

女比は1.4:1と男性が多く、平均年齢は65.6歳であった。障害の等級は1級が16%、2級26%、3級11%、4級15%、5級24%、6級8%であった。

D. 考察

1989年の調査で視覚障害の第一位の原因であった糖尿病網膜症は2位に後退し、一位は緑内障、3位が黄斑変性症となった。総じて高齢化による視覚障害の割合が増加している。

本調査の対象となった視覚障害の申請率については、男性の申請率が女性のその1.9倍、60歳未満の申請率が60歳以上の1.9倍、3級以上が4級以下の6倍と高いことが示唆されている。このことは、上記の知見を性、年齢、障害の等級別の申請率によって補正する必要があることを示唆しているが、性・年齢・障害の等級別の申請率を明らかにした知見はない。今後の課題である。

E. 結論

現在の視覚障害の原因の第一位は緑内障、第二位は糖尿病網膜症、第三位は黄斑変性症と網膜色素変性症がほぼ同率で続いている。これらの知見は性・年齢・障害の等級別の視覚障害申請率によって補正する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

中江公裕：日本における視覚障害の現状、第57回日本臨床眼科学会（名古屋）、シンポジウム Vision2020、2003年11月3日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1. 参考文献

1. 厚生労働省：平成13年度身体障害者実態調査2003.
2. 高橋宏：臨眼52:1055, 1998.
3. 堀田一樹ら：日本の眼科74:1021, 2003.
4. 田村久美子ら：臨眼54:1091, 2000.
5. 谷戸正樹ら：あたらしい眼科17:1315, 2000.
6. 守本典子ら：あたらしい眼科16:587, 1999.
7. 藤田昭子ら：臨眼53:725, 1999.

2. マウス未熟児網膜症モデルにおける intestinal kruppel-like factor の作用

高橋秀徳、松浦恭祐、井上祐治、村中公正、柳 靖雄
玉置泰裕、武田憲文、新藤隆行、永井良三
(東京大)

研究要旨 zinc finger 型転写因子である Intestinal Kruppel-like Factor (IKLF)は下肢虚血モデルの血管新生、心臓血管リモデリングに関与する事が分かっているが、眼球における作用は不明である。今回、まず8から12週齢の IKLF ヘテロ欠損マウスの眼球切片を作成し、網膜血管構造の異常の有無を観察した。また、IKLF ヘテロ欠損型および野生型マウスを生後7日目(P7)からP12まで75%酸素下で飼育後、通常酸素下に戻す事でROPモデルを作成し、眼内病的血管新生への IKLF の関与を検討した。その結果 IKLF ヘテロ欠損型マウスでは網膜および血管構造に異常をみとめず、ROPモデルでは網膜の無血管領域の面積には有意な差を認めなかったが、新生血管領域面積は74%($p=0.0317$)減少していた。以上より、IKLF ヘテロ欠損マウスでは網膜血管に異常は観察されないが、IKLF はROP発生において抑制的に作用することが示唆された。

A. 研究目的

zinc finger 型転写因子である Intestinal Kruppel-like Factor (IKLF)は下肢虚血モデルの血管新生、心臓血管リモデリングに関与する事が分かっている(1)が、眼球における IKLF の作用は不明である。今回、IKLF ヘテロ欠損マウスを用い未熟児網膜症(ROP)モデルを作成し、眼内病的血管新生への IKLF の関与を検討した。

B. 研究方法

まず8から12週齢の IKLF ヘテロ欠損マウスを用いローダミン結合 lectin (con A)の心臓灌流により血管内皮を染色し、網膜血管構造の異常の有無を観察した。次に、IKLF ヘテロ欠損型および野生型マウスを生

後7日目(P7)からP12まで75%酸素下で飼育後、通常酸素下に戻す事でROPモデルを作成した。P17にローダミン結合 lectin (con A)の心臓灌流により血管内皮を染色し、網膜フラットマウントの蛍光顕微鏡観察で、網膜面積、無血管領域面積、新生血管領域面積を測定した。

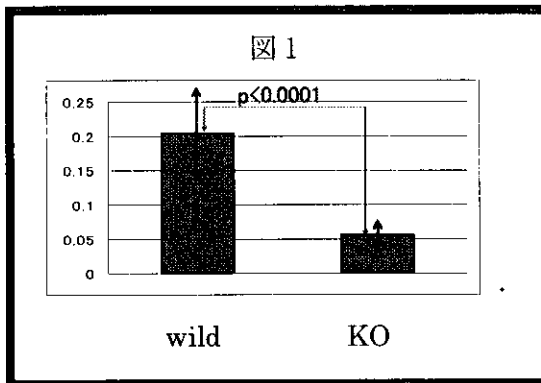
(倫理面への配慮)

