

平成 17 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

哺乳類成体網膜における神経再生の可能性

大音壮太郎

京都大学大学院医学研究科眼科学教室

要 約

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あることを観察したので報告する。

方法：N-methyl-D-aspartate (NMDA) を 6~7 週齢の SD 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) を硝子体中および腹腔内に投与し、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。さらに、内的因子としてレトロウィルスベクターを用いて basic helix-loop-helix (bHLH) 型およ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、これらは全て Müller 細胞と思われた。分裂細胞は神経幹細胞様の性質を獲得し、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および視細胞に特異的なマーカーを発現し、Müller 細胞から神経細胞への分化が示唆された。レチノイン酸を投与した群では、有意に双極細胞への分化が促進した。また、レトロウィルスベクターを用いて分裂細胞に *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。

結論：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。さらに、外的・内的因子によって再生される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。(日眼会誌 110 : 864-871, 2006)

キーワード：再生, 幹細胞, Müller 細胞, bHLH 型転写因子, ホメオボックス型転写因子

A Review

Potential for Neural Regeneration in the Adult Mammalian Retina

Sotaro Ooto

Departments of Ophthalmology and Visual Sciences, Graduate School of Medicine, Kyoto University

Abstract

Purpose : It has long been believed that the retina of mature mammals is incapable of regeneration. However, here we show that Müller glia of adult mammals could be progenitor cells, and generate new retinal neurons.

Methods : N-methyl-D-aspartate (NMDA) was injected into the vitreous chamber of adult rat (post-natal 6-7 weeks) eyes to induce neurotoxic injury. We injected bromo-deoxyuridine (BrdU) into the vitreous chamber and intraperitoneal space, and performed immunohistochemistry staining for

BrdU and cell specific markers. To test whether exogenous growth factors stimulate proliferating cells, we injected retinoic acid into the vitreous chamber after NMDA treatment. We next misexpressed basic helix-loop-helix (*bHLH*) and homeobox genes in NMDA-treated retinas using a retroviral expression system.

Results : Müller glia of adult mammalian retinas proliferated in response to acute damage two days after NMDA treatment. These cells acquired a progenitor-like phenotype, and some of them mi-

別刷請求先：606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54 京都大学大学院医学研究科眼科学教室 大音壮太郎

(平成 18 年 4 月 10 日受付, 平成 18 年 7 月 7 日改訂受理) E-mail: ohoto@kuhp.kyoto-u.ac.jp

Reprint requests to: Sotaro Ooto, M.D., Ph.D. Departments of Ophthalmology and Visual Sciences, Graduate School of Medicine, Kyoto University, 54 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

(Received April 10, 2006 and accepted in revised form July 7, 2006)

grated to the outer nuclear layer (ONL). A few of these cells expressed bipolar specific or rod photoreceptor specific markers. Retinoic acid treatment increased bipolar cell genesis. Misexpression of *Math3* or *NeuroD* along with *Pax6* promoted differentiation to amacrine cells. Co-expression of *Crx* and *NeuroD* promoted rod genesis.

Conclusions : These findings demonstrated that retinal neurons regenerated even in adult mam-

malian retinas after toxic injury. We could partially control the fate of the regenerated neurons with extrinsic factors or intrinsic genes.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 110 : 864–871, 2006)

Key words : Regeneration, Stem cell, Müller glia, *bHLH* gene, Homeobox gene

I はじめに

網膜を含めた中枢神経系は一度障害されるとその神経細胞は再生されず、失われた機能を取り戻すことができないと考えられてきた。しかし近年、神経幹細胞が胎生期ばかりでなく、ヒトを含む成体哺乳類動物の脳にも存在することが明らかになるにつれ¹⁾、中枢神経系においても幹細胞システムを駆使して組織学的に再生させようという試みがなされ始めた。

網膜再生の分野については、すでにアメリカを中心に胎児網膜を用いて網膜色素変性や加齢黄斑変性の患者に対して移植が数十例行われており、結果が報告されつつある²⁾。しかしながら、胎児網膜を用いることには倫理的問題があり、また、供給に限りがあるため均一な移植細胞を十分得ることは難しく一般的な治療とはなり得ない。そこで幹細胞が今後の細胞移植源として期待されている。本稿では、各種幹細胞から視細胞分化に関する最新の知見を紹介し、さらに、内在性網膜神経幹細胞賦活化による神経再生の可能性について述べる。

II 網膜の構造と神経発生

神経網膜は主に 6 種類の神経細胞と 1 種類のグリア細胞から構成され、その位置・形態および特異的マーカーにより同定することができる。網膜は層構造を形成し、外顆粒層 outer nuclear layer (ONL) には視細胞、内顆粒層 inner nuclear layer (INL) にはアマクリン細胞・双極細胞・水平細胞・Müller 細胞が存在し、神経節細胞層 ganglion cell layer (GCL) には神経節細胞およびアマクリン細胞が存在する (図 1)。また、発生の時期により生まれる細胞の種類は限られていて、マウスにおいては初期には神経節細胞・アマクリン細胞・水平細胞・錐体細胞が、後期には杆体細胞・双極細胞・Müller 細胞が生成される。そしてこれらのニューロンとグリアは共通の前駆細胞から発生することが知られている³⁾。近年、網膜の細胞運命決定機構に関する多くの研究がなされており、細胞外からの外的因子と細胞内の転写因子の発現が細胞運命決定に重要な役割を果たしていることがわかっている⁴⁾⁵⁾。

