による経時的な神経細胞死の経過が追えるならば、神経保護薬の薬効評価に非常に有用なモデルになると考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

未定

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

プロジェクト3. ラットの実験緑内障の確立

A. 研究目的：

ラットはマウスと比べ遺伝子改変は困難であるが、眼球の大きさの点でマウスより組織学的な解析には好ましい。高眼圧による神経障害モデルの作成を目的とした。

B. 研究方法：

房水流出路である上強膜静脈を熱凝固閉塞することにより眼圧を上昇させ、高眼圧モデルを作成した。Wistar rat adult をウレタン麻酔し、両眼角膜輪部で結膜を切開した後に、上強膜静脈を同定し、片眼はジアテルミーで凝固を行い、僚眼は無処置コントロール眼とした。3本及び4本焼灼したのち、1週間、及び3週間でトノペンにより眼圧を測定した。

倫理面への配慮

動物実験に際しては Association for Research of Vision and Ophthalmology (ARVO) 決議を順守し十分な倫理的配慮を加えた。

C. 研究結果：処置眼はコントロール眼と比較し眼圧上昇の傾向が見られたが、トノペンの測定を侵襲的なマイクロニードル法で確認したところ、上昇は見られないことが判明した。

D. 考察

少なくともジアテルミーによる上強膜静脈焼灼法はラットの高眼圧を惹起できず、トノペンでの不安定な測定方法もふまへ、全面的な変更を要する必要がある。H16年度は上強膜静脈結紮法に変えることにし、眼圧測定もマイクロニードル法を併用し、より確実な系を立ち上げる必要がある。

E. 結論

ラットの上強膜静脈焼灼法による高眼圧モデル作成は不成功であり、今後は方法を変更して再度試行する必要がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

未定

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

プロジェクト4. 網膜神経節細胞(RGC)初代培養系を用いた低酸素負荷誘導神経細胞死に対する緑内障眼圧下降薬の眼圧非依存性神経保護効果の検討

A. 研究目的:

疫学的な緑内障の病型検討では、正常眼圧緑内障が特に日本人に多いことが判明しており、緑内障性視神経障害発症機序として眼圧非依存性因子の存在が示唆されている。現在使用されている緑内障点眼薬は眼圧下降作用の他、血流改善作用などにより、眼圧非依存性の神経保護効果を有する可能性がある。そこでRGC初代培養系において低酸素負荷による神経細胞死に眼圧下降薬であるβブロッカーが影響を与えるかを検討した。

B. 研究方法:

生後6-7日令ラット網膜からtwo step immunopanning法で網膜神経節細胞を単離し無血清培地で培養した。最終濃度 $10^{-8}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M$ のベタキソロール、ニプラジロール、チモロール添加後、酸素分圧可変型の培養器を用いて低酸素(5%)の負荷をかけ、37°Cで12時間培養後にカルセインAM染色により生存細胞を検出し、全細胞数との比から神経節細胞の生存率を無添加群(コントロール)と検討した。また、各種薬剤添加後、低酸素負荷時のカルシウムイメージング法を用いて細胞内カルシウム濃度を測定した。

倫理面への配慮

動物実験に際してはAssociation for Research of Vision and Ophthalmology (ARVO)決議を順守し十分な倫理的配慮を加えた。

C. 研究結果

コントロール生存率51.5%に対し、ベタキソロール $10^{-8}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M$ では51.5, 58.3, 60.5% (図1)、ニプラジロール $10^{-8}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M$ では57.4, 58.8, 60.5% (図2)、チモロール $10^{-8}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M$ では55.0, 57.1, 58.0% (図3)の生存率であり3種薬剤共に濃度依存的な生存率改善効果を示した(n=7)。 $10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M$ では3種薬剤ともに有意、 $10^{-8}M$ においてはニプラジロールのみ有意な生存率改善効果を示した(p<0.05)。各薬剤添加後の細胞内カルシウム濃度は有意な変化は見られなかった。図1