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

IKLF ヘテロ欠損型マウスでは網膜および血管構造に異常はなかった。ROPモデルでは網膜の無血管領域の面積には有意な差を認

めなかったが、新生血管領域面積は74% ($p < 0.0001$) 減少していた。



D. 考察

IKLF ノックアウトマウスの網膜血管は正常であったが、虚血による新生血管は有意に減少していた。従って IKLF は網膜血管の発生過程には関与せず、虚血新生血管の発生に関与する可能性があると考えられた。

また、過去の報告においては、VEGF antagonists の網膜新生血管抑制率は 50%、Anti-VEGF antibody は 100%、PTK787 (VEGF および PDGF inhibitor) は 100%、PKC412 (VEGF および PDGF inhibitor) は 100% (2-4) とされており、今回はヘテロ欠損マウスにおいて網膜新生血管の抑制率が 72%であったことから、IKLF は網膜血管新生において比較的重要な因子と考えられた。

E. 結論

IKLF ヘテロ欠損マウスでは網膜血管の発生には異常は観察されないが、ROP 発生において IKLF は抑制的に作用することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Shindo T et al. *Nat Med.* 8:856-63, 2002.
2. Aiello LP et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:10457-61, 1995.
3. Adamis AP et al. *Arch Ophthalmol.* 114:66-71, 1996.
4. Ozaki H et al. *Am J Pathol.* 156:697-707, 2000.

3. 網膜血管新生における MCP-1 と MIP-1 α の役割

吉田茂生¹⁾、吉田綾子¹⁾、石橋達朗¹⁾、Susan Elner²⁾、Victor Elner²⁾

(¹⁾九州大、²⁾ ミシガン大)

研究要旨 単球・マクロファージ/マイクログリア(以下 M Φ)は炎症性の血管新生において重要な役割をもつと考えられている。今回我々は M Φ の走化性因子であるケモカイン、monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)と macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α)のマウス網膜血管新生モデルにおける役割を検討した。生後7日の C57BL/6N マウスを、75%酸素濃度で5日間飼育し、網膜新生血管を作成した。マウス網膜から全RNAおよび蛋白を抽出し、MCP-1およびMIP-1 α の発現レベルをノーザンブロットおよびELISAで検討した。また局在を、In Situ Hybridizationで同定した。生後12.5日にMCP-1とMIP-1 α のmRNAおよび蛋白の発現レベルが上昇した。この時点で両ケモカインの局在は低酸素状態の網膜内層に認められた。F4/80抗M Φ 抗体を用いた免疫染色では、生後16日にM Φ の突起は肥大化し、新生血管に接しているものも存在した。抗MCP-1と抗MIP-1 α 中和抗体の同時投与で網膜血管新生は約30% (P<0.05)抑制された。MCP-1とMIP-1 α はM Φ の走化を介して虚血後の炎症性の網膜血管新生に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

糖尿病網膜症や未熟児網膜症などの病的網膜血管新生において、組織虚血が前駆病態となる。中枢神経系の虚血に伴い、炎症が惹起されることが知られており、虚血後の炎症が、病的網膜血管新生に関与する可能性がある。炎症細胞のうち、単球・マクロファージ/マイクログリア(以下 M Φ)は血管新生において重要な役割をもつと考えられている。今回我々は M Φ の走化性因子であるケモカイン、monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)と macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α)のマウス網膜血管新生モデルにおける役割を検討した。

B. 研究方法

生後7日の C57BL/6N マウスを、75%酸素濃度で5日間飼育し、網膜新生血管を作成した。モデルマウス網膜から全RNAおよび蛋白を抽出し、MCP-1およびMIP-1 α の発現レベルをノーザンブロットおよびELISAで検討した。また局在を、In Situ Hybridizationで同定した。

(倫理面への配慮)

動物の取り扱いにあたっては、ARVOの動物取り扱いガイドラインを遵守した。

C. 研究結果

生後12.5日にMCP-1とMIP-1 α のmRNAおよび蛋白の発現レベルが上昇した(図1)。この時点で両ケモカインの局在は低酸素状態の網膜内層に認められた。F4/80抗M Φ 抗体を用いた免疫染色では、生後17日にM Φ の突起は肥大化し、新生血管に接しているものも存在した。抗MCP-1と抗MIP-1 α 中和抗体の同時投与で網膜血管新生は約30% (P<0.05)抑制された(図2)。

D. 考察

以上の結果より、病的網膜血管新生において、1) 網膜血管の閉塞に伴う網膜内層の虚血に応じたMCP-1とMIP-1 α の発現上昇、2) 両ケモカインによるM Φ の

網膜内層および網膜硝子体界面への遊走促進、3) 虚血部位に遊走した MΦ の低酸素刺激による血管新生因子の放出による網膜血管新生の誘導、の機序が想定された。遊走する MΦ の由来としては、骨髓由来、硝子体由来 (ヒアロサイト)、およびマイクログリアが考えられる。ノーザンプロットおよび ELISA で、両ケモカインは正常コントロールではほとんど発現が見られず、病的虚血状態でのみ発現が誘導されていることより、これらのケモカインと、関与するシグナル伝達系が魅力的な治療の分子標的になる可能性があると考えている。

