

図1：スフェア法による網膜幹細胞/前駆細胞の取得

これまでに成体毛様体上皮を通常の液体培養を用いたスフェア法で培養する事によって網膜幹細胞が取得されると報告されている。しかし、既報に従って培養を行うと、培養中に浮遊細胞同士の再凝集が起こり、クローナルな増殖が困難である事が判明した (data not shown)。この現象はこれまでに我々が皮膚由来多能性幹細胞において観察したのと同様の結果であった。そこで、培養液中に1.2%メチルセルロースを添加し、培養液に粘性を持たせ、培養中に細胞が動かない状態でスフェア法を試み、単一細胞由来のクローンの増殖分化能を検討する系の確立を行った。

メチルセルロース含有培地でのスフェア形成の検討

細胞凝集の有無の確認：メチルセルロース含有培地を用いて、倒立顕微鏡を用いて播種した細胞からスフェアが形成される過程を経時的に観察した。また、播種直後と播種48時間後に細胞を核染色し、単一細胞、2細胞塊、3細胞塊の数をそれぞれ計測した。さらに、毛様体上皮より得た細胞を、半量は蛍光マーカー (CFDA) でマーキングし、半量はマーキングせずに混合して播種し、24時間後の2細胞塊を観察した。

分化能の検討：単一スフェアを1%ウシ胎児血清存在下で2週間接着培養することでスフェアを分化させ、ニューロンおよびグリアのマーカー (MAP2 および GFAP) を用いて2重染色を行い、分化能を検討した。さらに、1次スフェアより分化した細胞における網膜細胞マーカー (opsin, GRK1a/b, vimentin, PKC, calbindin) の発現を免疫染色および RT-PCR で検討した。

増殖能の検討：培養あるいは経代後7日目にスフェア形成率と得られたスフェアの直径を計測し、スフェア形成細胞の形成率および増殖能を評価した。限定希釈法により1つの2次スフェアを形成するのに必要な1次スフェア数を求めた。

B-2. ラット網膜幹/前駆細胞の領域特異性の検討

ラット網膜・毛様体細胞の取得

網膜の領域特異性の検討には成体ラットの毛様体細胞を用いた。また、網膜内の領域特異性の検討のためには、ラット網膜 (胎生18日齢) および毛様体 (6-8週齢) を dorsoventral, nasotemporal axes にそって4つの領域に分割し、それぞれの領域より酵素処理を用いて細胞を単一細胞として取得した。

網膜幹/前駆細胞の培養

スフェア法による検討：メチルセルロース含有培地を用いたスフェア法により7日間培養することで、スフェアを形成し、免疫染色によってニューロン・グリア系への分化を確認した。また、元の細胞集団に含まれる前駆細胞の割合を、スフェア形成率を指標に、前駆細胞の増殖能をスフェアの直径を指標に検討した。

単層培養法による検討：PLL/fibronectin-coated dish を用いて10%FBS存在下で、既報に従って増殖可能な前駆細胞を取得し、ニューロン・グリア系への分化を免疫染色によって確認し、7日後に取得される総細胞数を計測した。

網膜マーカーの発現

取得された、スフェア、あるいは接着培養した細胞から常法に従って reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) によって網膜領域特異性マーカー (Rx, Chx10, Foxn4, RORb)、および網膜背腹前後軸マーカー (Vax2, Tbx5, Eph-A3, B3, ephrin-A2, B1) の発現を検討した。

(倫理面への配慮)

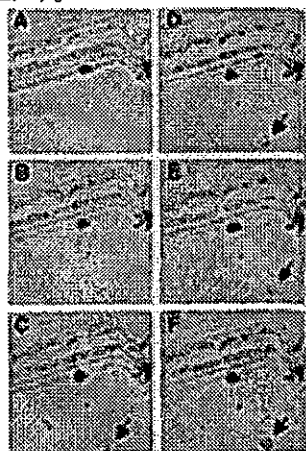
全ての動物実験はARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Researchに則り行った。