低酸素誘発ラット網膜神経節細胞死に対する
ベタキソロールの神経保護効果

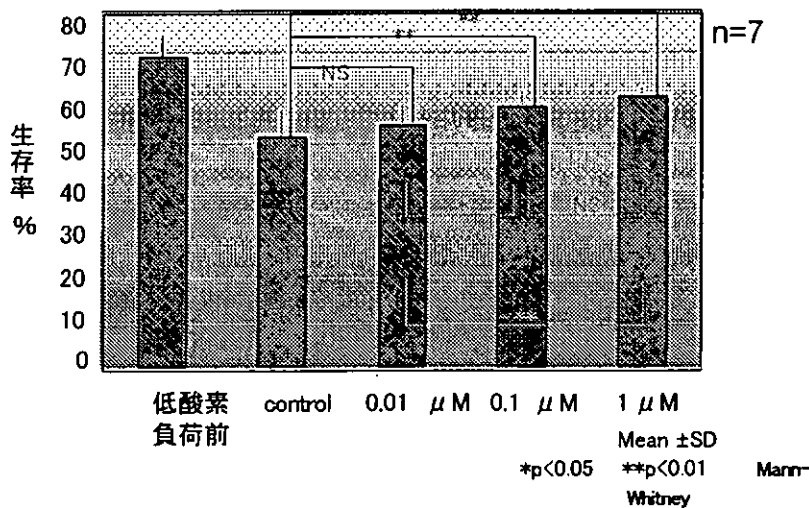


図2

低酸素誘発ラット網膜神経節細胞死に対する
ニプラジロールの神経保護効果

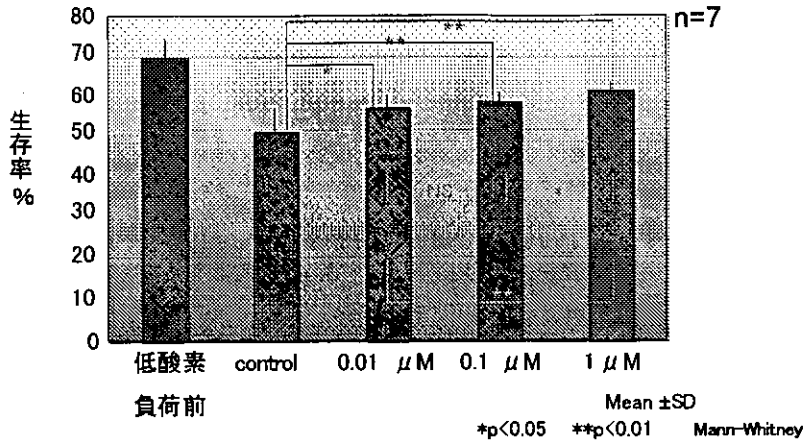


図 3

低酸素誘発ラット網膜神経節細胞死に対する
チモロールの神経保護効果

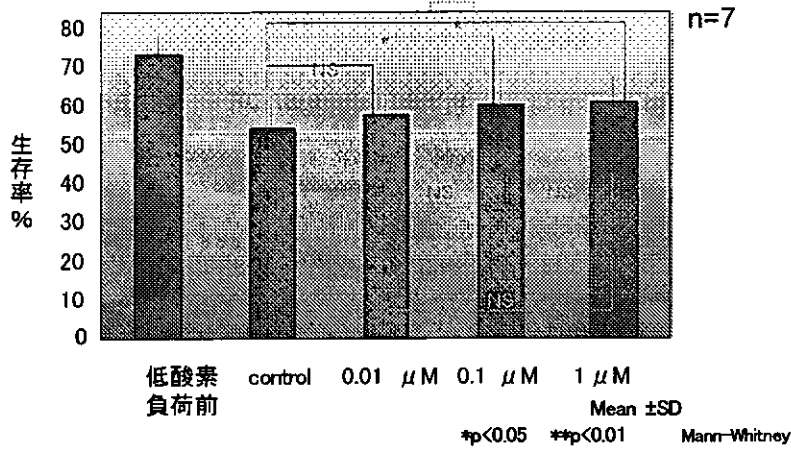


図 4

網膜神経節細胞のカルシウムイメージング

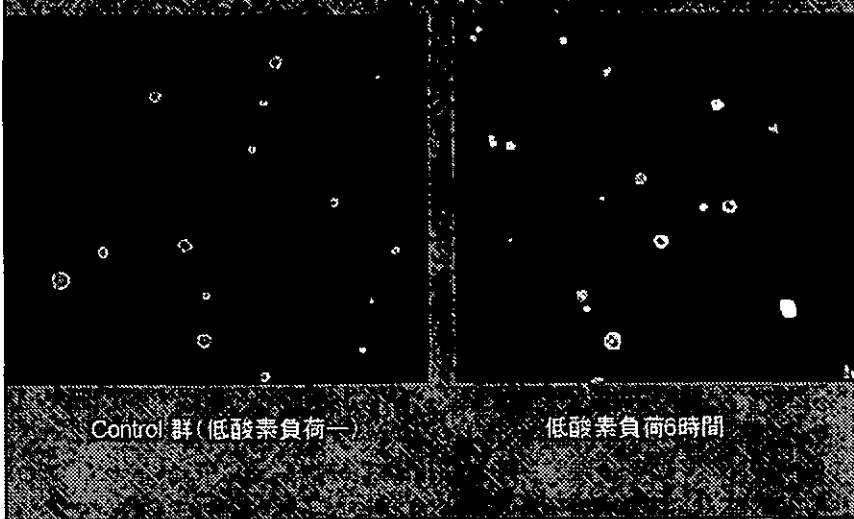
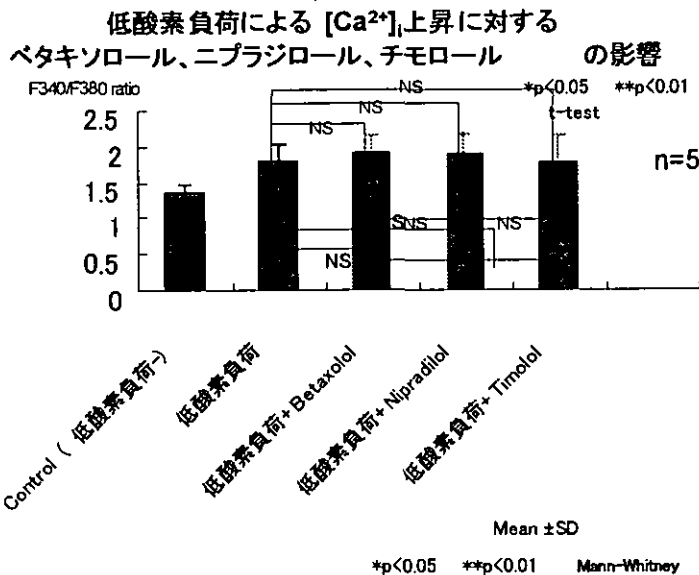


