

rat Muller cells

- Neuroprotective effect of Ca²⁺ channel blockers on hypoxic damage of purified rat retinal ganglion cells
- Reduction of Intraocular Pressure in Mouse Eyes Treated with Unoprostone

2005年4月 APAO meeting Kuara-Rumpul Malaysia.

- Neuroprotective Effects of Flavonoids on Purified Cultured Retinal Ganglion Cells under Oxidative Stress

論文発表

- Ota T, Aihara M, Narumiya S, Araie M. The effects of prostaglandin analogues on IOP in prostanoid FP-receptor-deficient mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005 Nov;46(11):4159-63.
- Jin Y, Uchida S, Yanagi Y, Aihara M, Araie M. Neurotoxic effects of trypan blue on rat retinal ganglion cells. Exp Eye Res. 2005 Oct;81(4):395-400.
- Ota T, Murata H, Sugimoto E, Aihara M, Araie M. Prostaglandin analogues and mouse intraocular pressure: effects of tafluprost, latanoprost, travoprost, and unoprostone, considering 24-hour variation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005 Jun;46(6):2006-11.
- Yamada H, Chen YN, Aihara M, Araie M. Neuroprotective effect of calcium channel blocker against retinal ganglion cell damage under hypoxia. Brain Res. 2006 Feb 3;1071(1):75-80. Epub 2006 Jan 17.

7. 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) それらターゲット・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

緑内障モデルマウスであるDBA2/Jマウス、および網膜グルタミン酸神経毒性モデルマウスであるEAAC1-/-マウスを用いて、緑内障性網膜神経障害に関与する可能性のあるタンパク群を新たに見出すことに成功した。平成17年度では、さらにそれらのターゲット・タンパクの機能解析を、*in vitro*の実験系を用いて行い、眼圧降下療法以外の新しい治療法を開発を目指す。

B. 研究方法

- 1) プロテオミクス解析に用いる 2 種類のサンプルが準備された。一つは、緑内障モデルマウス (DBA2/J マウス) の網膜サンプルで、そのプロテオミクス解析結果から、モデルマウスの緑内

障性網膜神経障害の発生する時期に前後して発現量が大きく変動するタンパク・スポットが同定された。2 つ目は、緑内障性網膜神経障害の主因と考えられているグルタミン酸の膜輸送受容体(EAAC1)のノックアウト・マウスから得られた網膜サンプルも採取され、コントロール・マウスと比較して発現量が変化するタンパク・スポットも同定された。

- 2) 同定されたスポットの質量分析を行い、それらのタンパク名が同定された。それらの中から、細胞死との関連性を有するものや、神経系調節因子としての機能をもつもの等が、優先的にタンパク機能解析をおこなうべきターゲット・タンパクとして選択された。
- 3) それらのターゲット・タンパクの網膜における機能が、分子生物学的手法、すなわち遺伝子導入や組織免疫染色などにより、明らかにされた。

(倫理面への配慮)

ARVOの規定に従う

C. 研究結果

- 1) DBA2/J マウスのサンプルを用いたプロテオミクス解析より、以下のタンパクが緑内障性網膜神経障害に影響を与える可能性を有するタンパクとして、同定された。

mitofusion-1
sepiapterin reductase
T cell receptor beta chain
integrin beta-7
potassium voltage gated channel
glutamine transaminase K
aldolase-1 isoform
Cullin-5
aspartyl-tRNA synthetase
recoverin
protein tyrosine phosphate

HSP-86
Bcl-2 interacting protein-1
beta-actin
glutamine synthetase
beta-tubulin
Creatinine kinase

また、EAAC1ノックアウト・マウスのサンプルを用いたプロテオミクス解析からは、グルタミン酸毒性によって誘導されたタンパクが同定された。

Protein name	EAAC1 ^{-/-} での発現	コントロールでの発現
KIAA protein	+	-
GABA-A receptor	+	-
p300 co-factor JMY	+	-
LEK1	+	-
unnamed protein(1)	+	-
unnamed protein(2)	+	-
RIKEN protein	+	-
Activator of Rho-signaling	+	-
PDGF receptor	+	-
Galnt-7	-	+
Regulator of sex limitation-2	-	+
KIAA 0626 protein	-	+
Hypothetical protein	+/-	+
unnamed protein(3)	+/-	+