C. 研究結果

C-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

家兔の眼球毛様体上皮細胞を用いて、様々な濃度のメチルセルロースを含有した培地によるスフェア

法を検討した結果、系時的な観察によってスフェア形成時に細胞の移動がほとんどないことが判明した(図2)。



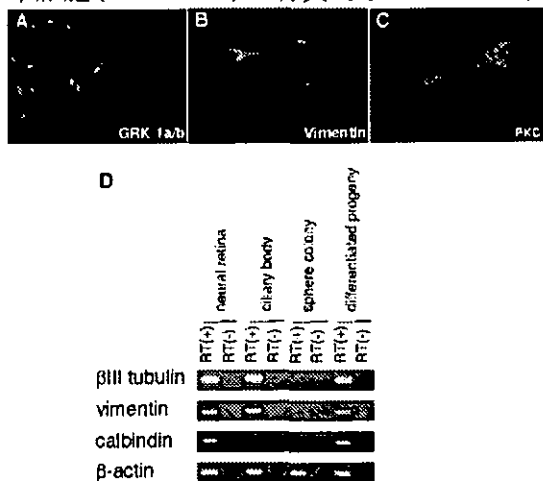
(図2)スフェア形成時の経時的変化

(A:24 時間後、B:48 時間後、C:3 日後、D:4 日後、E:6 日後、F:8 日後)

また、播種直後は約 90%の細胞が単一細胞で、その割合は 48 時間後にも変化しなかった。さらに、培養開始時に半量は蛍光マーカーでマーキングし半量はマーキングせずに混合し 24 時間後に観察した結果、2 細胞塊は、いずれも蛍光 (+) か蛍光 (-) であった(n>100)。以上より、本培養系では大部分のスフェアは細胞凝集によること無く単一細胞の細胞増殖によって形成されたと考えられた。

得られた単一の 1 次スフェアを分化させ、免疫染色を用いて分化能を検討した結果、23%は MAP-2 陽性ニューロン、GFAP 陽性グリアの両方の細胞系譜に分化したが、5.6, 68%は、それぞれニューロンあるいはグリアどちらかの細胞系譜にしか分化できない事が判明した。

また、スフェアより分化した細胞は、免疫染色では、視細胞(GRK1a/b)、ミューラー細胞(vimentin)および双極細胞(PKC)のマーカーで染色され、RT-PCR では視細胞(opsin)、ミューラー細胞(vimentin)、水平細胞(calbindin)に特異的なマーカーを発現していることが確認された(図3)。



(図3)網膜特異的マーカーの発現

(A-C)免疫染色。

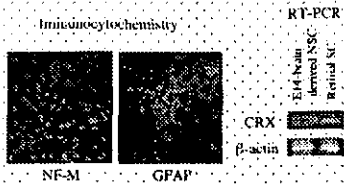
(A) GRK1a/b (B) Vimentin (C) PKC

(D) RT-PCR

1 次スフェアの形成率は、0.11%で、2 次スフェアの形成率は 0.99%であった。また、スフェアの直径は 1 次は 74μm、2 次は 81μm、3 次は 81μm であった。さらに、限定希釈法で 1 個の 2 次スフェアを形成するためには 1 次スフェア 5.58 個を必要とすることが明らかとなった。

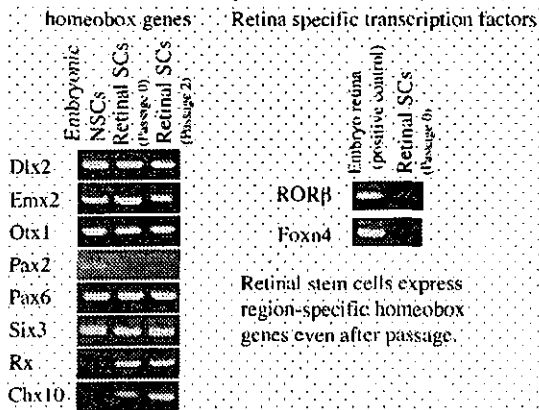
C-2. ラット網膜幹/前駆細胞の領域特異性の検討

網膜幹細胞/前駆細胞は神経系、グリア系の細胞へと分化した(図4)。また、他の中枢領域由来の幹細胞と異なって、網膜細胞の最終分化マーカーCRX (cone-rod homeobox)を発現する事を確認したが、いかなる培養条件下においても網膜細胞の構成細胞の一部の細胞の分化マーカーの発現は確認できなかった(図4)。