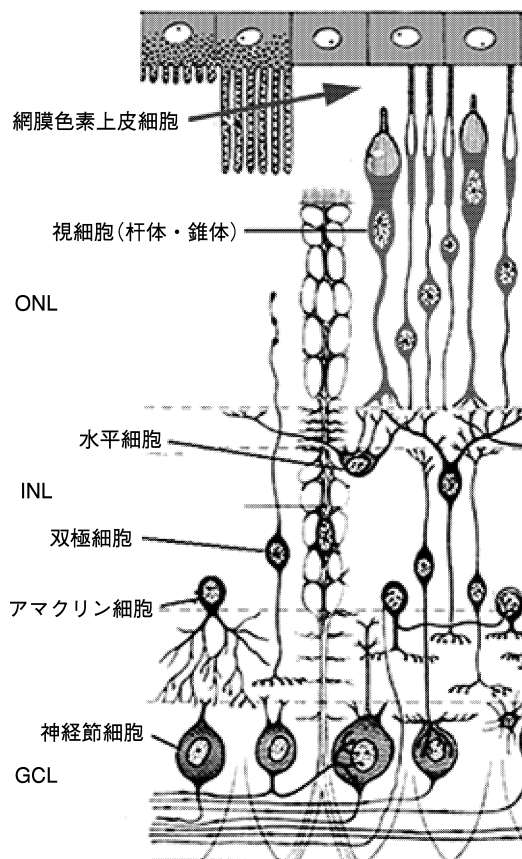


図 1 網膜の層構造。

外顆粒層 outer nuclear layer (ONL) には視細胞、内顆粒層 inner nuclear layer (INL) にはアマクリン・双極細胞・水平細胞・Müller 細胞が存在し、神経節細胞層 ganglion cell layer (GCL) には神経節細胞およびアマクリン細胞が存在する。

III 各種幹細胞の視細胞分化への試み

2000 年に van der Tropepe ら⁶⁾のグループは、成体マウスの毛様体上皮細胞に neurosphere を形成する網膜幹細胞が存在することを報告した。ただ毛様体細胞のうち幹細胞の性質を持つ細胞の割合は非常に低く、移植に十分な細胞を得ることは難しい。さらに、毛様体は眼球内で水晶体の後方にあり、患者からの採取には危険を伴い、日本ではアイバンクの眼球は強角膜以外を使用することは法律で禁じられている。

一方, Haruta ら⁷⁾のグループは, 成体ラットの虹彩細胞に注目し, 虹彩培養細胞に視細胞の分化に重要な役割を果たすホメオボックス型の転写因子である *Crx* をレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入したところ, 効果的にロドプシン陽性細胞を得ることができた。加えて, 霊長類であるサルの虹彩組織からもロドプシン陽性細胞が得られることを見出した⁸⁾。ラットではレトロウイルスベクターで *Crx* 遺伝子を導入するだけで視細胞に分化誘導できたのに対して, サルでは *Crx* 単独の導入では視細胞に分化しなかった。網膜, 視細胞の発生・分化には, ホメオボックス遺伝子と basic helix-loop-helix (bHLH) 遺伝子の組み合わせとタイミングが重要であることが報告されている⁹⁾¹⁰⁾ことから, *Crx* と同時に bHLH 遺伝子 *NeuroD* を遺伝子導入したところ, ロドプシンを発現する細胞へと分化した。

胚性幹細胞 (ES 細胞) についてはマウス骨髄由来細胞をフィーダー細胞として, マウス ES 細胞からレンズ, 網膜色素上皮, 網膜神経細胞への誘導に成功し¹¹⁾, さらに, 最近では Ikeda ら¹²⁾によりフィーダー細胞に頼らない視細胞誘導方法も報告されている。また, Kawasaki ら¹³⁾著者ら¹⁴⁾はサル ES 細胞を用いての網膜色素上皮細胞やレンズ細胞の誘導を報告し, さらに, 網膜色素上皮細胞に関しては移植後 *in vivo* で機能することを確認した¹⁵⁾。しかし, ES 細胞に関しては拒絶反応や腫瘍形成, 視細胞の純化, さらに倫理的な問題など超えなければならない壁はまだ多い。

IV 内在性神経幹細胞の賦活化

中枢神経機能再生の方法には細胞移植の他にもう一つアプローチとして, 中枢神経に内在している神経幹細胞を賦活して中枢神経の再生を促す方法がある。ラットやマウスでは海馬, 脳室下帯をはじめとして神経幹細胞が広く分布していると思われる報告がある¹⁶⁾。ヒトにおいても成体の脳内で神経再生が起こっていることが確認されている¹⁷⁾。