図 5



D. 考察:

ベタキソロールは弱いカルシウムチャネル拮抗作用があり、またニプラジロールはNO放出により、神経保護作用を呈する可能性があるが、今回チモロールも含め各薬剤低酸素負荷に対し同等の神経保護作用を呈した。直接的な β ブロッカーの作用は現在のところ判明せず今後の検討を要する。点眼により十分量が後眼部に到達することが判明すれば、眼圧下降作用以外の神経保護作用も期待できることが示唆された。

E. 結論

今回検討した3種類の眼圧下降薬は低酸素負荷に対するラット網膜神経節細胞死を軽減させた。交感神経作動性眼圧下降薬は眼圧下降効果以外に網膜神経節細胞に直接作用し低酸素による細胞死を抑制する可能性が示された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

未定

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

プロジェクト5. RGC 初代培養系を用いた低酸素誘導神経細胞死に対するカルシウムチャンネル拮抗薬の神経保護効果の検討

A. 研究目的:

緑内障の最終病態はRGCのapoptosisであるが、細胞内カルシウムの上昇に伴う神経細胞死が大きな役割を果たしている可能性がある。そこでRGC初代培養系において低酸素負荷による神経細胞死にカルシウムチャンネル拮抗薬がどのような影響を与えるかを検討した。

B. 研究方法:

方法: 生後6-7日令ラット網膜からtwo step immunopanning法で網膜神経節細胞を単離し無血清培地で培養した。最終濃度 $10^{-8}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M$ のイガニジピン、ニモジピン、ロメリジン添加後、酸素分圧可変型の培養器を用いて低酸素(5%)の負荷をかけ、37°Cで12時間培養後にカルセインAM染色により生存細胞を検出し、全細胞数との比から神経節細胞の生存率を無添加群(コントロール)と検討した。また、各種薬剤添加後、低酸素負荷時のカルシウムイメージング法を用いて細胞内カルシウム濃度を測定した。

倫理面への配慮

動物実験に際してはAssociation for Research of Vision and Ophthalmology (ARVO)決議を順守し十分な倫理的配慮を加えた。

C. 研究結果

コントロール生存率44.1%に対し、イガニジピン $10^{-8}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M$ では50.0, 54.5, 54.5%、ニモジピン $10^{-8}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M$ では49.3, 53.0, 55.4%、ロメリジン $10^{-8}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M$ では43.7, 49.1, 57.6%の生存率であり3種薬剤共に濃度依存的な生存率改善効果を示した(n=7)。 $10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M$ では3種薬剤ともに有意な生存率改善効果を示した。各薬剤添加後の細胞内カルシウム濃度はコントロールと比べ低い傾向を示した。

D. 考察

カルシウムチャンネル拮抗薬は、in vitro低酸素負荷ラット網膜神経節細胞において神経保護効果を呈したことにより、直接的な神経保護作用を有すると考えられる。詳細は今後の検討を要するが、カルシウムの細胞内濃度の抑制が作用機序の一部となっていると考えられる。後眼部においてカルシウムチャンネル拮抗薬が有効濃度に達すれば、虚血などの循環不全に起因する神経細胞死を直接抑制する可能性が示唆された。