(図4) ラット網膜幹/前駆細胞の分化能
(左パネル;免疫染色, 右パネル; RT-PCR)

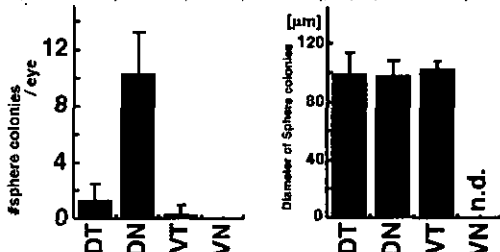
In vivoにおいて中枢神経細胞分化過程において、網膜領域は Rx, Chx10 等のホメオボックス型の転写因子や Foxn4, RORb 等の領域特異的転写因子によって規定されている。このため、培養によって獲得した前能由来の幹細胞とこれらの因子の発現の違いを比較検討した。その結果、前能由来の幹細胞とこおなって網膜幹細胞/前駆細胞は、これらの網膜領域特異的なホメオボックス型転写因子を発現している事が明らかとなった。しかしながら、Foxn4, RORb 等の非ホメオボックス型転写因子の発現は認めなかった。



(図5) 網膜前駆細胞の網膜領域遺伝子発現の検討 (RT-PCR)

さらに、網膜内での領域特異性の検討を行い、以下のような結果を得た。

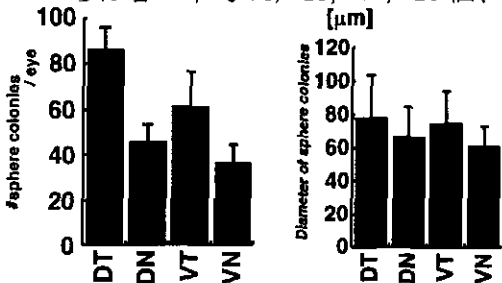
スフェア法による検討: スフェア法では E18 網膜および CE から前駆細胞が取得され、ニューロン・グリアへの分化が確認された。上耳側、上鼻側、下耳側、下鼻側より 1×10^4 細胞当たり E18 網膜では各々平均 1.3, 0.3, 10, 0.4 個、直径 76, 73, 78, 68 μ m のスフェアが形成された(図6)。



(図6) E18 胎生網膜由来のスフェアの形成率および直径

DT; dorso-temporal, DN; dorso-nasal, VT; ventro-temporal, VN; ventro-nasal

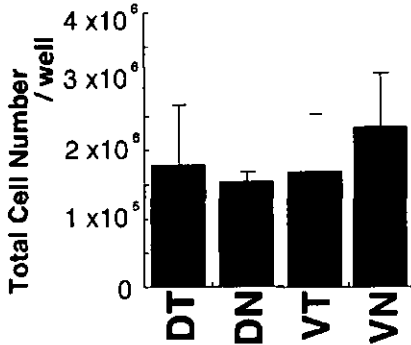
CEからは各々平均 31, 25, 31, 23 個、直径 78, 66, 74, 60 μ m のスフェアが形成された(図7)。



(図7) 毛様体由来スフェアの形成率および直径

また、E18 網膜由来のスフェアでは背腹前後軸マーカー全ての発現が認められ、CE 由来スフェアでは、Vax2, Tbx5 は同定できなかったが Eph, ephrins の発現を認めた。

単層培養法による検討：単層培養法ではE18網膜から前駆細胞が取得された。免疫染色によってニューロンへの分化が確認された。上耳側、上鼻側、下耳側、下鼻側から得られる細胞数に差はなく(図8)、いずれも背腹前後軸マーカー全てを発現していた。



(図8) 単層培養法による取得された網膜前駆細胞数

C-3. 視細胞/視細胞前駆細胞の選択的回収

最後に、これらの網膜幹細胞/前駆細胞由来の視細胞/あるいは視細胞前駆細胞を選択的に取得する系を確立する事を目的に実験を進めた。現時点では、まずアデノウイルスを網膜幹細胞/前駆細胞から分化した細胞に感染させるための最適な条件を決定した。現在はアデノウイルスにCRX (cone-rod homeobox) の視細胞特異的な発現制御エレメント制御下に蛍光タンパク質GFP (green fluorescent protein) を発現する遺伝子を組み込み、蛍光を発する細胞を回収する系を作成中である。