下等動物では様々な組織幹細胞が網膜を再生することがわかっている。魚類や両生類では, ciliary marginal zone (CMZ) と呼ばれる毛様体辺縁部に網膜幹細胞が存在し, 体の成長にあわせて網膜も成長させている。哺乳類でも毛様体辺縁部から網膜幹細胞の性質を持った細胞が neurosphere 法により培養可能であるが⁹⁾, 実際に生体内でこれらの細胞が網膜再生に関与しているかは不明である。イモリなどの両生類では網膜色素上皮細胞が分化転換によって網膜を再生させる。魚類では網膜外層に視細胞杆体前駆細胞の存在が知られている。そして近年, ニワトリを用いた実験で Müller 細胞が内在性網膜幹細胞としての性質を持つことが報告された¹⁸⁾。

2001 年 Fischer ら¹⁸⁾のグループは, ニワトリ網膜に急性障害を与えると, 網膜内の Müller 細胞が分裂をは

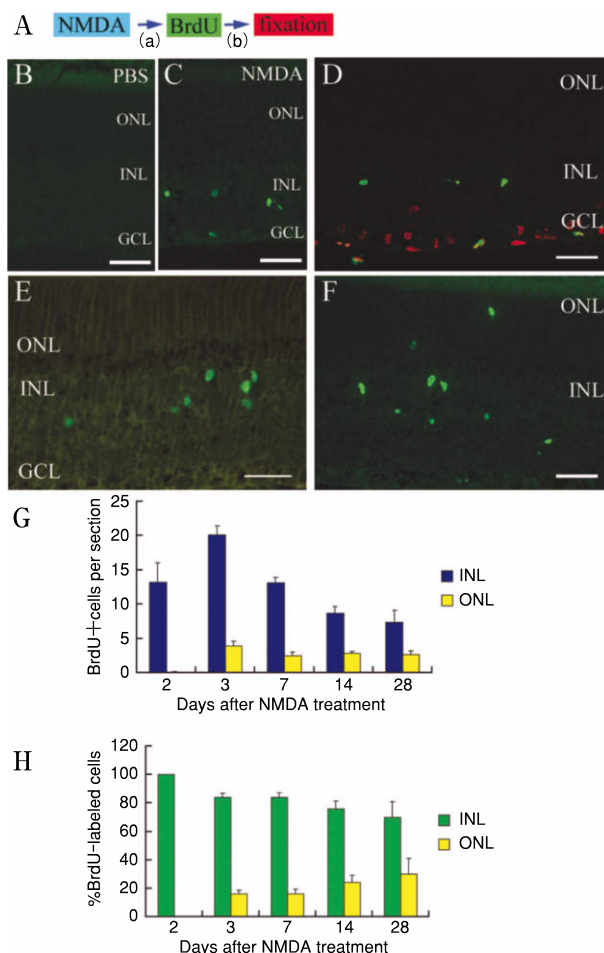


図 2 NMDA 障害後 2 日で BrdU 陽性の分裂細胞が出現する。

A: 実験プロトコール。

B: 対照 (PBS 注入後 BrdU 投与) では bromo-deoxyuridine (BrdU) 陽性細胞みられず。

PBS: phosphate buffered saline

C: N-methyl-D-aspartate (NMDA) 投与後 2 日 (a=2 days, b=0 day) で INL に BrdU 陽性細胞 (緑) 出現。

D: GCL の BrdU 陽性細胞 (緑) は TUNEL (赤) 陽性だが, INL の BrdU 陽性細胞は TUNEL 陰性。

E: INL に Ki-67 (緑) 陽性細胞認める。

F: NMDA 投与後 3 日 (a=2 days, b=1 day) で ONL にも BrdU 陽性細胞 (緑) 認める。

G: INL, ONL における BrdU 陽性細胞数。

H: BrdU 陽性細胞の割合。

バーは 50 μm (文献 19 より転載, 一部改変)

じめ網膜神経幹細胞特異的な遺伝子を発現し, 一部は神経特異的なマーカーを発現したと報告した。つまり, 網膜中の Müller グリア細胞が網膜幹細胞としての性質をもつわけである。そこで今回我々は, 網膜の内在性神経幹細胞は成体の哺乳類でも存在するのか, また, 網膜の神経幹細胞が成体でも存在しているならば, 何らかの因子を投与し, 幹細胞を活性化させ, 神経を再生できないかということを検討した¹⁹⁾。

V 成体ラット網膜における神経障害後の神経再生

実験動物は 6~7 週齢の成体 Sprague-Dawley (SD) ラットを使用した。N-methyl-D-aspartate (NMDA) を 200 nmol 硝子体中に注入し、網膜に急性の障害を起こした。その数日後、分裂細胞をラベルするために bromo-deoxyuridine (BrdU) を硝子体中および腹腔内に注入し、同日灌流固定し眼球摘出、凍結標本作製した(図 2 A)。NMDA が神経毒性を起こす機序としては、NMDA レセプターにグルタミン酸が結合すると細胞内にカルシウムが流入し、カルモジュリンと結合し NO を産生することにより細胞死を惹き起こすことである。NMDA を硝子体中に投与すると網膜内層に特異的に障害を惹き起こし、GCL の細胞数減少、inner plexiform layer (IPL) の厚さが減少(神経節細胞、アマクリン細胞に作用)することが知られている²⁰⁾。