図1

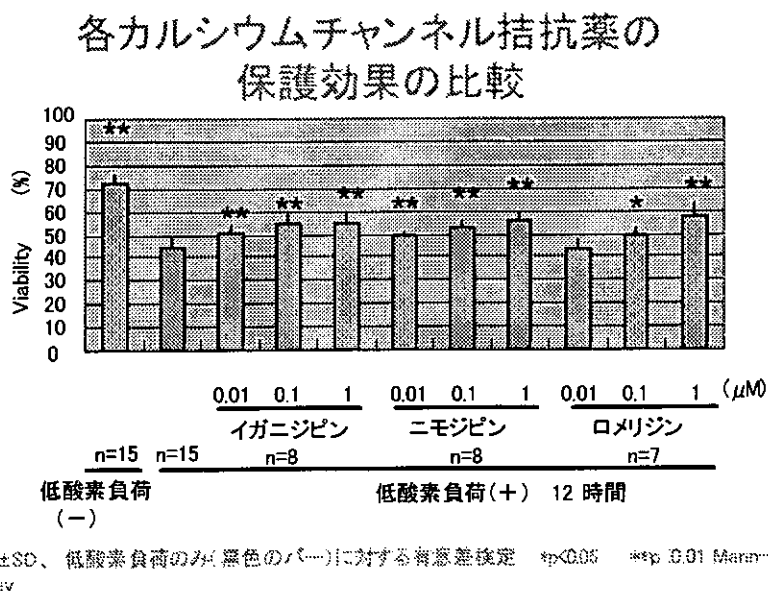
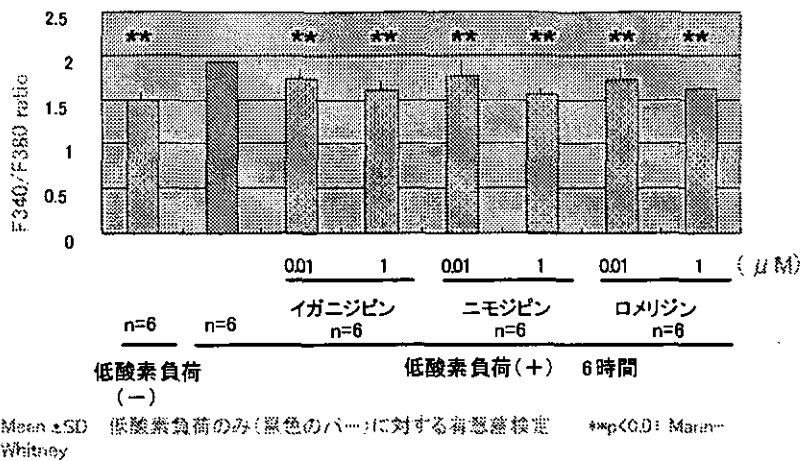


図2

低酸素負荷による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する 各カルシウムチャンネル拮抗薬の影響



E. 結論

イガニジピン、ニモジピン、ロメリジンは低酸素誘発ラット網膜神経節細胞死に対して直接的な保護効果を示した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

平成15年9月 第14回日本緑内障学会 低酸素誘発ラット網膜神経節細胞死に対するイガニジピンの神経保護効果

平成15年5月 ARVO meeting Florida USA. Lomerizine, a Ca^{2+} Channel Blocker, Reduces Hypoxic Damage in Purified Retinal Ganglion Cells

Neurotrophic Factors' mRNAs and Proteins Are Up Regulated by Betaxolol and Calcium Channel Blocker in Cultured Muller Cell

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

プロジェクト6. グリア系ミューラー細胞における神経栄養因子の発現解析

A. 研究目的: ミューラー細胞では神経栄養因子の発現が示唆され、RGCなどの神経細胞死に対する保護効果を有する可能性がある。今回我々は、ラット培養ミューラー細胞を用いて、緑内障治療薬であるブナゾシン、チモロール、ベタキソロール、カルシウム拮抗剤であるイガニジピンによる神経栄養因子の発現について検討した。

B. 研究方法: 37°C、20%O₂、5%CO₂ の条件で培養したラットミューラー細胞初代培養系を用いた。薬剤非添加群をコントロールとし、最終濃度として10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹Mになるように、ブナゾシン、チモロール、ベタキソロール、イガニジピンをそれぞれ添加し、6時間培養した後 RNA および蛋白を抽出した。定量 PCR および Western blot 法を用いて BDNF, CNTF, GDNF の発現の変化をコントロールと比較検討した。またカルシウムイメージング法を用いて作用機序の検討も行った。

C. 研究結果

結果: 定量 PCR では、コントロール群と比較して、ブナゾシン添加群とチモロール添加群では、神経栄養因子の発現に変化は見られなかった。10⁻⁷M、10⁻⁸M ベタキソロール添加群ではコントロールと比較して、BDNF、CNTF 共に有意に増加したが (p<0.05)、GDNF は有意な発現の変化はみられなかった。10⁻⁷M、10⁻⁸M イガニジピン添加群では、BDNF、CNTF、GDNF 共に有意に増加した(p<0.05)。Western blot 法では、ブナゾシン、チモロール添加群では変化は見られなかったが、ベタキソロール、イガニジピン添加群では、BDNF、CNTF ともに有意な発現の増加が見られた(p<0.05)。ベタキソロールではカルシウム拮抗作用は見られなかった。