D. 考察

1. 2%のメチルセルロース含有培地を用いる事で細胞の融合によらず、単一細胞よりクローナルに増殖したスフェアを産生する系を作成する事に成功した。更に、このスフェア法を用いて、個々のクローンの分化能、増殖能を検討した結果、取得された細胞の約80パーセントが単一分化能力しか有さない前駆細胞であったのに対して、残りの約20パーセントは少なくとも2種類の細胞系譜へと分化する前駆細胞、あるいは幹細胞である事が判明した。また、これらのスフェアを単一細胞に分散した後に、再度スフェア法による培養を行って更なる増殖能力を有する細胞を含むスフェアの割合を検討した。その結果、約20パーセントのスフェアがその内部に増殖能力を含む細胞を含有していた。これらの結果を考えあわせると、家兎毛様対上皮に含有される網膜幹細胞/前駆細胞のうち比較的未分化な細胞の割合は約20パーセントであり、残りの80パーセントは分化の比較的進んだ細胞であると考えられた。

成体家兎の毛様体上皮より取得される網膜幹細胞/前駆細胞のうち未分化なもの割合は約20パーセントと、これまでにマウスで報告されている割合(100%)よりも低かった。この家兎の結果を他の大型ほ乳動物に直接当てはめる事は不可能であるが、ヒトにおいても同様に未分化細胞の割合が限定されている可能性がある。また、系代培養するに伴って増殖能力が低下し、未分化性を決定する因子の発現の低下が認められた。このため、細胞移植療法の目的で、大量の未分化網膜幹細胞/前駆細胞を取得するには、スフェア法の改良や、スフェア法以外の方法で成体眼球より、増殖能力の高い細胞を取得する方法の確立が必要である。

他方で、ラットを用いた解析では眼球由来の網膜幹細胞/前駆細胞は他の領域の神経前駆細胞と異なって、網膜固有のマーカーを発現しうる事が分かった。これは、網膜幹細胞/前駆細胞は眼領域に特異的な因子を発現しているためであると推察された。しかし、産出される細胞からは網膜構成細胞の分化マーカーの一部の発現は観察されなかった。すなわち、培養網膜幹細胞/前駆細胞がこれまでに知られている網膜特異性を決定する因子のすべてを発現していない事と関連している可能性が存在する。網膜幹/前駆細胞から全ての網膜細胞を産出するためにはこれまでの分化誘導条件について更なる検討を行うだけでなく、内在性の因子を修飾するような方法も必要であるかもしれない。

また、網膜内の幹細胞の領域特異性を検討した結果、スフェア法では胎生感覚網膜・成体毛様体よりニューロン・グリアへの細胞系譜へ分化する細胞が得られた。また、単層培養法では胎生期感覚網膜よりニューロンへの分化能を有する細胞が得られた。このようにスフェア法と単層培養法では起源となる細胞が異なり、得られた前駆細胞の分化能が異なることが明らかとなり、スフェア法では単層培養法より分化能の高い前駆細胞が取得される可能性が示唆された。

また、スフェア法では細胞を取得する部位の違いによって増殖能、分化能の違いが存在することが分かった。しかしながら、単層培養法では部位による分化増殖能の違いを認めなかった。また、いずれの方法を用いても培養網膜前駆細胞は取得部位以外の領域特異的遺伝子も発現した。以上から、網膜前駆細胞の領域特異性の獲得には細胞外からのシグナルが必要であることが示唆された。

また、今後、網膜幹細胞／前駆細胞より視細胞を分離するような方法を確立する事によって視細胞およびその前駆細胞のみを移植すると行い新たな細胞移植療法の有効性を検討していく予定である。