E. 結論

MCP-1 と MIP-1 α は MΦ の走化を介して虚血後の炎症性の網膜血管新生に関与

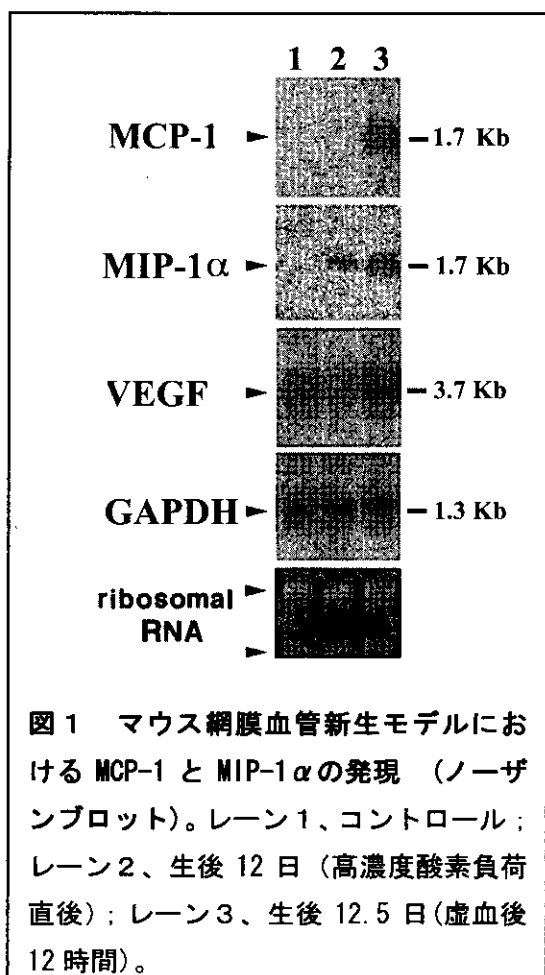


図1 マウス網膜血管新生モデルにおける MCP-1 と MIP-1 α の発現 (ノーザンプロット)。レーン1、コントロール; レーン2、生後12日(高濃度酸素負荷直後); レーン3、生後12.5日(虚血後12時間)。

する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida S et al: Role of MCP-1 and MIP-1 α in retinal neovascularization during postischemic inflammation in a mouse model of retinal neovascularization. *J Leukoc Biol*, 73: 137-144, 2003.

2. 学会発表

1. Yoshida A et al: Role of chemokines in retinal neovascularization during postischemic inflammation in a mouse model of retinal neovascularization. *Ocular Circulation and Neovascularization*. Paris, France, 21-24 September 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

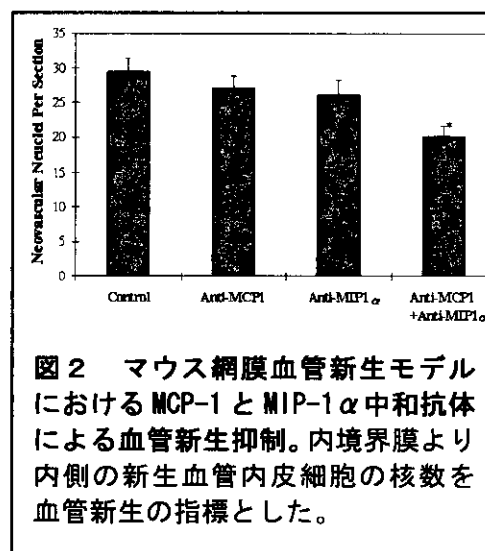


図2 マウス網膜血管新生モデルにおける MCP-1 と MIP-1 α 中和抗体による血管新生抑制。内境界膜より内側の新生血管内皮細胞の核数を血管新生の指標とした。

3. その他

なし

1. 参考文献

1. Yoshida S et al: Involvement of macrophage chemotactic protein-1 and interleukin-1 β during inflammatory but not basic fibroblast growth factor-dependent neovascularization in the mouse cornea. *Lab Invest.* 83: 927-38, 2003.
2. Yoshida S et al: Presence of vitronectin in neovascularized cornea of patient with gelatinous drop-like dystrophy. *Brit J Ophthalmol.* 87: 368-9, 2003.
3. Yoshida A et al: Suppression of retinal neovascularization by the NF- κ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40: 1624-9, 1999.
4. Yoshida A et al: Role of NF- κ B-mediated interleukin-8 expression in intraocular neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39: 1097-106, 1998.
5. Yoshida S et al: Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor α -dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 17: 4015-23, 1997.