Results (quantitative RT-PCR)

Figure 1 Change of neurotrophic factors' mRNA expression Bunazosin hydrochloride

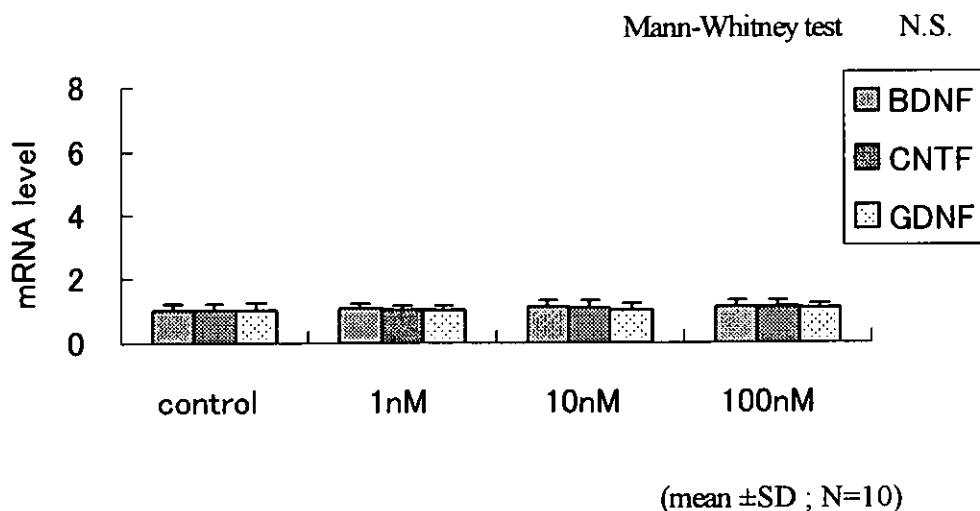


Figure 2

Change of neurotrophic factors' mRNA expression by timolol maleate (mean±SD ; N=10)

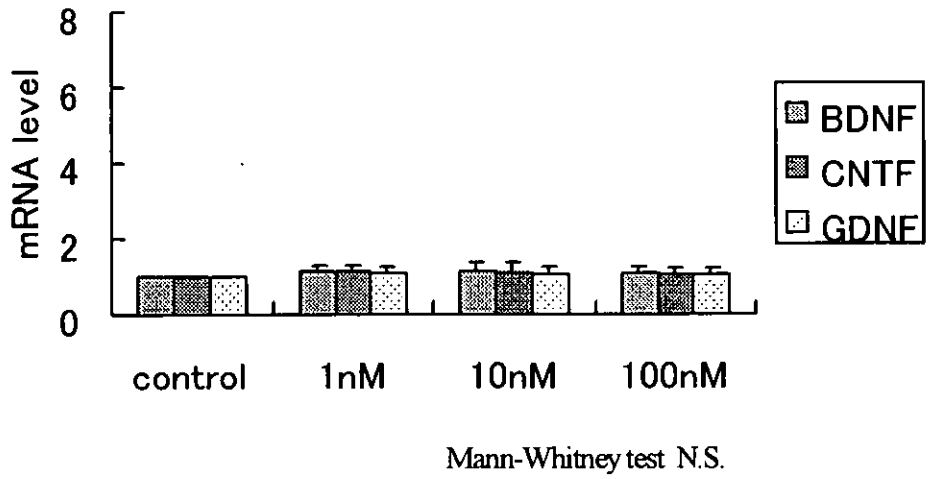


Figure 3

Change of neurotrophic factors' mRNA expression by betaxolol (mean±SD ; N=10)