E. 結論

成体家兎毛様体上皮由来の網膜前駆細胞を取得し、分化増殖能を単一クローンレベルで明らかにした。その結果、家兎の成体毛様体上皮由来の網膜前駆細胞はヘテロジェニックで、少なくとも二分化能を有するクローンと単分化能のクローンが存在することが明らかとなった。また、ラット培養網膜前駆細胞と前脳由来神経前駆細胞のマーカ発現の違いを検討し、網膜神経前駆細胞は、前脳由来神経前駆細胞と異なるマーカを発現することを明らかにした。さらに、ラットの網膜内を領域に区分し、網膜前駆細胞の増殖能および領域別マーカを検討した結果、部位により増殖能に多少の違いがあるものの、領域別マーカ発現には違いが無い事を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) Yoko Kawase, Yasuo Yanagi, Tsuyoshi Takato, Manabu Fujimoto, and Hitoshi Okochi Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: Transforming growth factor- β (TGF- β) facilitates cell growth *Exp. Cell Res*, 295: 194-203, 2004
- 2) Yuji Inoue, Yasuo Yanagi, Yasuhiro Tamaki, Saiko Uchida, Yoko Kawase, Makoto Araie and Hitoshi Okochi Clonogenic analysis of ciliary epithelial derived retinal progenitor cells in rabbits 2004, manuscript in preparation
- 3) Yasuo Yanagi, Yuji Inoue, Yoko Kawase, Saiko Uchida, Yasuhiro Tamaki, Makoto Araie and Hitoshi Okochi Properties of growth and molecular profiles of rat progenitor cells from ciliary epithelium 2004, manuscript in preparation

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

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

分担研究者 三嶋 弘 広島大学医学部 教授

研究要旨：緑内障性神経障害の発症機序およびその病態は不明であり、現在では治療法として眼圧降下療法のみである。しかし、眼圧が降下した場合でも、緑内障性神経障害が進行する症例は多く見られることより、眼圧に依存しない緑内障性神経障害の病態が存在するものと推察される。我々は、今回の分担研究において、眼圧ではなく、眼内とくに網膜神経における内在性タンパクの関与の可能性について検討した。具体的には、1) 緑内障モデルマウスを用いたプロテオミクス解析を行って、緑内障関連タンパクとしての候補タンパク群のスクリーニングを行うこと、2) それら候補タンパクの機能解析を行って緑内障の病態を解明し、実践的臨床応用を前提とした緑内障性神経障害に対する新規治療法の開発すること、を主目的とした。

A. 研究目的

緑内障の病態に関与する関連タンパクのを見つけ出してその病態を解明し、さらに眼圧降下療法以外の新しい治療法を開発すること。

B. 研究方法

1) 緑内障モデルマウス (DBA2/J マウス) は生後6ヶ月から9ヶ月にかけて緑内障性神経障害を生じることが知られている。したがって、生後5ヶ月、7ヶ月、11ヶ月の網膜組織を観血的に分離し、組織溶解液としてサンプル採取した。それぞれのサンプルを別々に2次元電気泳動をおこなって、アクリルアミドゲルに展開し、含まれるタンパク群を各々の独立したスポットとして可視化した。得られたタンパク・スポットの発現量をPD-Quest software (Bio-Rad 社) を活用して解析し、生後5ヶ月、7ヶ月、11ヶ月で、発現量の変動するスポットを見つけだした。質量分析器 QSTAR-XL (Applied-Biosystem 社) を用いて、それらのスポットのタンパク名を同定した。

2) 2次元網膜組織培養系、網膜神経節細胞分離培養系、および R28 継代培養網膜細胞系を用いて、候補タンパクの強制発現系および RNAi を用いた発現抑制系を樹立し、その機能解析を行う。

(倫理面への配慮)

ARVO の規定に従う

C. 研究結果

まず再現性を有する2次元電気泳動ゲルを作成し、明らかに発現量の変化を認めるスポットを50個以上見出すことに成功した。スポットのタンパク名については現在同定作業が進行中であるが、すでにいくつかのタンパク (Aldolase-1, Glutamine-synthetase, recoverin, etc.) については同定作業が終了した。

D. 考察

同定済みの候補タンパクは細胞内シグナル伝達系の構成因子であり、それらの候補タンパクらが緑内障性神経障害の病態に関与する可能性が示唆された。ただし、上記前述の候補タンパク群の同定作業の完了をもって、直ちに、2) タンパク機能解析に移行する必要がある。