2) 上記1)のタンパク群のうち、①T cell receptor beta chain integrin beta-7 Cullin-5 GABA-A receptor beta subunit 1 PDGF receptor alpha subunit がターゲット・タンパクとして選択された。

3) タンパク機能解析の結果として、以下の点が判明した。

①T cell receptor beta chain や integrin beta-7 は、豊富に網膜神経節細胞に存在していることが明らかになった。

Cullin-5 は、DBA2/Jモデルマウスの網膜神経節細胞死の発生する時期に、発現が亢進していることが判明した。

GABA-A receptor beta subunit 1 は、リガンドと共役して、網膜神経節細胞死を誘導する神経毒性を有することが判明した。

PDGF receptor alpha subunit は、グルタミン酸神経毒性を抑制する作用をもつことが分かった。

D. 考察

今回の研究成果として、緑内障性網膜障害に関与するタンパクをスクリーニングして、同定することに成功し、さらに、その一部のタンパクらは、網膜神経細胞の細胞死に関与していることを見出した。それらのターゲット・タンパクの有するシグナル系の相互応答を解明していくことにより、緑内障性網膜神経障害の病態・機序の全容が解明されることが期待される。

E. 結論

緑内障性網膜障害に関与するタンパク群が明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 学会発表:

平成16年日本緑内障学会:緑内障モデルマウスDBA2/Jのプロテオミクス解析

平成17年眼薬理学会:EAAC1ノックアウト・マウスのプロテオミクス解析

G-2. 論文発表

なし

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

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の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 ϵ 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 ϵ 1サブユニットの役割の解明

A. 研究目的

NMDA受容体 ϵ 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。 ϵ 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、 ϵ 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 ϵ 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、水銀マンノメーターを作製した。マンノ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。このマンノメーターで測定したC57BL / 6マウスの眼圧は 12.9 ± 0.3 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 ± 1.5 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20mmHg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。

(Fig. 1) 野生型マウスにおける網膜各層の神経細胞数の変化

	遮断4週後			
	中心部		周辺部	
	control眼	遮断眼	control眼	遮断眼
RGC	16.3 \pm 0.4	14.4 \pm 0.8	11.4 \pm 0.8	8.2 \pm 0.7
INC	125.9 \pm 3.4	122.6 \pm 3.9	90.7 \pm 4.3	89.1 \pm 3.5
ONC	324.9 \pm 13.0	324.7 \pm 11.4	259.7 \pm 12.5	257.0 \pm 12.2
RGC / INC	0.131 \pm 0.004	0.117 \pm 0.005	0.125 \pm 0.005	0.092 \pm 0.007
RGC / ONC	0.052 \pm 0.002	0.044 \pm 0.002	0.045 \pm 0.003	0.033 \pm 0.003

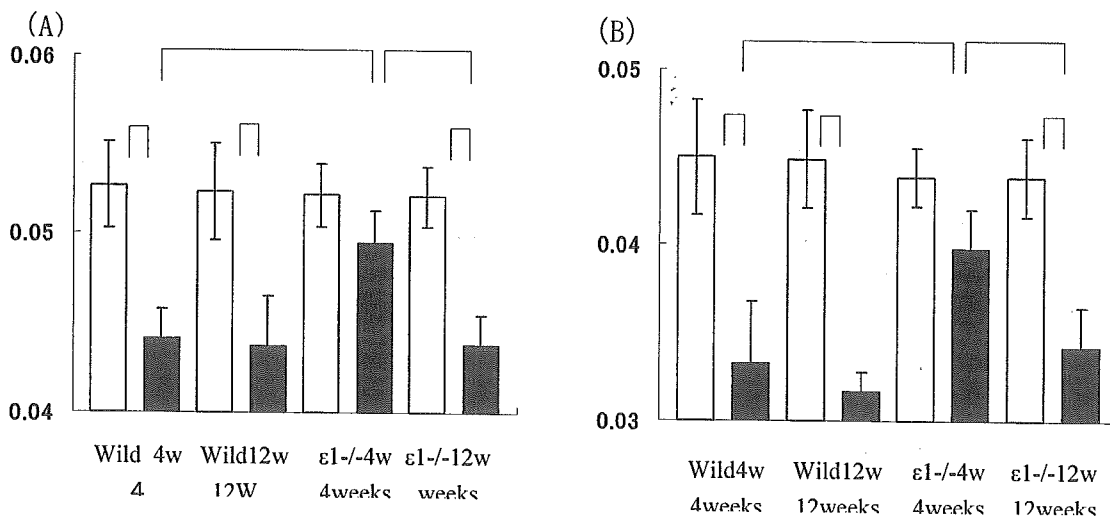
	遮断12週後			
	中心部		周辺部	
	control眼	遮断眼	control眼	遮断眼
RGC	16.6 \pm 0.7	13.6 \pm 0.7	11.3 \pm 0.5	8.2 \pm 0.5
INC	125.3 \pm 5.5	125.2 \pm 5.4	91.6 \pm 5.2	89.5 \pm 4.3
ONC	322.1 \pm 9.3	320.8 \pm 12.0	257.6 \pm 8.9	256.4 \pm 12.8
RGC / INC	0.134 \pm 0.005	0.111 \pm 0.006	0.128 \pm 0.007	0.092 \pm 0.004
RGC / ONC	0.052 \pm 0.003	0.043 \pm 0.003	0.045 \pm 0.003	0.032 \pm 0.001