20030796

P.14-33, P.41-49, P.66-74, P.78-83, P.88-94, P.104-111, P.138-141, P.159-168, P.183-186, P.191-193, P.200-201, P.215-227, P.252-259, P.263-270, P.279-289, P.314-318, P.326-344は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、それぞれの分担研究報告中の研究発表、参考文献等をご参照ください。

4. 網膜新生血管発生過程の組織学的検討

吉田紀子、片井直達、佐藤敦子、吉村長久

(信州大)

研究要旨 網膜新生血管発生過程を組織学的に検討した。マウスにて網膜新生血管モデルを作製し、抗 CD34 抗体、GS-lectin を用いた免疫組織染色をおこない、血管内皮細胞の動態の経時変化を 3 次元的に検討した。また、成熟マウス骨髄より採取した血管内皮前駆細胞分画を DiI でラベルした後、モデルマウスに静注し標識細胞の評価をおこなった。網膜の虚血部位に一致して、血管内皮細胞と標識細胞の遊走が確認され、それらはアストロサイトと共に glomerular tuft を形成した。その後内境界膜を破った網膜新生血管には移植した標識細胞の取込みが認められた。網膜新生血管は血管内皮細胞前駆細胞の血管外への移動、アストロサイトによる囲い込み、glomerular tuft の形成および血液の供給、内境界膜を破り硝子体への新生血管の伸長という段階を経て形成されると考えられた。

A. 研究目的

一昨年、Grant らにより骨髄由来の造血幹細胞が網膜新生血管の発生に関与することが明らかにされた。この報告は網膜新生血管発生の既存概念を覆すものであった。よって、我々は網膜新生血管発生過程を組織学的に再検討したので報告する。

B. 研究方法

C57BL/6J マウスを生後 7 日目から 12 日目まで 5 日間 75%酸素に暴露し、網膜新生血管モデルを作製した。コントロール群のマウスは、生後より通常酸素濃度下にて飼育した。

酸素負荷後 12、13、14、15 日齢の眼球を摘出し、組織学的特徴を検討した。FITC (fluorescein isothiocyanate) -dextran 50mg/ml をマウス左心室に注入した後、眼球を摘出し、フラットマウント標本作製、同日齢の凍結切片と共に、抗 CD34 抗体、

GS-lectin を用いた免疫組織染色をおこない、血管内皮細胞の動態の経時変化を 3 次元的に検討した。

造血幹細胞の関与を検討するため、成熟マウス骨髄より採取した血管内皮前駆細胞分画を DiI でラベルした後、12 日齢の抗酸素負荷マウスに静注した。13、15、17 日齢にて、FITC-dextran を用い蛍光眼底造影を施行した後眼球を摘出し、フラットマウント標本作製して網膜血管新生および DiI 標識細胞の評価をおこなった。また、同日齢の凍結切片を作製して、組織学的検討もおこなった。

C. 研究結果

高酸素負荷後 13 日齢網膜の虚血部位に一致して、血管内皮細胞と標識細胞の遊走が確認された。14、15 日齢では遊走した血管内皮細胞と標識細胞はアストロサイトと共に glomerular tuft を形成した。この tuft

には、血液供給があるものとないものが存在した。17日齢で内境界膜を破った網膜新生血管には移植した標識細胞の取込みが認められた。

D. 考察

従来網膜新生血管は、既存の血管内皮細胞の増殖により発生すると考えられてきたが、一昨年 Grant らにより、骨髄由来の血管内皮前駆細胞の関与が示唆された。

今回の研究では、モデルマウスに移植した血管内皮前駆細胞は遊走して虚血部位に到達し、アストロサイトに取り囲まれ、増殖して glomerular tuft を形成していた。さらに、内境界膜を破った新生血管の内皮細胞に標識細胞を確認した。tuft の中に血液供給のあるものとないものが認められたことから、遊走した細胞により glomerular tuft を形成した後に、既存血管と交通するという新たな仮説が考えられた。

E. 結論

網膜新生血管は、骨髄由来血管内皮前駆細胞とアストロサイトにより、1) 血管内皮細胞前駆細胞の血管外への移動、2) アストロサイトによる囲い込み、3) glomerular tuft の形成、4) glomerular tuft への血液の供給、5) 内境界膜を破り硝子体への新生血管の伸長という 5 つの段階を経て形成されると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

I. 参考文献

1. Grant MB et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nature Med.* 8. 607-12, 2002.
2. Smith LEH et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35 : 101-11, 1994.
3. Vajkoczy P et al. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J Exp Med.* 197: 1755-65, 2003.
4. Sengupta N et al. The role of adult bone marrow-derived stem cells in choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44 : 4908-13, 2004.