E. 結論

緑内障性神経障害の進行には、多くの細胞内タンパクが関与し、そのシグナル伝達系の異常が主病態である可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表：平成16年 第15回緑内障学会 緑内障モデルマウスを用いたプロテオミクス解析（発表予定、演題採択済み）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

分担研究者 阿部春樹 新潟大学医学部 教授

研究要旨：

昨今、基本的な生命現象のみならず疾患における病態の解明においても遺伝子改変動物存在が多く貢献している。我々は緑内障による網膜神経細胞死のメカニズムを探求するにあたり、アポトーシス機構の解明、生体下での評価、それぞれに有用であると思われる遺伝子改変マウスを用いて研究を行なった。以下にプロジェクトを示した。

- 1、緑内障モデルマウスにおける、NMDA 受容体 $\epsilon 1$ サブユニットの役割の解明
- 2、蛍光蛋白発現マウスを用いた、生体下網膜神経節細胞死評価法の確立

プロジェクト1：緑内障モデルマウスにおける、NMDA受容体 $\epsilon 1$ サブユニットの役割の解明

A. 研究目的

NMDA 受容体 $\epsilon 1$ サブユニットの網膜における機能の解析と網膜神経節細胞死への関与の解明を目的とする。 $\epsilon 1$ サブユニットノックアウトマウスを用い臨床的緑内障に近いモデルマウスを作製し、 $\epsilon 1$ サブユニットの神経保護作用が認められれば、新しく緑内障治療に結びつくことができるのではないかと考えている。

B. 研究方法

マウス眼圧測定法の確立。従来の眼圧測定機器は人間を対象としているため、角膜径が約4mmのマウスに流用することは不可能である。そこで、内径0.04mmのガラス管を用いて水銀圧力計を作製した。

慢性眼圧上昇モデルを作製と評価。房水流出経路の一つである上強膜静脈をナイロン糸にて結紮することで慢性眼圧上昇モデルを作製した。眼圧上昇処置後、1ヶ月、3ヶ月後にマウス眼球を摘出し、網膜切片および視神経切断切片を作製した。網膜各層の細胞数や視神経髄鞘数を測定し、その変化を統計学的に評価した。

この慢性眼圧上昇モデルにおける網膜神経細胞死に、NMDA 受容体が関与しているのかを明らかにするために、NMDA 受容体を構成しているサブユニットの一つである GluR $\epsilon 1$ (NR2A) サブユニットが欠損したマウスに先述の上強膜静脈血流遮断法を適用し、この分子の役割を組織学的に検討した。

C. 研究結果

マウスの眼圧を測定するため、水銀マンオメーターを作製した。マンオメーターの較正をするために、摘出した眼球を用いて負荷した静水圧を正確に測定できることを確認した。このマンオメーターで測定した C57BL / 6 マウスの眼圧は $12.9 \pm 0.3 \text{ mmHg}$ であった。

慢性的な高眼圧を引き起こすために、耳上下側2方向の上強膜静脈の血流を遮断した。その結果、遮断3日後に眼圧は $23.7 \pm 1.5 \text{ mmHg}$ と上昇した。血流遮断後3日、1週、2週、4週の時点で正常より有意な上昇を示した。遮断後8週、12週、16週、20週では血流遮断前と有意な差を認めなくなった。この結果、眼圧を少なくとも4週にわたって 20 mmHg 以上に保持することができた。

この慢性的高眼圧による病理学的な変化を検討した。遮断4週後の網膜において、網膜神経節細胞の脱落や核の変性と思われる濃縮像と、内網状層の菲薄化を認めた。この病的変化を定量的に測定するため、網膜を中心部と周辺部に分け各領域の細胞核数を測定した。RGC数は、遮断4週後において無処置眼と比して中心部88.3%、周辺部71.8%と共に減少が認められた。高眼圧による病理学的な変化がほとんど認められないとされているONC数を用いたRGC / ONCの比較では、中心部での減少率86.0%、遠位部74.6%となりRGC数と同様の結果が得られた。また、INC数に大きな変化はなかった。遮断12週後は、4週後と比してRGC数に有意な減少を認めなかったものの、残存した細胞核に膨潤や萎縮など変性したものが多く認められた。INC数の減少は認めなかったが、内網状層の厚みは明らかに減少しており、網膜全体の変性が進んでいることが観察された。RGC / ONC では中心部82.8%、周辺部で72.0%の減少率を示した。さらに、球後視神経の横断面では、強拡大において有髄神経の減少が認められた。