(Fig. 2) ϵ 1サブユニットノックアウトマウスにおける網膜各層の神経細胞数の変化

	遮断4週後			
	中心部		周辺部	
	control眼	遮断眼	control眼	遮断眼
RGC	16.3 ± 0.4	15.9 ± 0.7	11.4 ± 0.5	10.6 ± 0.5
INC	125.0 ± 3.0	125.6 ± 4.1	90.9 ± 2.8	89.9 ± 3.2
ONC	324.1 ± 10.3	323.1 ± 8.7	257.6 ± 7.6	258.0 ± 11.0
RGC / INC	0.131 ± 0.003	0.127 ± 0.005	0.127 ± 0.005	0.119 ± 0.006
RGC / ONC	0.051 ± 0.002	0.049 ± 0.002	0.045 ± 0.002	0.042 ± 0.002
	遮断12週後			
	中心部		周辺部	
	control眼	遮断眼	control眼	遮断眼
RGC	16.5 ± 0.4	13.8 ± 0.6	11.0 ± 0.5	8.6 ± 0.7
INC	125.1 ± 2.5	125.0 ± 4.3	90.4 ± 3.4	90.1 ± 5.3
ONC	322.8 ± 7.3	320.2 ± 14.7	254.6 ± 7.9	253.8 ± 11.9
RGC / INC	0.132 ± 0.003	0.111 ± 0.005	0.124 ± 0.005	0.094 ± 0.005
RGC / ONC	0.051 ± 0.002	0.044 ± 0.002	0.044 ± 0.002	0.033 ± 0.002

血流遮断4週後, 12週後のコントロール眼, 遮断眼の網膜神経細胞数を, RGC, INC, ONCとして示している. また網膜神経節細胞の変化率を, RGC / INC, RGC / ONCとして示している.
mean ± S. E. M. n=20 for each group.

(Fig. 3) マウス上強膜静脈結紮後の網膜神経節細胞数の変化



血流遮断後における網膜神経節細胞の変化率 (RGC / ONC)

野生型マウス、及び ϵ 1サブユニットノックアウトマウスにおけるRGC / ONCを, 遮断4週後, 12週後にわけ, それぞれコントロール眼をwhite column, 遮断眼をblack columnにて示している. (A) 中心部 (B) 周辺部

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。現在までに用いた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、マウス用Tonolabトノメーターを用いて眼圧測定を行うべく予備実験にてその精度を測定している。

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. 研究発表

未

G. 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coding 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) coding 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。

③ 障害モデルによる検証

網膜神経節細胞障害モデルのひとつである虚血再灌流モデルを作製し、その眼底蛍光をScanning Laser Ophthalmoscope (SLO)を用いて生体下で経時的に撮影し、その眼底蛍光輝度の変化

と網膜神経節細胞死の関係を検討した。

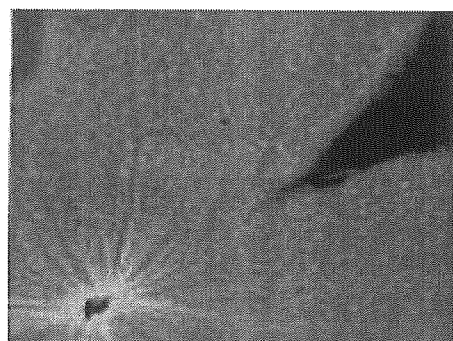
動物実験に際してはAssociation for Research of Vision and Ophthalmology (ARVO)決議を順守し十分な倫理的配慮を加えた。