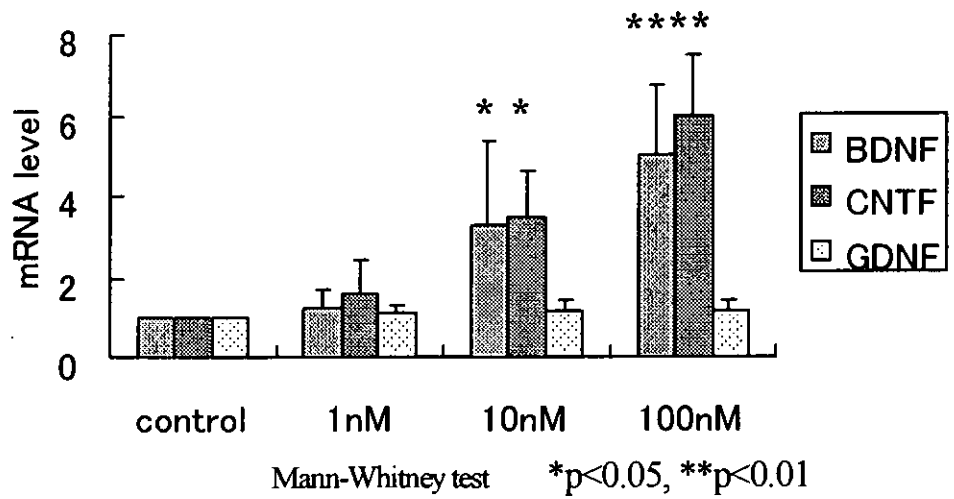
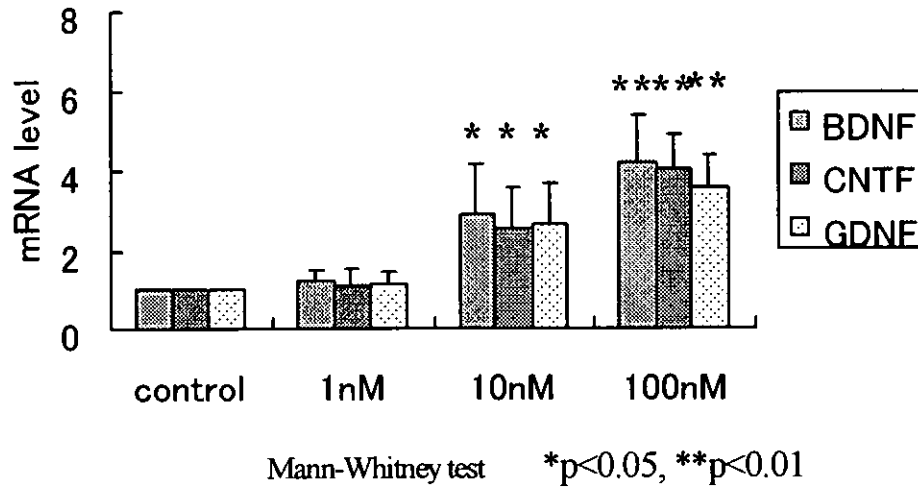


Figure 4

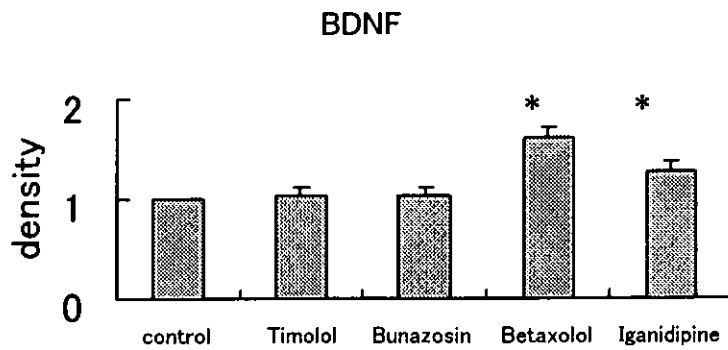
Change of neurotrophic factors' mRNA expression by iganidipin hydrochloride (mean±SD ; N=10)



Results (western blot)

Figure 5

Change of BDNF protein expression



10nM, Mean ± S.D. N=5 Mann-Whitney test *p<0.05

Figure 6

Change of CNTF protein expression by addition of drugs (10nM) (Mean \pm S.D. N=5)

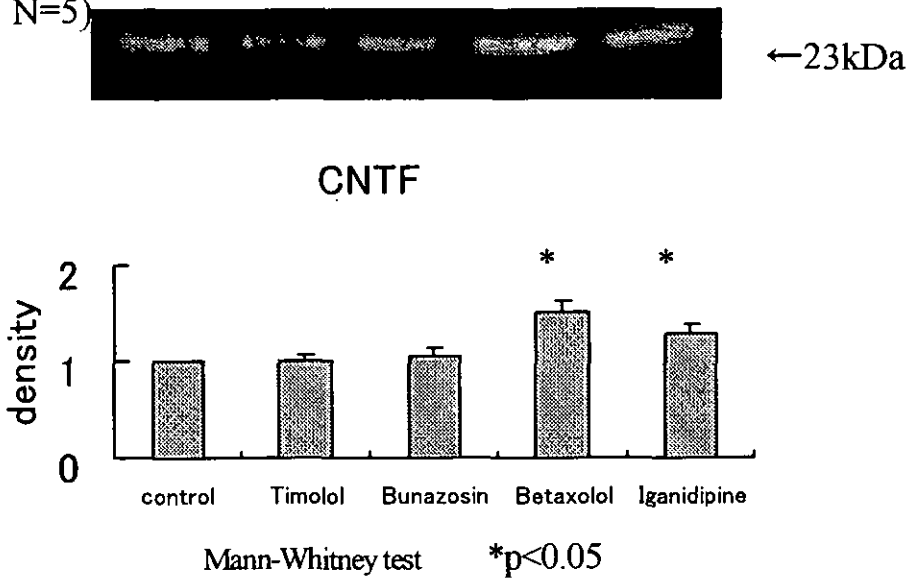


Figure 7

Change of GDNF protein expression by addition of drugs (10nM) (Mean \pm S.D. N=5)