NMDA受容体が慢性的な高眼圧によって惹起される網膜神経細胞死に関与するかを調べるため、NMDA受

容体GluR ϵ 1 (NR2A) サブユニットが遺伝的に欠損したマウスに、先述の上強膜静脈血流遮断法を適用した。遮断4週後の眼圧は 20.1 ± 1.1 mmHgであり野生型マウスの値と差はなかったが、組織学的な変性はほとんどを認められなかった。一方、遮断12週後になると眼圧は 14.9 ± 1.2 mmHgと野生型マウスと同様であったが、遮断4週後では認められなかった網膜神経節細胞の変性脱落や内網状層の厚みの減少が認められた。この変化を細胞数で見ると、GluR ϵ 1ノックアウトマウスでは、遮断4週後の眼圧上昇群と対照群の間で差が認められない。しかし、遮断12週後では、網膜神経節細胞核の膨潤や萎縮などの変性像が多く認められ、内網状層の厚みの減少もおこっており野生型の病変と同様の結果となった。RGC / ONCは、中心部85.0%、周辺部75.9%と減少しており、野生型マウスと差が認められなかった。したがってNMDA受容体GluR ϵ 1サブユニットの欠損は、4週間までの細胞死を防ぐことはできるが、それ以後の病変には関与しなかったと考えられた。

D. 考察

緑内障病態によって生じる網膜神経細胞死の原因の一つに、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の興奮毒性の関与が考えられている。これに対し、これまでグルタミン酸の硝子体内投与や、グルタミン酸に対する阻害剤の投与などによる間接的な研究がなされてきている。しかし、グルタミン酸に対する受容体についての直接的な研究の報告がなく、その詳細な解析は神経細胞死のメカニズムの解明に不可欠であると考えられる。本研究は、グルタミン酸受容体である NMDA 受容体のサブユニットをノックアウトしたマウスを用いて慢性眼圧上昇モデルを作製し、その網膜の組織学的な解析から受容体が網膜神経細胞死に関与していることを明らかにした。現在用いている眼圧測定法はマウス前房内に針を挿入して測定するために、同一眼での測定は一回のみである。そこで、同一個体の眼圧を連続して測定するために、ゴールドマン眼圧計を改良してマウス眼圧を測定できるように試みている。また増幅器、アンプ、トランスデューサーを用いた眼圧計を考案中である。

E. 結論

緑内障における視神経障害の発症・進展における神経細胞死のメカニズムの一端がグルタミン酸であることは既に明らかではあるが、その分子機構を解明することは、将来的な抗緑内障薬の開発に不可欠なものである。本研究によってグルタミン酸受容体の一つであるNMDA受容体が、神経細胞死に主要な役割を果たしていることが直接的に示され、さらにその中でも ϵ 1サブユニットが重要な働きを持つことが証明された。選択的 ϵ 1サブユニット阻害剤の開発により、緑内障における網膜神経節細胞死に対する保護効果が期待される。

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2：蛍光蛋白発現マウスを用いた、生体下網膜神経節細胞死評価法の確立

A. 研究目的

緑内障は視野欠損を主症候とする慢性進行性疾患であり、組織学的には網膜神経節細胞死に伴う視神経脱落が認められる。緑内障の原因解明には網膜神経節細胞死の生ずるアポトーシスメカニズムの解明が必要である。この点において、動物実験による網膜神経節細胞死の評価が必要となるが、従来の評価方法では同一固体での経時的変化が追えず、定量性が低いと考えられ、より良いモデルマウス作製が必要と考えた。このような背景から、本研究では網膜神経節細胞膜表面抗原である Thy-1 に蛍光物質を遺伝子導入し、網膜神経節細胞死を評価するための新たなモデルマウスの作製を行い、そのモデルマウスを用い、網膜神経節細胞死の新たな評価系を確立する事を目的とした。