C. 研究結果

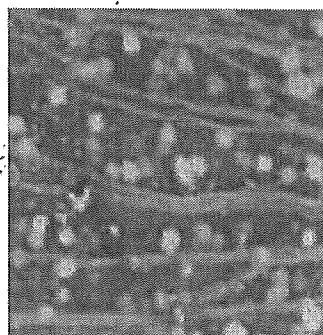
網膜神経節細胞特異的マーカーであるthy1. 2遺伝子を含むプラスミドベクターを作製し、培養細胞にて本ベクターの蛍光発色を確認した。

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。(→Fig. 1)

(Fig. 1) Thy1-EGFPトランスジェニックマウスの網膜伸展標本



4倍

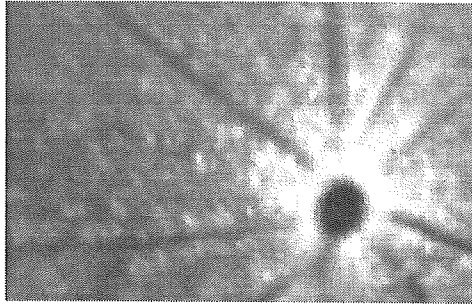


60倍

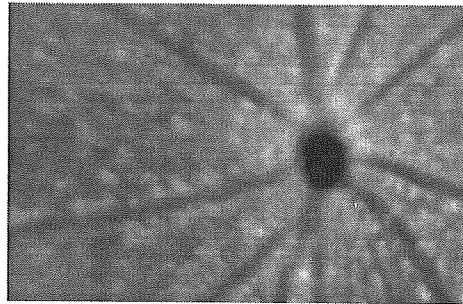
本トランスジェニックマウスに45分間の一過性虚血を負荷した。虚血解除後4日後から著明に眼底蛍光が減少し、7日後ではさらに減少した。14日後は7日後と比較して著変は認められなかった。眼底蛍光を定量的に評価するため、虚血負荷前をコントロールとしてSLO画像の蛍光輝度を計測した。蛍光輝度は虚血解除後4日後で約65%、7日後では約40%と統計学的に有意な減少

を示し、それ以後14日後まで変化はなかった。(→Fig. 2)

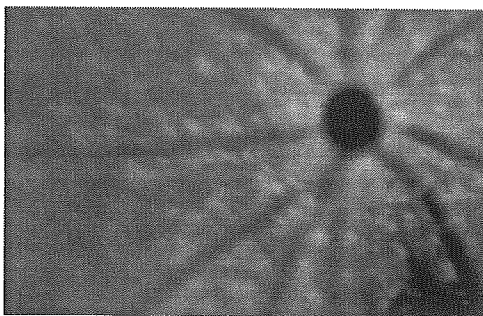
(Fig. 2) Thy1-EGFPトランスジェニックマウスのSLO眼底撮影



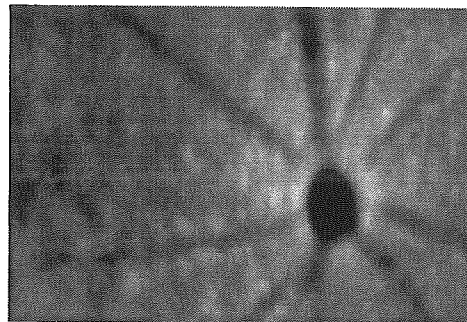
虚血負荷前



虚血負荷後4日



虚血負荷後7日



虚血負荷後14日

また、虚血再灌流モデルにおける網膜神経節細胞の組織学的変化を定量化するため、網膜各層の細胞数を計測し、網膜神経節細胞/外顆粒細胞X100 (GCL/ONL比)を算出し、網膜神経節細胞への障害の指標とした。その結果、GCL/ONL比は、虚血負荷前が 4.85 ± 0.4 であったのに対し、虚血解除後4日で 2.73 ± 0.68 と統計学的に有意な減少を認め($p < 0.05$)、7日後、14日後では 1.05 ± 0.23 、 1.10 ± 0.29 にまで減少した。