5. 網膜血管新生の初期過程で発現するレンズ蛋白の役割

片井直達、佐藤敦子、吉田紀子、渋谷宏人、後藤謙元、菊池孝信、吉村長久
(信州大)

研究要旨 網膜血管新生の初期段階に関与する重要因子の同定を目的として、DNA マイクロアレイによる遺伝子のスクリーニングをマウス血管新生モデルを使い行った。その結果、レンズ蛋白すなわちベータクリスタリンが高度に発現することが明らかになった。この蛋白は、Glomerular Tuft と呼ばれる、構造体にも高発現しており、生後 13 日から 15 日まで蛋白質レベルで高発現していた。ベータクリスタリンのレンズ以外での機能を明らかにするため、RNA 干渉を使い遺伝子の発現抑制を行った。ベータクリスタリンは、蛋白質レベルで完全に発現を抑制された。その結果、生後 15 日において、Glomerular Tuft の形成が約 90%抑制された。また、生後 17 日において、新生血管は約 70%抑制された。さらに、無血管野の消失を認めた。よって、ベータクリスタリンは網膜血管新生の初期に認められる Glomerular Tuft の形成に関与し、この発現抑制により実験的網膜新生血管の抑制が可能であった。また、本研究は Glomerular Tuft の形成抑制が網膜新生血管の抑制につながるという初めての報告であり、全く新しい網膜血管新生疾患の治療薬開発につながると思われた。

A. 研究目的

網膜新生血管発生初期段階に関与する重要因子の同定を目的として、DNA マイクロアレイを使い約一万個の遺伝子をスクリーニングした。その結果、レンズ蛋白が網膜内に高発現していることを突き止めた。よって、この蛋白質の網膜新生血管における機能解析と、発現抑制による実験的網膜新生血管抑制治療の効果判定を本研究の目的とした。

B. 研究方法

Smith らの (IOVS. 1994) 報告した網膜新生血管モデル (ROP) マウスを使い実験を行った。生後 15 日 (P15) の ROP マウスから眼球を摘出し、4%パラホルムアルデ

ヒド固定後凍結切片を作成し、免疫組織学的方法によりベータクリスタリンの局在を検討した。P13 から P17 の ROP マウスから網膜を採取後、たんぱく質を分離しウエスタンブロッティングによりベータクリスタリン発現の経時変化を検討した。ベータクリスタリン特異的 siRNA をマウス尾静脈より投与し、ベータクリスタリンの発現抑制を行った。その後、P15、P17 における網膜の組織学的変化を網膜新生血管に注目し評価した。

C. 研究結果

Glomerular Tuft は、網膜新生血管が内境界膜を破り硝子体中に増殖する直前に網膜内に形成される構造体で、血管内皮細胞と

それを取り囲むアストロサイトからなる。ベータクリスタリンは、この Glomerular Tuft を構成するアストロサイトにのみ局在した。蛋白発現量は、Glomerular Tufts が一番多く認められる P15 にピークを示した。RNA 干渉によりベータクリスタリンの発現抑制を認めた。その結果、P15 における Glomerular Tuft はコントロールに比し約 90%抑制され、P17 における網膜新生血管は約 70%抑制された。

D. 考察

ベータクリスタリンは網膜新生血管発生の初期に認められる、Glomerular Tuft 形成に関与する重要因子であると推測された。ベータクリスタリンの発現抑制により網膜新生血管形成を抑制できた。また、われわれは Glomerular Tuft 形成抑制が網膜新生血管抑制につながる事を始めて報告した。よって、現在失明の一番の原因である網膜新生血管疾患の全く新しい治療法の開発につながる可能性が示唆された。

E. 結論

ベータクリスタリンは、Glomerular Tuft 形成に関与する重要因子であり、その抑制により網膜新生血管は抑制される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Smith, L. E. H. *et al.* Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35 : 101-11 1994.
2. Lewis, D. L., Hagstrom, J. E., Loomis, A. G., Wloff, J. A. & Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nature Genet.* 32 : 107-8 2002.
3. Wistow, G. Evolution of a protein superfamily:Relationship between vertebrate lens crystallins and microorganism dormancy proteins. *J Mol Evol.* 30 : 140-3 ,1990.
4. Palmberg, P. F. Diabetic retinopathy. *Diabetes* 26 : 703-9 1977.
5. Zhang, Y. & Stone, J. Role of astrocytes in the control of developing retinal vessels. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* 38 : 1653-66 ,1997.

6. 成体ラット及びサル虹彩細胞からの視細胞特異的表現型の誘導

赤木忠道^{1) 2)}、秋田 穰¹⁾、春田雅俊¹⁾、山田雅弘⁴⁾、影山龍一郎²⁾、本田孔士¹⁾、高橋政代^{1) 3)}
(京都大¹⁾、京都大ウイルス研²⁾、京都大探索医療センター³⁾、都立科学技術大⁴⁾)

研究要旨 視細胞の発生、分化、維持に関わるいくつかの遺伝子が今までに報告されているが、どの遺伝子が網膜移植に使用できる視細胞をex vivoで効果的に作り出せるのかはよく分かっていない。成体虹彩細胞の網膜移植の細胞源としての可能性を検討するために、いくつかの遺伝子の強制発現によりラット及びサルの成体虹彩培養細胞から視細胞への分化を誘導し、視細胞としての特徴を、形態、蛋白、mRNA、電気生理レベルでそれぞれ検討した。またそれらの細胞が網膜移植条件下での生着の可否を胎仔網膜への移植実験にて検討した。