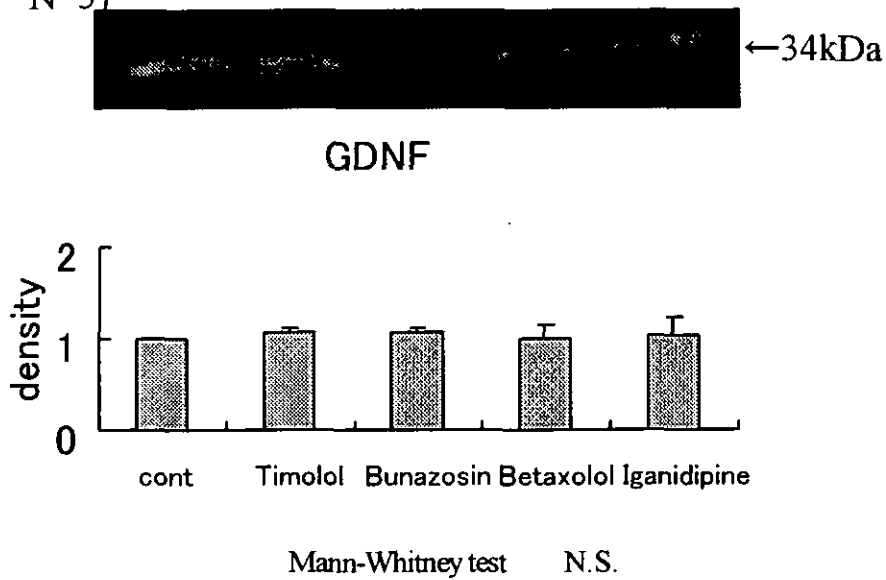
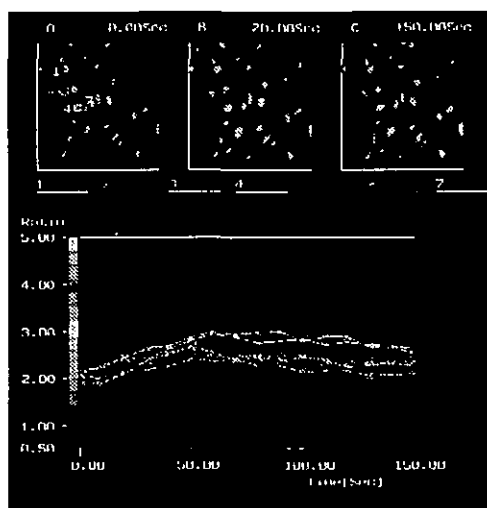
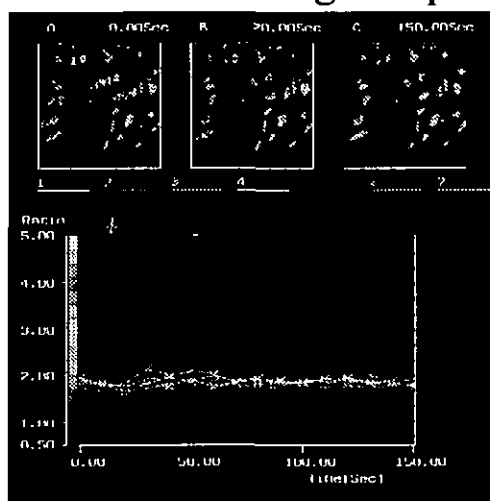


Figure 8
Kainate-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in muller cells
Effect of Betaxolol



Kainate-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase was not affected by pretreatment with betaxolol (10nM).

Figure 9 Kainate-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in muller cells
Effect of iganidipine



Pretreatment with iganidipine (10nM) blocked kainate-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase.

D. 考察

$\alpha 1$ ブロッカーであるブナゾシンと β ブロッカーであるチモロールは BDNF, CNTF, GDNF の発現誘導に影響を及ぼさなかった。一方同じく β ブロッカーであるベタキソロールと膜電位依存性 L 型カルシウムチャンネル阻害剤のイガニジピンは、発現を増加させた。従ってベタキソロールは β ブロッカー作用以外の機序により直接細胞に作用している可能性が示唆された。ベタキソロールはイガニジピンの主要な作用であるカルシウムイオン流入阻害作用は示さなかった。

従って、ベタキソロールは β ブロッカー作用やカルシウムチャンネル阻害作用とは異なる作用機序で、ミュラー細胞からの神経栄養因子の発現に関与している可能性がある。

E.結論

ベタキソロールとイガニジピンはラット培養ミュラー細胞において BDNF、CNTF を有意に増加させた。神経栄養因子の発現の増加が認められたことによりミュラー細胞を介した網膜神経保護効果の可能性が示唆された。

F.健康危険情報

特記すべきことなし

G.研究発表

平成 15 年 9 月 第 14 回日本緑内障学会 薬剤添加による培養ラット網膜ミュラー細胞の神経栄養因子の発現

平成 15 年 5 月 ARVO meeting Florida USA.