B. 研究方法

① プラスミドベクターの作製

thy1.2を含む既存のプラスミドベクターからthy1.2のcording regionを制限酵素で切り出し、thy1.2のプロモーター領域の下流にPCRで増幅したEGFP(蛍光発色蛋白)cording regionを導入し、新たなベクターを作製する。そのベクターをマウス卵細胞にmicroinjectionした。

② Tgマウスゲノム解析

離乳子の尻尾よりゲノム抽出を行い、PCR及びsouthern blotting法にて、導入遺伝子発現の確認を行った。Thy1-EGFP遺伝子導入が確認されたマウスを育成し、蛍光顕微鏡にて網膜神経節細胞の蛍光発色を組織学的手法で確認した。網膜神経節細胞のみが発色した系統を確立し、以後の実験に使用した。

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

網膜神経節細胞特異的マーカーであるthy1.2遺伝子を含むプラスミドベクターを作製し、培養細胞にて本ベクターの蛍光発色を確認した。

このベクターをマウス卵細胞にmicroinjectionし、トランスジェニックマウスを作製した。42匹の産仔の尻尾よりゲノム抽出を行いPCRにて、導入遺伝子発現の確認を行った。7匹のファンダーマウスを得ることができ、そのうち3系統で目的の網膜神経節細胞の蛍光発色が組織学的に確認できた。2系統ではほぼ全ての網膜神経節細胞の蛍光発色を、1系統で一部の蛍光発色を認めた。

D. 考察

今回の実験において、マウスthy1.2遺伝子を用いることで、網膜神経節細胞が特異的に標識されるトランスジェニックマウスを作製することができた。トランスジェニックマウス系統ごとに様々なGFP発現パターンが確認されたが、ほぼ全ての網膜神経節細胞のみが蛍光発色するトランスジェニックマウス系統を確立し、実験に使用した。

今回報告する網膜神経節細胞死の新たな評価法の特徴は、非侵襲的に且つ生体下で繰り返し同一部位の網膜神経節細胞を観察できる点である。従来の評価法は、組織学的手法にしても生化学的手法にしても抜眼が必須であるため、多くのサンプルを必要とした上に、同一個体での経時的変化を測定することは不可能であった。本研究での方法では慢性眼圧上昇モデルや神経保護作用を持つ薬剤の評価など、長期間のフォローが必要な実験にも対応できる点が優れていると考えられる。

また、従来の評価法では網膜神経節細胞の同定のため、逆行性標識のため上丘への蛍光色素注入といった侵襲的操作が必要であり、間接的な影響も無視できなかった。加えて、生体下で網膜神経節細胞死が評価できるため、同じ組織を他の組織学的もしくは生化学的実験に用いることも可能となる。

以上のことから、本トランスジェニックマウスを用いた網膜神経節細胞死の新たな評価法は今後の緑内障をはじめとする網膜神経節細胞死を誘導する眼疾患の研究において有用であると思われる。

我々は、今後これらのマウスを用いて、SLOによる生体下での観察系を確立し、各種の緑内障モデルへと応用していく予定である。

E. 結論

網膜神経節細胞の特異的マーカーであるthy1遺伝子のプロモーター下流にGFPを発現させ、網膜神経節細胞が特異的に標識されるトランスジェニックマウスを作製した。

本トランスジェニックマウスを用いた眼底蛍光撮影は網膜神経節細胞死の長期評価の経済的かつ有用な方法となりうる。

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5月 ARVO meeting Florida USA.

Live imaging of retinal ganglion cells in transgenic mice expressing GFP as an index of RGC damage under anesthetized mice

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mabuchi F, Lindsey JD, <u>Aihara M</u> , Mackey MR, Weinreb RN.	Optic Nerve Damage in Mice with a Targeted Type I Collagen Mutation	Invest Ophthalmol Vis Sci	45	1841-1845	2004
Kawase Y, <u>Yanagi Y</u> , Takato T, Fujimoto M, Okochi H	Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: Transforming growth factor-b (TGF-b)) facilitates cell growth	Exp Cell Res	295	194-203	2004

20030583

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。