A. 研究目的

虹彩色素上皮細胞は神経網膜と共通の起源をもつ組織である。我々は成体ラット虹彩培養細胞が *Crx* 遺伝子導入により視細胞特異蛋白を発現することを以前報告した¹⁾。今回網膜移植細胞源としての観点から、成体ラット及びサル虹彩細胞の性質と視細胞発生に関わる種々の転写因子 (*Crx*, *NeuroD*, *Nrl*, *Otx2*) の強制発現の虹彩細胞に対する効果を検討した。

B. 研究方法

成体 DA ラット及びカニクイザルの虹彩由来培養細胞を無血清培地(DMEM/F12/B27, 40ng/mlbFGF)にて接着培養した。レトロウイルスベクターにてそれぞれの遺伝子を単独あるいは組み合わせて導入後分化誘導条件下(DMEM/F12/B27, 10ng/mlbFGF, 1%FBS)にて2週間分化誘導し、免疫染色法、RT-PCR、細胞内ガラス微小電極法にて検討した。また、器官培養した胎仔網膜の網膜下に遺伝子導入した虹彩細胞を移植

し発育途上の網膜内での生着の可否を検討した。胎仔網膜には網膜前駆細胞の正常な分化に必要な外的因子が揃っているので、移植実験の第一段階としてはいいモデルであると考えられる²⁾。

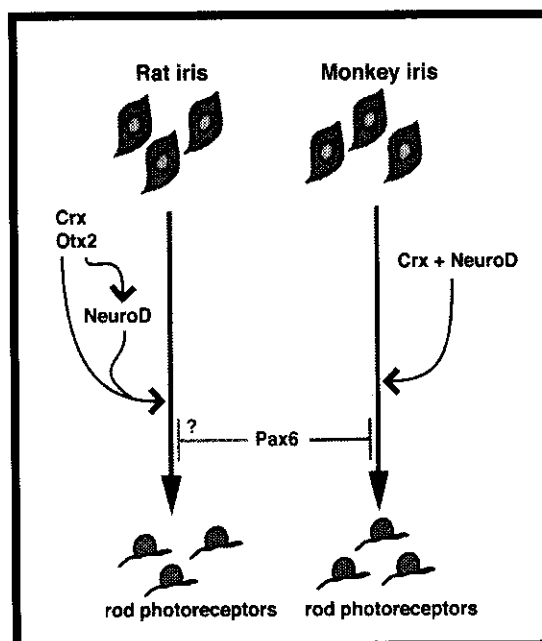


図1 虹彩細胞から視細胞誘導に関わ

C. 研究結果

ラット及びサル の成体虹彩由来細胞は分化誘導前には神経前駆細胞のマーカー (nestin、Musashi) を発現しており、分化誘導にて神経、グリアや、各網膜細胞の特異蛋白の発現が誘導できたことから網膜前駆細胞様の性質を有していることが判明した。また、*Crx* 遺伝子導入された成体ラット虹彩細胞は様々な視細胞特異遺伝子を発現した。成体サル虹彩細胞は *Crx* 単独強制発現では視細胞特異蛋白を発現せず、視細胞特異的表現型を誘導するには *Crx* と *NeuroD* が重要であることが判明した (図 1)。また、それら誘導された視細胞様細胞は光刺激に対して視細胞杆体特異的光応答を示すことが電気生理実験にて明らかになった。さらに器官培養胎仔網膜への移植条件下で、移植した虹彩細胞は網膜内で生着しうることが判明した。

D. 考察

自己の虹彩組織は外科的に比較的容易に採取が可能である。成体虹彩細胞は転写因子の導入により免疫細胞学的、電気生理学的に視細胞の形質を獲得し、他の様々な視細胞特異的遺伝子を発現しており、移植も可能であった。サルとラットでは虹彩から視細胞への分化転換に必要な遺伝子が異なることも判明した。ヒト変性網膜への移植への応用には解決すべき問題点がたくさん存在するものの、その可能性に期待できる結果といえるだろう。

E. 結論

げっ歯類だけでなく霊長類の虹彩細胞から

も視細胞の特徴を十分に備えた細胞を誘導できることが判明した。自家移植が可能である点からも虹彩細胞は網膜移植治療の細胞源として有力な候補の一つである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Akagi T et al: Different characteristics of rat retinal progenitor cells from different culture periods. *Neurosci Lett.*341:213-216, 2003.
2. Suzuki T et al: Effects of prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor on the fate of neural stem cells transplanted into the developing rat retina. *Biochem Biophys Res Commun.* 309:843-7, 2003

2. 学会発表

赤木忠道 他 : basic helix-loop-helix 型転写因子ノックアウトマウスの網膜解析. 第 107 回日本眼科学会総会, 福岡. 2003.
T.Akagi et al: Requirement of Multiple bHLH Genes for Retinal Cell Fate Specification. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1. 参考文献

1. Haruta M et al. Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nat Neurosci.* 4: 1163-4, 2001.
2. Akita J et al. Neuronal differentiation of adult rat hippocampus-derived neural stem cells transplanted into embryonic rat explanted retinas with retinoic acid pretreatment. *Brain Res.* 954: 286-93, 2002.