この結果をSLO画像の蛍光輝度の減少と比較検討すると、7日以後の減少率に軽度の差が認められるものの、両者の変化には同様の傾向が認められた。

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GF P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。

虚血再灌流モデルは網膜神経節細胞死を誘導するモデルとしてよく用いられる。このモデルは眼内圧を上昇させ、網脈絡膜循環を完全に遮断し網膜全層に虚血を負荷することで網膜からのグルタミン酸の遊離が急上昇し、このグルタミン酸がNMDA受容体を介して網膜内層に分布する神経細胞に遅発性の障害を与えると考えられている。このモデルにおいて、Thy1.2-GFPトランスジェニックマウスの眼底蛍光輝度の減少は、虚血解除後4日で約65%、7日以後で約40%であったのに対し、組織学的な網膜神経節細胞の低下は4日後で約55%、7日以後で約20%であった。両者は同様の減少傾向を示したが、眼底蛍光輝度の減少が組織学的変化と比較して若干少なくなった。この両者の差は、蛍光発色していた網膜神経節細胞が変性し細胞死を起こした後も、そのGF P蛋白の残骸をマイクログリアが貪食するまで蛍光が残存するために生じていると考えられる。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变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。

近年、本法同様に蛍光顕微鏡を用いた生体下での網膜神経節細胞の観察も報告されているが、これらはラットを用いた手技である。ラットと異なり、マウスではトランスジェニックマウスを含め、数多くの遺伝的背景が明確な系統の利用が可能である。今後、各種ノックアウトマウスと本トランスジェニックマウスとの交配により、特定の遺伝子の網膜神経節細胞死への関与の解析が大いに期待できる。

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。

E. 結論

網膜神経節細胞の特異的マーカーであるthyl1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。

本マウスの眼底蛍光はSLOで生体下の経時的観察が可能であり、虚血再灌流モデルにおける眼底の蛍光輝度の減少は、組織切片における網膜神経節細胞数の減少と同様の傾向を示した。

この結果より、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. 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

G. 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

該当なし

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
Inoue Y, Yanagi Y, Tamaki Y, Uchida S, Kawasabe Y, Araie M, Okochi H.	Clonogenic analysis of ciliary epithelial derived retinal progenitor cells in rabbits.	Exp Eye Res	81	7-45	2005
Yanagi Y, Inoue Y, Kawase Y, Uchida S, Tamaki Y, Araie M, Okochi H	Properties of growth and molecular profiles of rat progenitor cells from ciliary epithelium.	Exp Eye Res.	82	471-478	2006
Ota T, Aihara M, Narumiya S, Araie M.	The effects of prostaglandin analogues on IOP in prostanoid FP-receptor-deficient mice.	Invest Ophthalmol Vis Sci	46	4159-63	2005
Jin Y, Uchida S, Yanagi Y, Aihara M, Araie M.	Neurotoxic effects of tetrypan blue on rat retinal ganglion cells	Exp Eye Res.	81	395-400	2005
Ota T, Murata H, Sugimoto E, Aihara M, Araie M	Prostaglandin analogues and mouse intraocular pressure: effects of tafuprost, latanoprost, travoprost, and unoprostone, considering 24-hour variation.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	46	2006-11	2005
Yamada H, Chen YN, Aihara M, Araie M	Neuroprotective effect of calcium channel blocker against retinal ganglion cell damage under hypoxia.	Brain Res.	1071	75-80	2006



Clonogenic analysis of ciliary epithelial derived retinal progenitor cells in rabbits

Yuji Inoue^{a,b}, Yasuo Yanagi^{a,b,*}, Yasuhiro Tamaki^b, Saiko Uchida^b,
Yoko Kawase^a, Makoto Araie^b, Hitoshi Okochi^a

^aDepartment of Regenerative Medicine, Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan

