



TITLE:

Potential for neural regeneration following neurotoxic injury in the adult mammalian retina(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Ooto, Sotaro

CITATION:

Ooto, Sotaro. Potential for neural regeneration following neurotoxic injury in the adult mammalian retina. 京都大学, 2005, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2005-03-23

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/144748>

RIGHT:

氏名	おお おと そう た ろ う 大 音 壮 太 郎
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2847 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Potential for neural regeneration following neurotoxic injury in the adult mammalian retina (哺乳類成体の網膜で神経毒性障害後における神経再生の可能性)
論文調査委員	(主 査) 教 授 河 野 憲 二 教 授 前 川 平 教 授 中 辻 憲 夫

論 文 内 容 の 要 旨

A. 研究目的

一般に哺乳類の網膜においては、神経再生は起こらないとされてきた。しかし近年、成体哺乳類の毛様体辺縁部に網膜神経幹細胞が存在することがわかり、成体網膜における神経再生の可能性が示された。また、生後7日めのニワトリを用いた実験で、網膜障害に反応してミューラー細胞が前駆細胞様の働きを持ち、一部は神経細胞に分化したとの報告がみられた。今回我々は、神経障害モデルを用いて、成体ラット網膜に再生する能力がないかを検討した。

B. 研究方法

N-methyl-D-aspartate (NMDA) を6週齢のラットの硝子体中に投与し、網膜に急性の障害を起こした。網膜障害後 bromo-deoxyuridine (BrdU) を硝子体中及び腹腔内に投与し、免疫組織化学により細胞の分裂を調べた。また、外的因子としてレチノイン酸を硝子体中に投与し、分裂細胞に及ぼす影響を調べた。更に網膜器官培養の系で、内的因子としてレトロウイルスベクターを用いて bHLH 型及びホメオボックス型の転写因子を分裂細胞に強制発現させ細胞の運命決定に与える影響について検討した。

C. 研究結果

NMDA 投与後2日目に BrdU を投与したものにおいて、網膜切片中に BrdU 陽性の分裂細胞が認められた。以後の実験は全て、NMDA 投与後2日目に BrdU を投与し、固定の時期をずらすことにより分裂細胞の状態を経時的にフォローした。障害後2日目では分裂細胞は内顆粒層に見られたが、時間経過とともに一部は外顆粒層へと遊走した。

分裂している細胞を同定するため免疫組織化学を行ったところ、障害後2日目の細胞は全て Glutamine Synthetase (GS) 陽性のミューラー細胞であることがわかった。ところが障害後3日目において GS を発現しない分裂細胞が見られ、時間経過とともにその割合は上昇し、分裂したミューラー細胞が他の細胞に分化転換していることが示唆された。

障害後14日、28日において、一部の BrdU 陽性の分裂細胞の中には PKC, NSE (bipolar cell のマーカー) や Rhodopsin, Recoverin (視細胞のマーカー) といった神経網膜のマーカーを発現する細胞が認められた。

しかしこうした神経細胞に分化したと思われる細胞は非常に少なく、その効率をあげるべく網膜の神経細胞の運命決定に関わっている外的因子や内的因子を用いて、分裂細胞の運命をコントロールできないかを調べた。外的因子としてのレチノイン酸を投与した群では分裂細胞が PKC を発現する割合が有意に増加し、ミューラー細胞から双極細胞への分化が促進されることが示唆された。内的因子としては NeuroD および Math3 を強制発現させた分裂細胞の一部がアマクリン細胞のマーカー HPC-1 を発現し、Pax6 と同時に発現させることによりアマクリン細胞への分化が促進された。また、Math3 と Pax6 を同時に発現させると水平細胞のマーカー calbindin を発現するものがみられ、ミューラー細胞から水平細胞への分化が示唆された。更に、NeuroD と Crx を同時に発現させると、視細胞のマーカー RETP-1 の発現が促進し、視細胞への分化が促進されることが示唆された。

D. 結論

成体哺乳類の網膜において、急性障害後網膜神経細胞の再生が起こることが示された。更に、外的・内的因子によって再生された神経細胞の運命をある程度コントロールすることが可能である。成体哺乳類でミューラー細胞は内在性幹細胞として働く可能性をもっており、網膜変性疾患での薬剤治療、遺伝子治療への応用が期待される。

論文審査の結果の要旨

目的：今回申請者は、神経障害モデルを用いて、成体ラット網膜に再生する能力があることを発見したので報告する。

方法：NMDAを6週齢のラットの硝子体中に投与し、網膜に急性の障害を起こした。網膜障害後BrdUを硝子体中及び腹腔内に投与し、免疫組織化学により細胞の分裂を調べた。また、外的因子としてレチノイン酸を硝子体中に投与し、分裂細胞に及ぼす影響を調べた。更に内的因子としてレトロウイルスベクターを用いてbHLH型及びホメオボックス型の転写因子を分裂細胞に強制発現させ細胞の運命決定に与える影響について検討した。

結果：網膜障害後2日目に内顆粒層に分裂細胞がみられ、免疫染色よりこれらは全てミューラー細胞と思われた。分裂細胞は神経前駆細胞のマーカーを発現し、時間経過とともに一部は外顆粒層に遊走した。網膜障害後4週間において、分裂細胞の一部は双極細胞及び視細胞に特異的なマーカーを発現した。また、分裂細胞にPax6とNeuroD、Pax6とMath3を同時に強制発現させるとアマクリン細胞への分化が促進し、CrxとNeuroDを強制発現させると視細胞への分化が促進された。

考察：成体哺乳類の網膜において、急性障害後神経再生が起こることが示された。更に、内的因子によって再生された神経細胞の運命をある程度コントロールすることが可能である。

以上の研究は網膜内在性幹細胞の解明に貢献し今後の網膜の再生医療に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成17年2月9日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。