

# 研究報告書

## 「成体網膜におけるニューロン新生・新規回路形成の可視化と制御」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者： 松田 孝彦

### 1. 研究のねらい

脊椎動物の中でも魚類や両生類は再生能力が高く、網膜が損傷を受けたとしても、成体網膜幹細胞であるミュラーグリア細胞(以下、ミュラー細胞と表記)が活発に分裂・増殖してニューロンを産生し、損傷部位を機能的に自己修復出来る。一方、ヒトを含む哺乳類にはそのような自己修復能力は無いと長年信じられてきたが、近年、マウスなどの哺乳動物の網膜ミュラー細胞にもニューロンを産生するポテンシャルが有ることが判ってきた。この事実は、ヒト網膜疾患に対する新しい治療方法開発の可能性を期待させるものである。しかしながら、哺乳類ミュラー細胞の分裂・増殖能力およびニューロン産生能は極めて低く、結果として自己修復までには至らない。そこで本研究では、哺乳類網膜を再生させる技術の開発を目指し、薬剤投与や遺伝子導入によって成体マウス網膜のミュラー細胞の増殖能を高めることを試みた。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、様々な薬剤の眼球内投与や、遺伝子導入によって成体マウス網膜のミュラー細胞の増殖能を高めることを試みた。このような研究の過程で、マウス網膜が薬剤で損傷を受けると、多くのミュラー細胞は活性化されて遺伝子発現レベルでは『増殖細胞』に似た状態になるものの、実際の分裂・増殖には至らないという興味深い現象を見出した。すなわち、成体マウス網膜においてミュラー細胞は損傷に应答して細胞分裂しようと試みるが、何らかのブレーキ機構が働いているために分裂・増殖には至らないというモデルが考えられた。そこで、この「ブレーキ機構」を解除する方法を検討した結果、薬剤と増殖因子を組み合わせることで、ミュラー細胞の増殖をある程度誘導出来るようになった。さらに、ミュラー細胞の増殖を促進する遺伝子も幾つか同定することが出来た。

また、「網膜ミュラー細胞の増殖を可視化できる遺伝子改変マウス」や「網膜ミュラー細胞特異的に組換え酵素 Cre を発現する遺伝子改変マウス」など、網膜再生に研究に有用なツールを幾つか開発した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「薬剤投与によってミュラー細胞の増殖を誘導する条件の確立」

哺乳類の網膜が損傷を受けると、ごくごく少数のミュラー細胞のみが増殖を開始する。この点が、網膜損傷に応答して多数のミュラー細胞の活発な増殖が誘発される魚類等との大きな違いである。つまり、このようなミュラー細胞の分裂・増殖能の低さが、変性した哺乳類網膜の自己修復を阻む最も大きな要因であると考えられる。そこで本研究では、様々な薬剤を成体マウスの眼球に投与することによってミュラー細胞の分裂・増殖を誘導することを試みた。

このような薬剤スクリーニングの過程で、「薬剤投与によって網膜が損傷を受けると、多くのミュラー細胞は実際に分裂・増殖しないにもかかわらず、PCNAを始めとする増殖細胞特異的マーカーを強く発現する」という現象を見出した(図1)。このことは、マウス網膜が損傷すると、多くのミュラー細胞は活性化されて遺伝子発現レベルでは『増殖細胞』に似た状態になるものの、実際の分裂・増殖には至らないことを示唆している。すなわち、マウス網膜が損傷を受けると、ミュラー細胞は細胞分裂しようと試みるが、何らかのブレーキ機構が働いているために分裂・増殖には至らないと考えられた。

この「ブレーキ機構」を効率よく解除出来れば、ミュラー細胞の増殖を誘発出来るのではないかと予想される。そこで、薬剤と増殖因子を組み合わせる用いたところ、細胞増殖をある程度誘導出来ることが判ってきた。現在のところ、網膜の全ミュラー細胞の10%程度を網膜内で分裂・増殖させることに成功している。FACSを用いて分裂・増殖しているミュラー細胞画分を分離する条件も確立しており、今後、遺伝子発現プロファイリング等によって網膜内で増殖するミュラー細胞の詳細な性状解析を行う計画である。

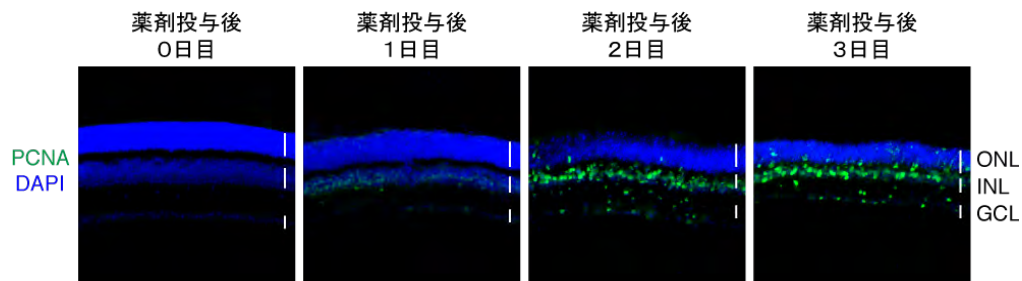


図1 薬剤で変性を誘発した網膜では、ほぼ全てのミュラー細胞がPCNA陽性になる成体マウスの眼球に薬剤を投与して網膜変性を誘発すると、ほとんどのミュラー細胞で増殖細胞特異的なマーカーの発現が観察された。しかしながら、実際に分裂増殖した細胞はごく一部のみであった。