^bDepartment of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

Received 19 November 2004; accepted in revised form 6 March 2005

Available online 24 May 2005

Abstract

In lower vertebrates, multipotential retinal stem cells reside in a far peripheral retinal zone known as the ciliary marginal zone while more fate-restricted progenitor cells are located immediately adjacent to this retinal margin. To determine whether mammalian ciliary epithelium contains heterogeneous stem cell and progenitor cell populations similar to lower vertebrates, we investigated the heterogeneity of the retinal progenitor (or stem) cells isolated from adult rabbit eyes, which are large and suited for precise identification of the region. Under clonogenic culture conditions for a neurosphere assay, spheres were generated from approximately 0.1% of the ciliary epithelial cells and expressed retinal selective markers when plated under conditions producing differentiation. Subsequently, we found that 13.7% of the primary spheres gave rise to a secondary sphere and that 77% of the primary sphere colonies were unipotential progenitors that generated either neurons or glial cells exclusively, while 23% were at least bipotential that could give rise to both cell types using double-labelled immunocytochemistry. Taken together, our results demonstrate that the ciliary epithelium of adult rabbits contains both (at least) bipotential retinal progenitor (or stem) cells and unipotential fate-restricted progenitor cells, similar to lower vertebrates.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: retinal stem cells; heterogeneity; clonogenic neurosphere assay; ciliary epithelium; mammalian

1. Introduction

The mammalian neural retina is composed of seven major cell types, one glial cell type, Müller glia, and six neural cell types, retinal ganglion cells, bipolar cells, horizontal cells, amacrine cells, rod photoreceptor cells, and cone photoreceptor cells. Developmental studies have demonstrated that multipotential retinal progenitor cells, which are the progeny of embryonic forebrain-derived neuroepithelial cells and exist only for a limited period, give rise to all the retinal neurons and glia (Cepko et al., 1996; Harris, 1997). Adult mammalian retina has long been considered to be devoid of retinal stem cells, and no

substantial neural regeneration takes place after damage. However, recent studies *in vitro* have demonstrated the presence of retinal stem cells in adult mice (Tropepe et al., 2000) and of retina progenitor cells in rats (Ahmad et al., 2000) within the pigmented cells of the ciliary body. Although their functions and roles *in vivo* remain unknown, the retinal stem cells or progenitor cells proliferate *in vitro* and differentiate into cells expressing markers of certain mature retinal neurons, such as bipolar cells, photoreceptor cells, or Müller glia, raising the possibility that these cells can be utilized as a potential cell source in transplantation therapy for retinal diseases (Ahmad et al., 2000; Tropepe et al., 2000). Furthermore, a very recent study demonstrated that some cells located in the retinal ciliary marginal zone, a region adjacent to the ciliary body, continue to proliferate with the potential to generate retinal neurons in *ptc*^{+/-} mice (Moshiri and Reh, 2004).

In amphibians and fish, retinal progenitor cells persist into adulthood and give rise to mature retinal cells after retinal damage. In these lower vertebrates, there are at least

* Corresponding author. Dr Yasuo Yanagi, Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan.

E-mail address: yanagi-ty@umin.ac.jp (Y. Yanagi).

two distinct cell populations in the peripheral retina, i.e. retinal stem cells and fate-restricted progenitor cells (Perron and Harris, 2000). Retinal stem cells with the capacity for multipotentiality reside in a far peripheral retinal zone known as the ciliary marginal zone, whereas more fate-restricted progenitor cells reside adjacent to the retinal margin. Thus, the far peripheral retinal region in lower vertebrates is composed of heterogeneous cell groups (Reh and Levine, 1998; Perron and Harris, 2000). However, it is not clear whether the ciliary epithelium of adult mammals similarly contains heterogeneous cell populations with varying degrees of differentiation.

In previous studies, mice and rats eyes were used to isolate adult retinal stem cells (Tropepe et al., 2000) or progenitor cells (Ahmad et al., 2000). The number of retinal stem cells in the ciliary epithelium is very low, namely only ~50 progenitor cells can be isolated per eye in mice (Tropepe et al., 2000). Additionally, these regions are very small in these animals. In this study, we chose rabbits because they have large eyes that allow the isolation of a large number of the cells and the precise identification of the ciliary body, and isolated retinal progenitor cells from ciliary epithelium and investigated their characteristics *in vitro*.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Japanese white rabbits (2–2.4 kg) were obtained from Saitama Experimental Animal Supply Co. Ltd (Saitama, Japan). All the experiments were conducted in accordance with the Guidelines laid down by the NIH in the US regarding the care and use of animals for experimental procedures.