Phosphate buffered saline (PBS), BrdU を硝子体中に注入した対照においては BrdU 陽性細胞は認められなかった(図 2 B)。NMDA による障害後 1.5, 3, 4 日目に BrdU を注入した群においても対照と差がみられなかった。しかし、NMDA 障害後 2 日後に BrdU を注入した群においては主に網膜中央部の INL に BrdU 陽性細胞がみられた(図 2 C)。一部は GCL, IPL にもみられた。

分裂細胞以外にもアポトーシスの過程にある細胞も BrdU でラベルされることが知られている。そこでアポトーシスを起こしている細胞を検出するために TUNEL 染色を行ったところ、GCL の BrdU 陽性細胞は TUNEL 陽性であり、アポトーシスの過程で BrdU を取り込んだ細胞であることが判明し、これらは 1 週間ではほぼ消失した(図 2 D)。一方、INL の BrdU 陽性細胞は TUNEL 陰性であり、また他の分裂細胞のマーカである Ki 67 も陽性であった(図 2 E)。以上から、NMDA 障害後 2 日目に出現した INL の BrdU 陽性細胞は分裂細胞であることが確認された。

次に、NMDA 障害後 2 日目に BrdU を投与して分裂細胞を標識し、その後の固定の時期をずらすことにより BrdU 陽性の分裂細胞の運命を観察した。NMDA 障害後 3 日目に分裂細胞の一部は ONL にも認められ、徐々に ONL に存在する BrdU 陽性細胞の割合は上昇した(図 2 F)。図 2 G が INL と ONL にみられる BrdU 陽性細胞数を計数したもので、図 2 H はそれを割合にして表示したものである。2 日目から 3 日目にかけて分裂細胞は約 2 倍に増加し、その後おそらくは細胞死のために徐々に減少していく。このことは分裂が 1 度だけ行われたことを示唆する。また、経時的に ONL にみられる BrdU 陽性細胞の割合が上昇することから、分裂した細胞が INL から ONL に遊走したことも示唆される。

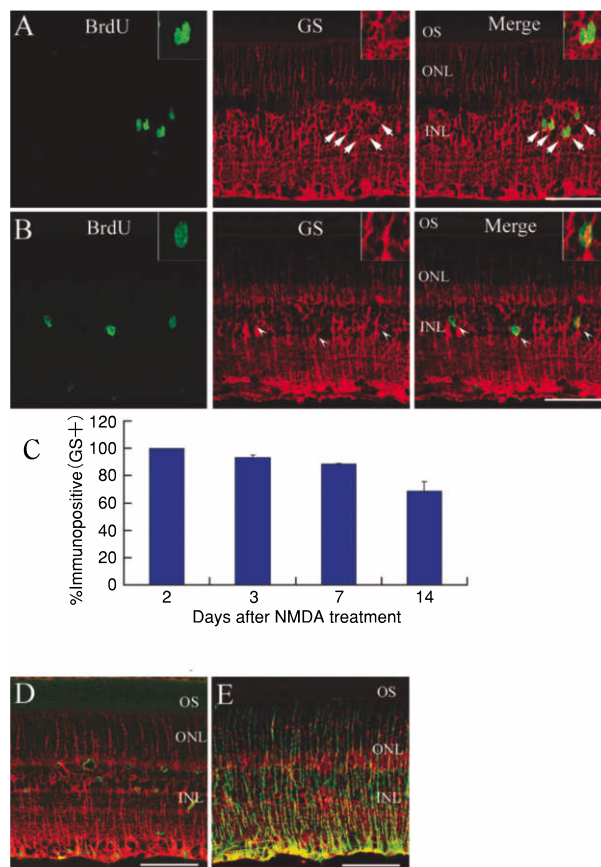


図 3 分裂細胞は Müller 細胞である。

- A : NMDA 障害後 2 日では INL の BrdU 陽性細胞(緑)はすべて Müller 細胞のマーカー Glutamine Synthetase (GS) (赤)を発現(矢印)。
 B : NMDA 障害後 3 日で GS (赤)を発現しない BrdU 陽性細胞(緑)が出現する(矢頭)。
 C : GS を発現する BrdU 陽性細胞の割合。
 D, E : PBS を注入した対照 (D) では前駆細胞のマーカー nestin (赤)を発現しないが、NMDA で障害を与えたもの (E) では nestin を発現し、GS (赤) と二重染色される細胞が多数認められた。
 バーは 100 μ m (文献 19 より転載、一部改変)

次に、BrdU 陽性分裂細胞の細胞種を同定するため、細胞特異的のマーカで調べたところ、NMDA 障害後 2 日目 INL の全ての BrdU 陽性細胞が Müller 細胞のマーカである Glutamine Synthetase (GS) を発現し、分裂細胞は Müller 細胞であることがわかった(図 3 A)。しかし、NMDA 障害後 3 日目には GS を発現しない BrdU 陽性の分裂細胞が認められるようになり(図 3 B)、経時的に GS を発現する分裂細胞の割合は減少していった(図 3 C)。これは分裂後の細胞が Müller 細胞から他の細胞へと性質を変化させたことを示唆している。