ONL : outer nuclear layer, INL : inner nuclear layer, GCL : ganglion cell layer

### 研究テーマ B「ミュラー細胞の増殖の可視化」

蛍光蛋白質を用いたミュラー細胞の増殖の可視化を試みた。この目的のためにまず、増殖細胞特異的に活性化されるプロモーターに蛍光蛋白質遺伝子を繋いだDNAコンストラクトや、増殖細胞でのみ機能する蛍光プローブを発現するDNAコンストラクトをいくつか作製した。これらを *in vivo* エレクトロポレーション法を用いて発生期のマウス網膜に導入し、機能評価を行った。その結果、細胞周期のG2/M期で特異的に活性化されるサイクリンB1(Ccnb1)プロモーター::GFPが最も忠実に、増殖状態にある網膜前駆細胞を標識した。この予備的知見に基づき、Ccnb1::GFPコンストラクトを用いてトランスジェニック(Tg)マウスを樹立した。期待通り、こ

の Tg マウスの網膜では、GFP の発現は発生期の網膜前駆細胞において観察され、発生の完了に伴って完全に消失した(図2A-D)。

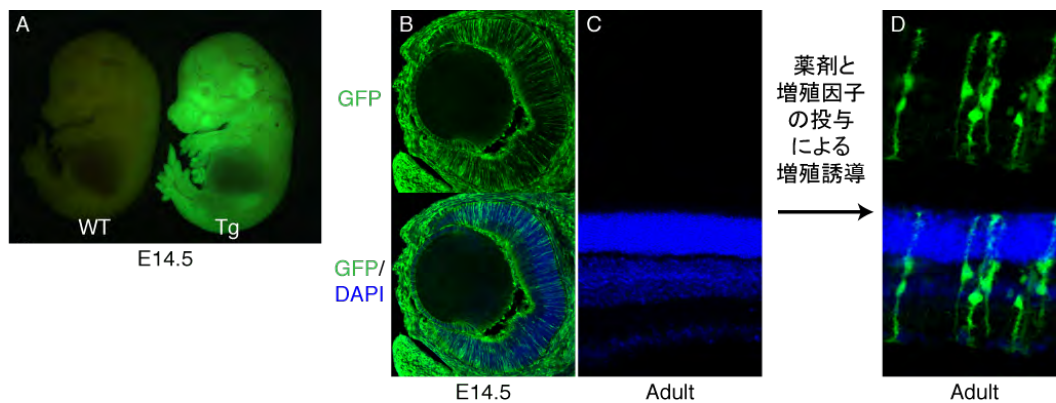


図3 Ccnb1プロモーターを用いたミュラー細胞の増殖の可視化

(A) 胎生14.5日目のCcnb1::GFP Tgマウス。GFPの発現は全身で観察される。

(B, C) Tgマウスの胎生14.5日目と成体網膜におけるGFPの発現。GFPの発現は発生期の網膜前駆細胞で観察されるが、発生期を過ぎると完全に消失する。

(D) 成体Tgマウスの眼球に薬剤投与して細胞増殖を誘導すると、一部のミュラー細胞がGFP陽性になった。

次に、成体 Tg マウスの眼球に薬剤と増殖因子を投与してミュラー細胞の増殖を誘導した。その結果、一部のミュラー細胞の集団を GFP で標識することに成功した(図2D)。今後、この系を活用して、増殖に伴うミュラー細胞の形態変化をライブイメージング等の手法で明らかにしていく予定である。

また、この Tg マウスを用いた解析から、網膜が損傷を受けた際には、ミュラー細胞に加えて、形態学的にミクログリアや血管内皮細胞と考えられる細胞も GFP で標識されることが判ってきた。これらの細胞はそれぞれ、死んだニューロンの除去や網膜損傷に伴う血管のリモデリングに関与していると推測される。これまでの網膜再生研究では、成体幹細胞であるミュラー細胞の増殖のみが注目され、その他の細胞種の役割は見過ごされてきた。内在性の幹細胞活性化によって損傷網膜の自己修復を実現させるためには、ミクログリアや血管細胞等の働きにも着目する必要があるのかもしれない。