Neurotrophic Factors' mRNAs and Proteins Are Up Regulated by Betaxolol and Calcium Channel Blocker in Cultured Muller Cell

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

プロジェクト7. 網膜幹細胞・前駆細胞の取得法と性状の検討

A. 研究目的

網膜は中枢神経系に属し、生体内では再生能力を持たない。このため、網膜の障害によって引き起こされる疾患は治療法がなく、新たな治療法の開発は急務である。新たな治療法として考えられているもののうちでも、特に細胞移植療法が新たな治療と成りうる可能性が注目されている。

われわれは、本研究では成体眼球に存在する網膜幹細胞／前駆細胞の性状解析を通じて医療に貢献する事を目的としてきた。具体的には、今後細胞移植を用いた網膜再生医療を確立するために、網膜幹細胞／前駆細胞の性質を明らかにすることはきわめて重要であると考え、網膜幹細胞／前駆細胞の性状を *in vitro* で明らかにする事を目的に研究を行った。

まず、移植された細胞がその部位において正常に機能するためには移植部位の領域特異的な性質を獲得することが必要と考えられる。従って、網膜幹／前駆細胞を用いて細胞移植を行う際に、これらの細胞が取得部位によって性質が異なるのかを検討することが重要であると考えられる。これまでの実験結果から、細胞移植の供給源として網膜幹細胞／前駆細胞を含んだ神経前駆細胞は一般にいずれもニューロン・グリア系への分化能を有するが、取得される部位によって領域特異性がある事が分かってきている。例えば、培養脊髄前駆細胞と前脳神経前駆細胞は領域特異的マーカー遺伝子の発現に違いがある。また、前脳由来の神経幹細胞は前脳内の解剖学的な領域区分によって細分されそれぞれの由来領域に従った特異的な遺伝子発現を示すことや、前脳由来の神経前駆細胞が脊髄由来の神経前駆細胞と発現する遺伝子に違いがあることが判明している。実際、脳の領域特異性を既に獲得している脳由来の神経幹細胞を網膜内に移植しても網膜細胞には完全に最終分化しないことも知られている。網膜領域はRx, Chx10等のホメオボックス型の転写因子やFoxn4, RORb等の領域特異的転写因子によって規定されている。また、網膜は網膜内部の背腹前後軸に沿ってマーカー遺伝子(EphA3, B3, ephrin B1, A2, Vax2, Tbx5)の発現勾配によって規定される領域区分(コンパートメント)が存在することが分かっており、この遺伝子発現によって規定される網膜の極性は網膜の正常発生に必須である。しかしながら、これまでに培養網膜前駆細胞において、領域特異性が存在するかどうかは不明であった。

数年前より、ほ乳動物(マウス、ラット)においては、成体網膜前駆／幹細胞が液体培地を用いた浮遊培養系で、増殖因子存在下で細胞を選択的に増殖させるとスフェア(細胞浮遊塊)として取得される(スフェア法)事が示されている。しかしながらこれまでの液体培地を用いた培養系では細胞凝集が起こる可能性があり、単一細胞から得られた前駆細胞(単一クローン)の増殖、分化能の解析が困難である。そこで、本研究では、まず毛様体上皮から細胞凝集を起こさずにスフェアを形成させる系を確立し、家兎毛様体上皮細胞を培養し、網膜前駆細胞の分化増殖能を単一クローンレベルで明らかにすることを目的とした。

さらに、本年度はこの系を用いてラット培養網膜前駆細胞の取得部位(上下耳鼻側)別の分化増殖能およびマーカー発現の違いを検討した。

また、網膜疾患で最も障害される頻度が高い視細胞を、雑多な培養細胞の中から選択的に取得するような系の確立に向けて検討を行っている。

B. 研究方法

B-1. メチルセルロース添加培地を用いたスフェア形成法の確立

網膜幹／前駆細胞の取得

網膜幹・前駆細胞はスフェア法を用いて取得した。スフェア法は、組織由来の細胞を単一細胞に分離後、数日間培養することによって増殖性を有する細胞を細胞塊(スフェア)として浮遊培養で取得する方法である。培養液中に各種増殖因子を添加する事によって増殖因子に反応性の細胞を取得する事が出来る(図1)。すなわち、細胞密度 $10/\mu\text{l}$ でDMEM/F12培地(Gibco BRL)にN2 supplementを添加し培養を開始し、さらに、Epidermal Growth Factor (EGF)およびbasic fibroblast growth factor (bFGF)を隔日で最終濃度 10ng/ml , 20ng/ml となるように培地中に添加すると、細胞は増殖し、培養開始から7から14日後にニューロスフェアと呼ばれるクラスターを形成する。