次に、神経前駆細胞のマーカ nestin で調べたところ、PBS と BrdU のみを硝子体注入した対照ではほとんど nestin 陽性細胞がみられなかったが(図 3 D)、NMDA 障害モデルでは多数の nestin 陽性細胞がみうけ

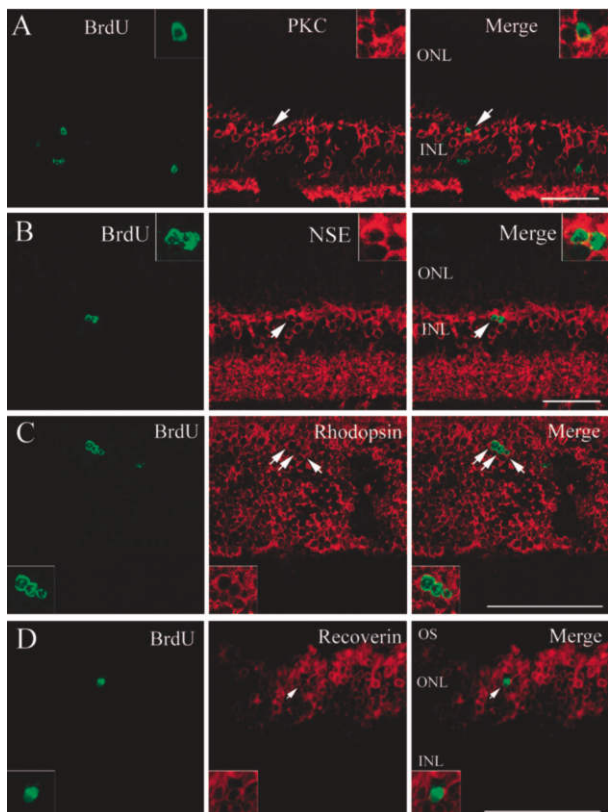


図 4 分裂細胞の一部は神経細胞のマーカーを発現。NMDA 障害後 2 週間で、BrdU 陽性の分裂細胞(緑)の一部は双極細胞のマーカー protein kinase C(PKC) (A, 赤), neuron-specific enolase(NSE) (B, 赤), 視細胞のマーカー-rhodopsin(C, 赤), recoverin(D, 赤)を発現した。バーは 100 μm (文献 19 より転載, 一部改変)

られ, また, Müller 細胞のマーカー-GS と二重染色されるものが多数認められた(図 3 E)。以上から NMDA 障害後, 網膜では Müller 細胞は活性化され, 幹細胞様の性質を獲得したことがわかる。

そして, NMDA 障害後 2 週間で一部の BrdU 陽性細胞が双極細胞のマーカー-protein kinase C(PKC), neuron-specific enolase(NSE)を発現するものや(図 4 A, B), 視細胞のマーカーである rhodopsin, recoverin を発現するものがみられた(図 4 C, D)。驚くべきことに, rhodopsin や recoverin を発現する分裂細胞の核は丸く, 小さいもので, これは視細胞杆体の核の特徴と一致している。これらの結果は Müller 細胞由来の分裂細胞の一部が双極細胞および視細胞に分化したことを示唆するものである。

このように成体哺乳類の網膜において, 急性障害後 Müller 細胞が分裂を行い, 幹細胞様の性質を獲得し, 一部は網膜神経細胞のマーカーを発現した。すなわち, Müller 細胞は哺乳類成体網膜において内在性神経幹細胞としての性質を有しており, 哺乳類成体網膜にも再生する能力があることがわかったわけである。

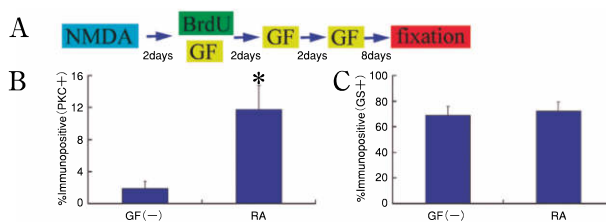


図 5 レチノイン酸は双極細胞への分化を促進する。NMDA 障害後 2, 4, 6 日にレチノイン酸を硝子体中に各 100 ng ずつ投与したところ(A, 実験プロトコル), 障害後 2 週間後で BrdU 陽性の分裂細胞が双極細胞のマーカー-PKC を発現する割合は有意に増加した(B, $p < 0.01$)。GS を発現する割合は不変であった(C)。RA: レチノイン酸, GF: growth factor (文献 19 より転載, 一部改変)

細胞	bHLH	Homeobox
神経節細胞	Math 5	
アマクリン細胞	Math 3/NeuroD	Pax 6/Six 3
双極細胞	Math 3/Mash 1	Chx 10
水平細胞	Math 3	Pax 6/Six 3
視細胞	NeuroD	Crx
Müller 細胞	Hes 1/Hes 5/Hesr 2	Rax/Chx 10