2.2. Cell preparation

The rabbits were killed with an overdose of pentobarbital, and their eyes immediately enucleated and harvested in phosphate-buffered saline (PBS; GIBCO BRL, Rockville, MD). The cells from the iris epithelium, ciliary epithelium from anterior, iris-bound-iridial processes and posterior, blade-like ciliary processes (Troncoso, 1942), peripheral neural retina, and peripheral retinal pigment epithelium (RPE) were prepared as described elsewhere (Ahmad et al., 2000; Jumblatt et al., 1991; Tropepe et al., 2000; Wolosin et al., 1993) with modifications (Fig. 1). Briefly, after a circumferential incision was made 3–4 mm posterior to the corneal limbus, the posterior segment was removed from the anterior segment. The crystalline lens and vitreous gel were also removed from the anterior segment. The epithelial cells from the iris, ciliary epithelium and peripheral RPE were detached from the stroma in Hanks balanced-buffered saline (HBSS; GIBCO BRL) containing 0.25% trypsin (GIBCO BRL, Cat.No.15090-046). Peripheral neural retinal cells detached from the RPE were treated in HBSS containing 0.25% trypsin for 10 min at 37°C. The samples were then treated with DNase (10 U μl^{-1} , TaKaRa, Shiga, Japan) and trypsin neutralizing solution (TNS; Cell Applications, San Diego, CA), and dissociated mechanically with a fire-polished pipette. After centrifugation, the cells were suspended in D-MEM/F-12 (mixture 1:1, GIBCO BRL) and filtered through a 40 μm nylon membrane (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) (Fig. 1).

2.3. Isolation of sphere-forming cells

To examine the localization of sphere-initiating cells, the cells were cultured essentially as described previously (Reynolds et al., 1992). Briefly, they were plated at a density of 10 cells μl^{-1} in non-treated 24-well tissue dishes and cultured in DMEM/F-12 with N2 supplement

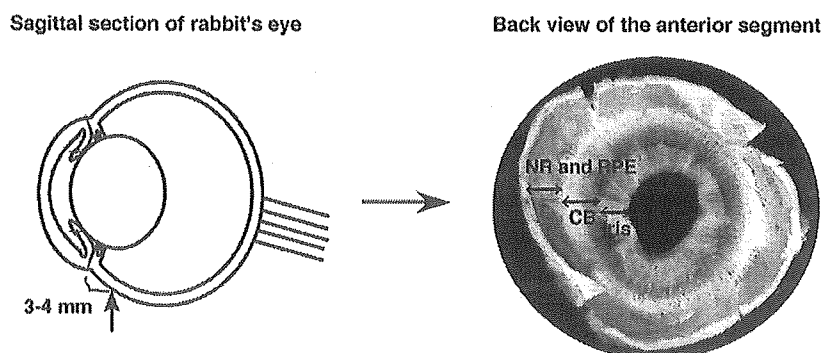


Fig. 1. Cell preparation. After enucleation, a circumferential incision was made 3–4 mm posterior to the corneal limbus, and the posterior segment was removed from the anterior segment. The crystalline lens and vitreous gel were also removed from the anterior segment. The epithelial cells from the iris, ciliary epithelium and peripheral RPE were detached from the stroma in Hanks balanced-buffered saline containing 0.25% trypsin. Peripheral neural retinal cells detached from the RPE were treated in HBSS containing 0.25% trypsin for 10 min at 37°C. The samples were then treated with DNase and trypsin neutralizing solution, and dissociated mechanically with a fire-polished pipette. After centrifugation, the cells were suspended in D-MEM/F-12 and filtered through a 40 μm nylon membrane. CB, ciliary body; NR, neural retina; RPE, retinal pigment epithelium.

(GIBCO BRL) unless otherwise stated. Basic fibroblast growth factor (bFGF; Peprotech EC LTD, London, UK) and epidermal growth factor (EGF; Antigenix America Inc., Huntington St., NY) at final concentrations of 10 and 20 ng ml⁻¹, respectively, were added three times a week.

For clonal analysis, the cells were embedded in a methylcellulose gel matrix (1.2% final concentration; Wako, Osaka, Japan) dissolved in the aforementioned medium to prevent cell-flotation and resultant re-aggregation as described previously (Gritti et al., 1999) at a final density of 10 viable cells μl^{-1} , and cultured as mentioned above. To investigate whether the cells were dissociated into single cells, the cell nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Molecular probes, Portland, OR; 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in PBS; 15 min at 37°C) and the single cells, doublets, and triplets in these cultures were enumerated immediately after plating the cells and after 48 hr ($n=6$). Additionally, to examine the re-aggregation of dissociated cells, cells labelled with carboxyfluorescein diacetate (CFDA; Molecular Probes, Portland, OR) were mixed with unlabelled cells and cultured in 24-well culture dishes, where indicated.