#### 研究テーマ C「ミュラー細胞の増殖を誘導する遺伝子のスクリーニング」

ミュラー細胞の分裂・増殖能を遺伝子操作によって高めることを目的とし、増殖因子受容体、シグナル伝達分子、転写因子、細胞周期制御因子、リプログラミング因子等をコードする約 150 種類の発現ベクターを構築した。このユニークなベクターセットには、EGF 系、FGF 系、Notch 系、Wnt 系、Shh 系、CNTF 系、G 蛋白質系、MAP キナーゼ系、TGFβ 系、BMP 系、PI3 キナーゼ/Akt 系を始めとする多種多様なシグナル伝達系を活性化あるいは阻害する発現ベクターが含まれる。これら約 150 種類の発現ベクターの全てを1種類ずつ、成体マウス網膜のミュラー細胞に選択的に *in vivo* で、あるいは網膜組織培養系に *ex vivo* で導入し、その効果を評価した。また、これと並行して、これら発現ベクターを生後1日目のマウス網膜に *in vivo* で導入し、網膜発生に及ぼす影響も調べた。

このようなスクリーニングの結果、5 つの因子にミュラー細胞の増殖を誘導、促進する活性

があることが明らかになった。また、発生期のマウス網膜を用いたスクリーニングにより、網膜細胞の発生や配置等に影響を及ぼす因子が多数同定された。特に、ミューラー細胞の産生を誘導する因子としては、既に知られている Notch-Hes 関連遺伝子以外に、新たに6遺伝子を同定することが出来た。

#### 研究テーマ D「ミューラー細胞の機能を制御するトランスジェニックマウスの作製」

ミューラー細胞の機能を個体レベルで制御することを目的とし、ミューラー細胞特異的プロモーターに組換え酵素 CreER 融合蛋白質を繋いだ Tg マウスを樹立した。今後、この Tg マウスを用いて、網膜再生に重要と考えられる候補遺伝子をミューラー細胞特異的に欠損あるいは過剰発現させ、その機能を解析する計画である。また、ミューラー細胞の動態解析や運命追跡にも活用していきたい。

### 3. 今後の展開

これまで、ミューラー細胞を成体マウス網膜内で効率良く増殖させることは困難であったが、本研究により、ミューラー細胞の分裂・増殖をある程度誘導出来るようになってきた。しかし、本研究の最終目標である「哺乳類の損傷網膜の自己修復」を実現させるためには、更に効率の良いミューラー細胞の増殖誘導法の開発が必要と考えられる。また、増殖を誘導したミューラー細胞から目的のニューロンを効率よく産生させる技術開発も必要であろう。本研究では網膜再生研究に有用な幾つかのツールを開発することが出来た。今後、これらを活用して網膜再生の実現に向けた研究を推進していきたいと考えている。

### 4. 自己評価

私は「さきがけ」で研究課題を採択して頂くまでは、米国でマウス網膜の発生を研究していました。「さきがけ」研究を開始するにあたり、研究実施場所を日本に移し、また、研究対象も発生期の網膜から成体網膜に変え、色々な意味で全くのゼロからの出発でした。何かと思い通りにならないことも多く、この3年間、必ずしも当初の研究計画通りに進んだとは言いがたいのですが、成体マウスの網膜内でミューラーグリア細胞の増殖を(ある程度)人為的に誘導出来るようになったので、最低限の目標は達成出来たのではないかと考えています。この点(細胞増殖の制御)がクリア出来たので、今後の様々な方向への研究の展開が可能になってきたと考えます。

残念ながら、「さきがけ」で支援して頂いたこの3年の期間内に研究成果を論文として発表するまでには至らなかったのですが、今後、1、2年以内に「さきがけ」の研究成果を論文にまとめて公表していきたいと考えています。また、「網膜ミューラー細胞の増殖を可視化できる Tg マウス」や「網膜ミューラー細胞特異的に組換え酵素 Cre を発現する Tg マウス」など、幾つかのツールを開発することが出来ました。今後、これらを最大限に活用し、哺乳類網膜の再生研究を押し進めていきたいと考えています。

### 5. 研究総括の見解

哺乳類の網膜は再生能力・修復能力がないと考えられてきたが、本研究では薬物投与や遺伝子導入によって成体網膜のミューラー細胞に増殖能を賦活させ、網膜再生技術に突破口



を拓こうとするものである。まず薬物による損傷網膜のミュラー細胞では分裂には至らずとも PCNA などの増殖細胞特異的マーカーが発現することを見出し、薬物と増殖因子により網膜内でのミュラー細胞の限定的な増殖に成功した。さらにこのような変化を蛍光リポーターを利用して効率よく検出し解析するためのトランスジェニック系統を作出して検証し、他方で導入する遺伝子のライブラリー(150 ベクター)を構築して、in vivo スクリーニングによりそのなかの5つの因子にミュラー細胞増殖誘導促進活性を見出し、またミュラー細胞産生誘導因子を多数発見した。さきがけ研究開始時に着手したテーマでもあり、これまでマウス作出・ライブラリー構築やスクリーニングに膨大な労力を投入してきた。その努力と周到な準備によって非常に興味深い局面が開けたことが高く評価される。高い目標を設定したため、論文発表までにはまだ時間を要すると思われるが、今後の研究の進展により網膜の再生医療技術という目標達成は実現可能であると思われる。

## 6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 松田孝彦, 「網膜への遺伝子導入」, 実験医学別冊 遺伝子導入プロトコール (羊土社), 2012, 121-130.