図 6 網膜細胞の分化・運命決定に関わる内的因子。

VI 網膜内在性幹細胞からの神経分化誘導

上述の Müller 細胞由来の分裂細胞が神経細胞のマーカーを発現する割合は非常に低く, また, 神経節細胞, 水平細胞, アマクリン細胞のマーカーを発現するものはなかった。そこで我々は, 哺乳類成体網膜には障害後の分裂細胞から全ての細胞種を分化させるための因子が欠けているのだと考え, 外的・内的因子を導入することにより Müller 細胞由来の分裂細胞の分化誘導を試みた。

NMDA 障害後様々な成長因子を硝子体中に投与し, より効果的に神経細胞への分化を誘導できるかどうか調べた(図 5 A)。その中でレチノイン酸は網膜の神経細胞の分化に関わる外的因子として知られているが²¹⁾, NMDA 障害後レチノイン酸を 100 ng ずつ計 3 回硝子体中に投与した群においては有意に双極細胞のマーカー-PKC を発現する BrdU 陽性細胞の割合が上昇した(図 5 B)。これはレチノイン酸で Müller 細胞から双極細胞への分化が促進されることを示唆するものである。また, Müller 細胞のマーカー-GS を発現する BrdU 陽性細胞の割合は不変で, 他の神経細胞のマーカーを出す割合も変わらなかった(図 5 C)。以上から, レチノイン酸は障害により活性化され未分化状態に脱分化した細胞の一部を成熟な双極細胞に分化させるが, 他の神経細胞やグリア細胞に分化する細胞の運命を変化させるのではないということが示唆される。

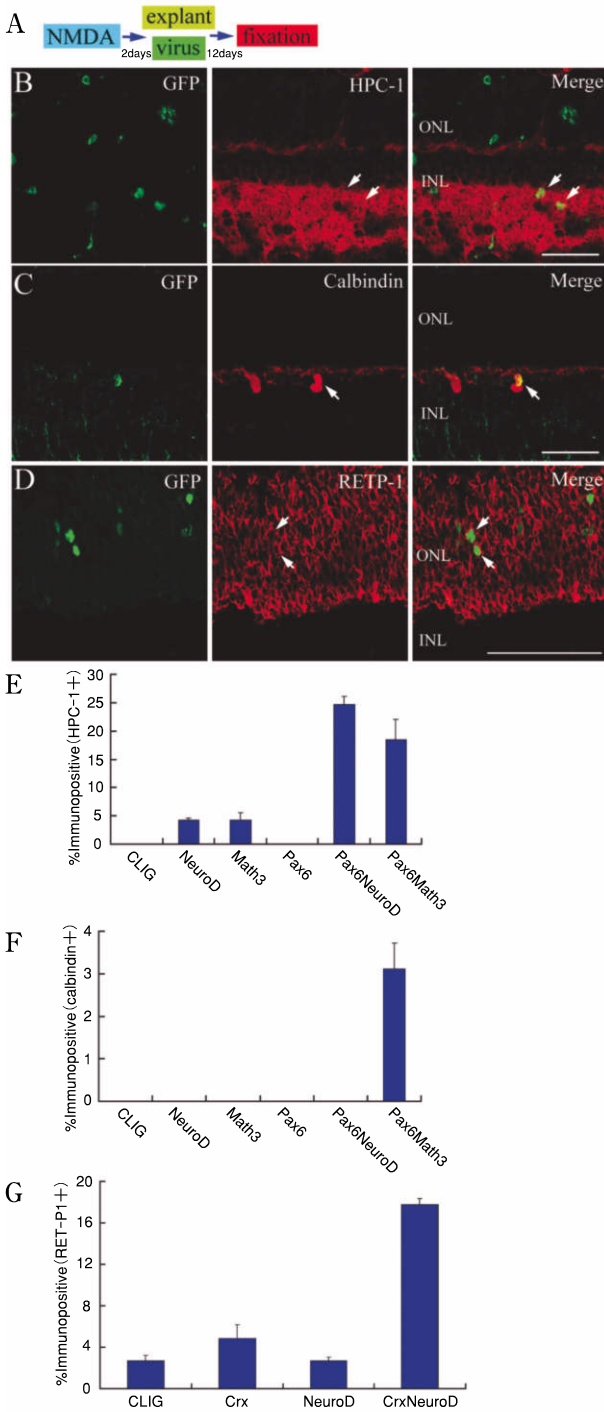


図 7 内的因子により分裂細胞の運命を一部コントロールできる。

A: レトロウィルスベクターを用いて NMDA 障害後 2 日目に内的因子を発現させ、2 週間の器官培養の後免疫組織学的検討を行った(実験プロトコル)。
 B: *Pax6-NeuroD* を発現させた分裂細胞(緑)の一部はアマクリン細胞のマーカー HPC-1(赤)を発現した。
 C: *Pax6-Math3* を発現させた分裂細胞(緑)の一部は水平細胞のマーカー calbindin(赤)を発現した。
 D: *Crx-NeuroD* を発現させた分裂細胞(緑)の一部は視細胞のマーカー RETP-1(赤)を発現した。
 E, F, G: 各内的因子を発現させた時に分裂細胞が神経細胞のマーカーを発現する割合
 CLIG; GFP のみ発現(対照)。
 バーは 100 μm (文献 19 より転載, 一部改変)