7. 培養網膜前駆細胞の背腹・前後軸に沿った増殖分化の特性

柳 靖雄、井上裕治、玉置泰裕、新家 眞
(東京大)

研究要旨 網膜には背腹・前後軸方向に、マーカー遺伝子の発現勾配で規定される極性が存在する。今回、Wister ラットの胎生 18 日 (E18) 網膜および成体毛様体上皮 (CE) を背腹前後軸に沿って 4 分し、これらより単層培養法およびスフェア法を使って網膜前駆細胞を取得した。前駆細胞の増殖能を単層培養法では総細胞数を指標に、スフェア法ではスフェアの形成率と直径を指標に検討したところ、単層培養法では E18 網膜から、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、スフェア法では取得される前駆細胞は、部位により増殖能に違いがある事が判明した。また、背腹前後軸マーカーの発現を RT-PCR で検討した結果、いずれも背腹前後軸マーカー全てを発現している事が判明し、前駆細胞はいずれの培養法で取得しても由来部位以外のマーカーを発現しうる事も分かった。

A. 研究目的

網膜前駆細胞と前脳神経前駆細胞は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的マーカーの発現が異なっていることが知られている。例えば、我々は、培養網膜前駆細胞と前脳神経前駆細胞は発現する領域特異的マーカー遺伝子に違いがあることを示した (Yanagi et al., unpublished observations)。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(1)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(2)ことが判明している。

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が存在することが分かっている。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ことが分かっている。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。そこで本研究では、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。

(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。

B. 研究方法

細胞の取得：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。

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(3)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、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。また、RT-PCR によって網膜背・腹・前・後軸マーカー (Vax2, Tbx5, Eph-A3, B3, ephrin-A2, B1) の発現を検討した。

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(4)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、さらに、スフェア法の場合と同様に RT-PCR によって網膜背腹前後軸マーカーの発現を検討した。

C. 研究結果

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, $68 \mu\text{m}$ のスフェアが形成された(図 1)。

CE からは各々平均 31, 25, 31, 23 個、直径 78, 66, 74, $60 \mu\text{m}$ のスフェアが形成された(図 2)。

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

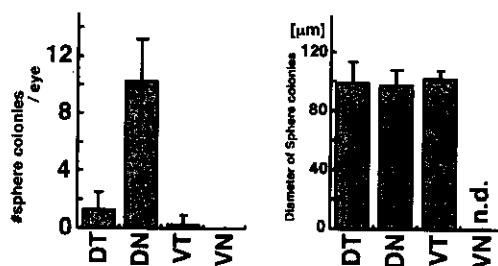


図 1 E18 胎生網膜由来のスフェアの形成率および直径

DT; dorsotemporal, DN; dorsonasal, VT; ventrotemporal, VN; ventronasal

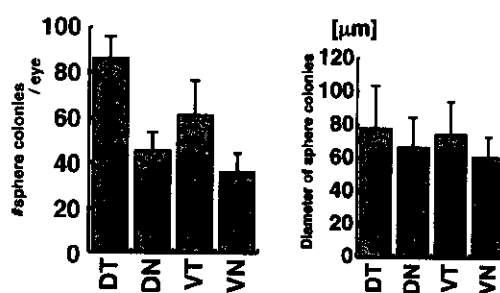


図 2 毛様体由来スフェアの形成率および直径

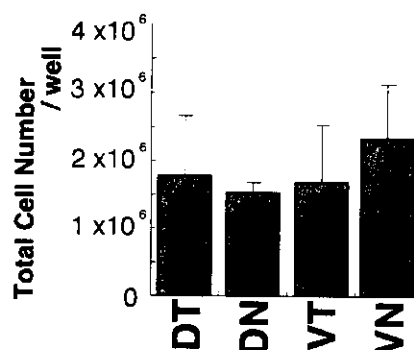


図 3 単層培養法による取得された網膜前駆細胞数

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 3)、いずれも背腹前後軸マーカー全てを発現していた。

D. 考察

本研究ではスフェア法と単層培養法を用いて網膜前駆細胞を取得し領域による特性の

違いを検討した。

まず、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可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、分化能に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に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。

E. 結論

スフェア法で取得される前駆細胞は、部位により増殖能に違いがある。また、前駆細胞はいずれの培養法で取得しても由来部位以外のマーカーを発現しうる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Hitoshi S, Tropepe V, Ekker M, van der Kooy D. Neural stem cell lineages are regionally specified, but not committed, within distinct compartments of the developing brain. *Development* 129:233-44,2002.
2. Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, et al. Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *J Neurosci.* 21:9814-23,2001.
3. Kawase Y, Yanagi Y, Fujimoto M, Takato T and Okochi H: Characterization of multipotent stem cells from the skin: Transforming growth factor (TGF)- β facilitates the cell growth. *Exp Cell Res.* (in press)
4. Kelley MW, Turner JK, Reh TA. Ligands of steroid/thyroid receptors induce cone photoreceptors in vertebrate retina. *Development* 21:3777-85,1995.