After 10 days *in vitro*, cells formed well-developed floating clusters (spheres), regardless of whether they were cultured in the presence or absence of methylcellulose. To measure the diameters of these spheres, cultures were observed with an inverted microscope (IX70, Olympus, Tokyo, Japan) and images were input into a Macintosh computer with the aid of a charge coupled device camera (DP50, Olympus) and analysed using an NIH imaging program developed at the US National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>. To distinguish growing spheres from dying cell clusters, only the cell clusters with a diameter of more than 50 μm were analysed.

To confirm whether the cells actually divided, a thymidine analogue, bromodeoxyuridine (BrdU; Sigma, St. Louis, MO), was added to the methylcellulose gel matrix 24 hr before fixation and its incorporation was investigated by immunocytochemistry. Immunocytochemistry was also performed to examine the expression of Chx10, a marker of retinal progenitor cells and mature neural markers in the spheres.

2.4. Cell passaging

To investigate whether the cells dissociated from the primary spheres generated in the methylcellulose gel matrix could proliferate to generate secondary sphere colonies, spheres obtained after 10 days in culture were trypsinized, dissociated into single cells, plated in 24-well dishes at a density of 10 cells μl^{-1} , and cultured for a further 10 days in methylcellulose gel matrix to form secondary sphere colonies. These secondary sphere colonies were again dissociated, and the formation of tertiary sphere colonies was investigated following the same procedure. Where indicated, to examine whether all individual sphere colonies

could proliferate to generate secondary sphere colonies, single primary sphere colonies were dissociated into individual cells and the progeny plated into the individual wells of 96-well dishes to investigate the formation of secondary sphere colonies.

Similarly, the cells from the sphere colonies generated in the absence of methylcellulose were passaged to examine the number and diameter of the secondary and tertiary sphere colonies following the protocol mentioned above.

After the second passage, serial passaging of the sphere colonies, which were generated either in the presence or absence of methylcellulose, was performed every 10–14 days until they became senescent.

2.5. Differentiation of sphere-derived cells

The ability of the sphere-derived colonies to differentiate was examined using the primary sphere colonies generated in the methylcellulose gel matrix. To investigate the expression of retinal selective markers, cells dissociated from the spheres were allowed to attach to poly-L-lysine/laminin-coated 24-well dishes for one day in DMEM/F-12 containing 1% fetal bovine serum (FBS). Thereafter, the cells were cultured undisturbed or washed three times with serum-free medium and cultured in DMEM/F12 containing bFGF at a final concentration of 10 ng ml⁻¹ for 14 days, and then subjected to immunocytochemistry with a photoreceptor marker, GRK 1a/b (Zhao et al., 1998), a Müller cell marker, vimentin and a bipolar cell marker, protein kinase C α (PKC α).

To examine the expression of mRNA for retinal cell markers, vimentin, calbindin, and β III tubulin were selected because they are expressed in the neural retina and the cDNA sequences are currently available in rabbits. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis was performed using mRNA from the neural retina, ciliary epithelium, spheres and differentiated progeny.

To examine whether the individual sphere colonies are unipotential or bipotential, single isolated spheres were plated on poly-L-lysine/laminine-coated wells of 24-well culture dishes, induced to differentiate in DMEM/F-12 containing 1% FBS for 14 days, and subjected to double-labelled immunocytochemistry with microtubule-associated protein 2 (MAP2), and the astrocytic marker, glial fibrillary acidic protein (GFAP).

2.6. Immunocytochemistry

Spheres or cells were washed with PBS, and fixed in absolute methanol for 30 min at 4°C and blocked in PBS containing 1% skim milk for 10 min. For anti-bromodeoxyuridine (BrdU) immunocytochemistry, spheres labelled with BrdU were treated with 2 M HCl for 60 min before blocking. The samples were then incubated with the primary antibodies at room temperature for 2 hr, rinsed twice with the blocking buffer, and incubated with the secondary