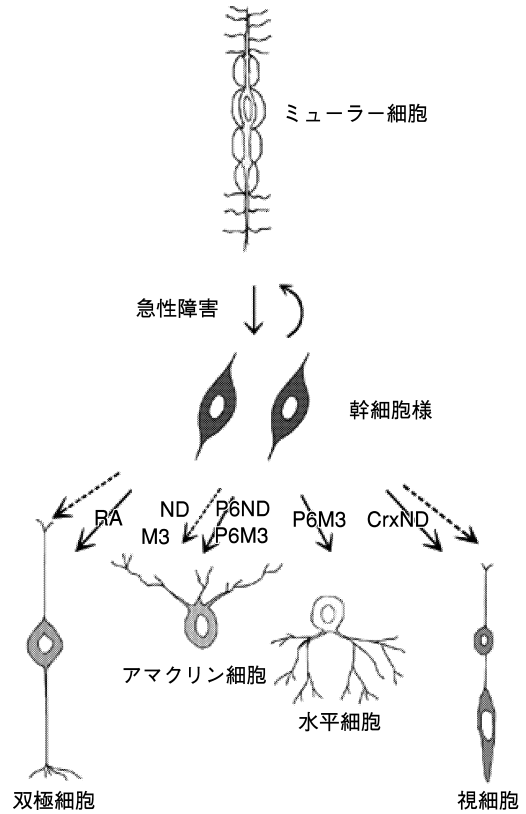


図 8 結果のまとめ。

RA: レチノイン酸, ND: *NeuroD*, M3: *Math3*, P6: *Pax6*
 破線は分化誘導されるが割合が少ないことを示し, 実線は効果的に分化誘導が行われることを示す。

近年 bHLH 型の転写因子とホメオボックス型の転写因子が網膜細胞の運命決定・分化を制御しているという報告がみられる⁴⁾⁵⁾(図 6)。そこで活性化された Müller 細胞に内的因子の与える影響を調べるため、レトロウィルスベクターを用いて、bHLH 型・ホメオボックス型の転写因子を強制発現させた。レトロウィルスは分裂細胞にのみ感染するため、NMDA 投与後 2 日目に感染させた細胞は分裂した Müller 細胞(由来の幹細胞)と考えられる。また、レトロウィルスベクターを効果的に感染させるために、網膜器官培養の系を用いた(図 7 A)。感染した細胞は Green Fluorescent Protein(GFP)を発現するベクターを使用し、培養 2 週間において、GFP 陽性細胞をモニタリングすることにより感染細胞の運命を観察した。

アマクリン細胞の運命決定に関わる bHLH 型の転写因子である *NeuroD*, *Math3*⁹⁾¹⁰⁾を発現させたところ、分裂細胞の一部はアマクリン細胞のマーカー HPC-1 を発現し、分裂細胞がアマクリン細胞へ分化したことが示唆された(図 7 E)。また、アマクリン細胞、水平細胞の分化に関わるホメオボックス型の転写因子である *Pax6*¹⁰⁾と組み合わせることにより、アマクリン細胞への分化はより促進され(図 7 B, E)、また、*Pax6*, *Math3* を

同時に導入した分裂細胞の中には水平細胞のマーカー calbindin を発現するものも認められた(図 7 C, F).

さらには視細胞の分化に関わる bHLH 型の転写因子である *NeuroD* とホメオボックス型の転写因子である *Crx*²²⁾ を同時に発現させることにより, 分裂細胞が視細胞のマーカー rhodopsin を発現する割合が有意に増加し, 分裂細胞から視細胞への分化が促進されたことが示唆された(図 7 D, G).

前述したように, 網膜発生において, 初期には神経節細胞・アマクリン細胞・水平細胞・錐体細胞が, 後期には杆体細胞・双極細胞・Müller 細胞が生成される. 成体網膜急性障害後, 遺伝子を導入しない状態では後期発生の杆体細胞, 双極細胞のみ生成された. これは Müller 細胞自体が後期発生の細胞腫であるため, Müller 細胞由来の分裂細胞は発生後期の前駆細胞様の性質をもっている可能性があり, 後期発生の細胞腫のみが生成されたのかもしれない. そこに早期発生の神経細胞の運命決定に関わる遺伝子を導入することにより初めてアマクリン細胞・水平細胞も生成されるのであろう.