8. ウサギ成体網膜前駆細胞の単一クローンレベルでの解析

井上裕治、内田彩子、松浦恭祐、柳 靖雄、玉置泰裕、新家 眞
(東京大)

研究要旨 ほ乳動物において成体網膜前駆/幹細胞がマウス、ラットで取得されることが報告されている。本研究では、スフェア（浮遊細胞塊）として取得した成体ウサギ毛様体上皮由来の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。このため、まず、スフェア形成の培養には細胞凝集を防ぐためメチルセルロースを添加した培地を用い、スフェアが単一細胞の細胞増殖によって形成されることを確認した。このようにして得られた単一のスフェアを分化させると、23%はニューロンおよびグリア両方の細胞系譜に分化したが、他はどちらかの細胞系譜にしか分化できなかった。また、免疫染色およびRT-PCRにより、スフェアより分化した細胞が、各種網膜特異的のマーカを発現していることを確認した。スフェア法で得られた前駆細胞のうち継代可能な細胞は1、2代目でそれぞれ0.11%、0.99%で、それらの増殖能は継代3代目までは同程度であった。さらに、限定希釈法によりスフェア5.58個の中に1つの継代可能な細胞が含まれることが明らかとなった。以上より、ウサギ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判明した。

A. 研究目的

ほ乳動物においては成体網膜前駆/幹細胞（以下前駆細胞）がマウス、ラットで取得されることが報告されている^{1,2)}。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前駆細胞はスフェア（細胞浮遊塊）として取得される（スフェア法³⁾）。しかしながら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。本研究では、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、ウサギ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。

B. 研究方法

細胞培養：成体家兎より既報⁴⁾に従って毛様体上皮細胞を取得し、細胞凝集を防ぐ目的で1.2%メチルセルロースを添加したDMEM/F12培地にEGF(10ng/mL)、bFGF(20ng/mL)を添加し細胞培養を行った。まず、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 (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 (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。

(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

本研究で用いた培養系では、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 1)。

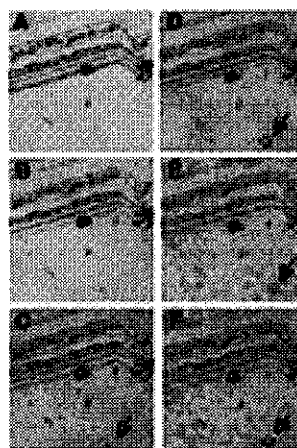


図 1 スフェア形成時の経時的变化

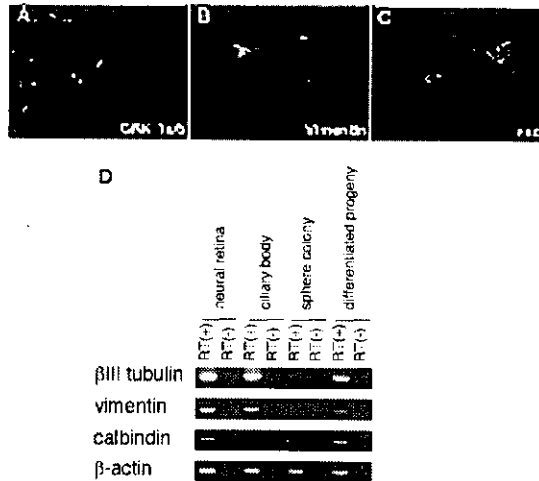
(A:24 時間後、B:48 時間後、C:3 日後、D:4 日後、E:6 日後、F:8 日後)

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2)。



(図2)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。

D. 考察

本研究では、細胞凝集を起こさない系でのスフェアを形成させる系を確立した。この系を用いて単クローンの分可能を検討した結果23%の1次スフェアが2分化能を有しており、77%の1次スフェアは単分化能のみ有していることを示した。単分化能しか持たない前駆細胞は増殖能も限られおり、多分化能を持つ前駆細胞は増殖能も大きく、2次スフェアを形成することができること報告されている^{5,6)}。また、限定希釈法を用い

た実験より、18%の1次スフェアが2次スフェア形成可能であることを示した。以上より、約20%の1次スフェアは、2分化能をもち増殖能も大きい前駆細胞由来のスフェアであり、より未分化な細胞が含まれている可能性があると考えられる。

E. 結論

成体ウサギの成体毛様体上皮から、細胞凝集のない系でスフェアを形成する系を確立した。分化させたスフェア形成細胞は、各種網膜の分マーカーを発現し、2分化能を有するクローンと単分化能のクローンが存在した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

I. 参考文献

1. Tropepe V et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287: 2032-6, 2000.