以上をまとめたものが図 8 である. NMDA による急性障害後 Müller 細胞は分裂をはじめ, 幹細胞様の性質を獲得し, 一部は双極細胞や視細胞のマーカーを発現し, これら神経細胞への分化が示唆された. レチノイン酸投与により双極細胞への分化が促進された. *NeuroD*, *Math3* によりアマクリン細胞への分化がみられ, *Pax6* と組み合わせることにより分化は促進された. *Pax6-Math3* は水平細胞への分化を誘導した. *Crx-NeuroD* は視細胞への分化を促進させた. このように外的因子および内的因子により Müller 細胞から網膜神経細胞への分化を促進することが可能であり, Müller 細胞は成体の網膜再生の細胞源となる可能性を持っているといえる.

VII おわりに

以上, 哺乳類成体網膜にも内在性幹細胞といえる細胞が存在していることを解説した. 今回の結果では再生した網膜神経細胞が神経回路網に組み込まれ機能しているのかということまでは証明できていない. しかしながら, 我々の示した結果は, 網膜再生治療を目指す上で細胞移植以外の選択肢を示したものだといえる. さらに, 成体網膜も再生する環境を有するという事は, 移植細胞が組み込まれて神経回路網を再構築する環境も存在するかもしれないという希望を持たせる.

将来 Müller 細胞は, 網膜変性疾患において, 薬物治療や遺伝子治療のターゲットとなる可能性を持っている. より効果的に Müller 細胞を活性化させ, さらに多くの神経細胞を生成し, 神経回路網に組み込まれ機能することを示すことができれば, 網膜再生治療の新たな可能性が広がることとなるであろう.

稿を終えるにあたり, 研究をご指導いただきました京都大学大学院医学研究科眼科学教室赤木忠道博士, 秋田穰博士, 本田礼士前教授, 吉村長久教授, 京都大学大学院医学研究科ウイルス研究所影山龍一郎教授, 京都大学医学部附属病院探索医療センター万代道子助手, 高橋政代助教授に深謝いたします.

文 献

- 1) **Gage FH**: Mammalian neural stem cells. *Science* 287: 1433–1438, 2000.
- 2) **Radtke ND, Aramant RB, Seiler MJ, Petry HM, Pidwell D**: Vision change after sheet transplant of fetal retina with retinal pigment epithelium to a patient with retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 122: 1159–1165, 2004.
- 3) **Turner DL, Cepko CL**: A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328: 131–136, 1987.
- 4) **Kageyama R, Nakanishi S**: Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev* 7: 659–665, 1997.
- 5) **Cepko CL**: The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates. *Curr Opin Neurobiol* 9: 37–46, 1999.
- 6) **Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, et al**: Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287: 2032–2036, 2000.
- 7) **Haruta M, Kosaka M, Kanegae Y, Saito I, Inoue T, Kageyama R, et al**: Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nat Neurosci* 4: 1163–1164, 2001.
- 8) **Akagi T, Akita J, Haruta M, Suzuki T, Honda Y, Inoue T, et al**: Iris-derived cells from adult rodents and primates adopt photoreceptor-specific phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 3411–3419, 2005.
- 9) **Hatakeyama J, Tomita K, Inoue T, Kageyama R**: Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development* 128: 1313–1322, 2001.
- 10) **Inoue T, Hojo M, Bessho Y, Tano Y, Lee JE, Kageyama R**: Math 3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development* 129: 831–842, 2002.
- 11) **Hirano M, Yamamoto A, Yoshimura N, Tokunaga T, Motohashi T, Ishizaki K, et al**: Generation of structures formed by lens and retinal cells differentiating from embryonic stem cells. *Dev Dyn* 228: 664–671, 2003.
- 12) **Ikeda H, Osakada F, Watanabe K, Mizuseki K, Haraguchi T, Miyoshi H, et al**: Generation of Rx+/Pax 6+neural retinal precursors from

- embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 : 11331—11336, 2005.
- 13) **Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H**, et al : Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 : 1580—1585, 2002.
 - 14) **Ooto S, Haruta M, Honda Y, Kawasaki H, Sasai Y, Takahashi M** : Induction of the Differentiation of Lentoids from Primate Embryonic Stem Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 2689—2693, 2003.
 - 15) **Haruta M, Sasai Y, Kawasaki H, Amemiya K, Ooto S, Kitada M**, et al : *In vitro* and *in vivo* characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 1020—1025, 2004.
 - 16) **Temple S** : Stem cell plasticity—building the brain of our dreams. *Nat Rev Neurosci* 2 : 513—520, 2001.
 - 17) **Gould E, Gross CG** : Neurogenesis in adult mammals : some progress and problems. *J Neurosci* 22 : 619—623, 2002.
 - 18) **Fischer AJ, Reh TA** : Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci* 4 : 247—252, 2001.
 - 19) **Ooto S, Akagi T, Kageyama R, Akita J, Mandai M, Honda Y**, et al : Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 : 13654—13659, 2004.
 - 20) **Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G, Schiavo N, Zanellato A, Zanoni R**, et al : N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. *Vis Neurosci* 8 : 567—573, 1992.
 - 21) **Kelley MW, Turner JK, Reh TA** : Retinoic acid promotes differentiation of photoreceptors *in vitro*. *Development* 120 : 2091—2102, 1994.
 - 22) **Furukawa T, Morrow EM, Cepko CL** : Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91 : 531—541, 1997.
-