

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20951

研究課題名(和文) 遺伝子導入によるマウス網膜再生誘導の試み

研究課題名(英文) A challenge to induce retinal regeneration by gene transfection

研究代表者

馬場 行広 (Baba, Yukihiro)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：40581418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では網膜再生を誘導する遺伝子を同定するために、マウス網膜組織に遺伝子を導入した後に、細胞増殖誘導の評価、増殖した細胞の神経細胞への分化の評価を行なった。*in vitro*の遺伝子導入実験において、Ascl1とNICD3遺伝子導入によってミュラーグリアの細胞増殖が誘導されていることを確認した。さらに、Ascl1とNICD3に17の転写因子をそれぞれ加えて遺伝子導入を行い、神経分化マーカーの発現を指標にしてスクリーニングを行った。その結果、いくつかの転写因子の組み合わせでは神経細胞分化マーカーであるHuC/DやIslet1の発現誘導が認められた。

研究成果の概要(英文)：Lower vertebrate can restore the vision by inducing retinal regeneration after severe retinal damage. However, adult mammalian retina is incapable of regeneration in retinal dysfunctions, which results in retinal degeneration and permanent vision loss. There is currently no treatment for total blindness.

For the cure of impaired vision in human disease, we have tried to apply a principle of zebrafish retinal regeneration or retinal development to mouse retina by overexpression of transcription factors. After screening of transcription factors, we found that Ascl1-NICD3 cotransfection induced cell proliferation of Muller glia but no neuronal differentiation two weeks after gene overexpression. In the differentiation assay, we have searched a sufficient factor for neuronal cell differentiation of Ascl1-NICD3 cotransfected cells. We found long axon bearing cells and the expression of neuronal markers in some combinations.

研究分野：網膜再生

キーワード：網膜再生 細胞増殖 遺伝子導入 転写因子

1. 研究開始当初の背景

視細胞の変性によって視野が狭くなる網膜色素変性症は、根本的な治療法が確立されていない網膜変性疾患である。iPS 細胞から機能的な視細胞を作製し、細胞移植で治療する方法が考えられており、マウスを使った基礎研究が行なわれている。しかし、移植するための視細胞の機能や安全性、コストの面では多くの課題があると推測される。一方、網膜再生のメカニズムを分子レベルで解明するために、再生によって機能的な網膜組織を再構築することができるゼブラフィッシュを使った研究が国内外で精力的に進められている。これまでの知見として、障害によって網膜のグリア細胞であるミュラーグリア細胞が細胞増殖を開始し、増殖した細胞が神経細胞へ分化する過程における遺伝子発現やシグナル経路の解析が報告されている。一方、マウスでは光刺激により視細胞が障害を受けると、ミュラーグリア細胞の活性化が観察されるが、細胞増殖は認められず、神経細胞も生み出されないために網膜再生が起こらないことが示されている。これまでにげっ歯類で増殖因子による細胞増殖誘導の検討がされてきたが、生体レベルで網膜組織の再生を誘導することには成功しておらず、網膜再生に必要な遺伝子も明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究ではゼブラフィッシュの網膜再生で得られた知見をマウスに応用し、遺伝子導入による網膜再生誘導の可能性を検証し、再生による網膜変性疾患の新規治療法を確立するための基盤研究を行なう。これまでに細胞増殖を誘導する遺伝子についての研究が行なっている。将来の研究の発展として、アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子導入、あるいは網膜再生関連遺伝子を活性化する薬剤の投与といった、網膜変性疾患の新規治療法に結び付けたいと考えている。

これまでに網膜発生やゼブラフィッシュの網膜再生に係る遺伝子群(Pax6, Sox2, Chx10, Rax, Otx2, Ascl1, Hes1, NICD3)を候補遺伝子として定め、マウス網膜に遺伝子導入を行った後に、細胞増殖が誘導されるのか、増殖細胞が神経細胞へ分化するののかについて検討している。その結果、これまでにいくつかの予備的な結果を得ている。候補遺伝子の遺伝子導入を行い、Ascl1、Hes1あるいはNICD3によってミュラーグリア細胞の増殖が誘導されることを見出した(in vitro)。Hes1 プロモーターを用いて、ミュラーグリア細胞でAscl1、NICD3を発現させることにより、細胞自律的に細胞増殖が誘導されることを明らかにした(in vitro)。Nrl プロモーターを用いて、桿体細胞でHes1を発現させることにより、ミュラーグリア細胞の増殖が非細胞自律的に誘導されることを明らかにした(in vitro)。Ascl1、Hes1あるいはNICD3の遺伝子導入によって細胞増殖が誘導され

ないことを確認した(in vivo)。候補遺伝子の組み合わせによる遺伝子導入実験を行ない、Ascl1 と NICD3 によってミュラーグリア細胞の増殖が強く誘導されることを見出した(in vitro)。生後9日目の幼若なミュラーグリア細胞でAscl1 と NICD3 を過剰発現させると、細胞増殖が誘導されることを認めた(in vivo)。網膜変性モデルを作製するために、DNA アルキル化剤の N-メチル-N-ニトロソ尿素(MNU)を投与し、視細胞のほぼ全てが消失する条件を設定した(in vitro)。

これまでに得られている予備的な結果をもとに、本研究で予備実験の再現性を確認することや、(1)~(3)の項目の実験を行うことで、遺伝子導入による網膜再生誘導の可能性を検証する。

(1) in vivo の生後9日目でのAscl1 と NICD3 の遺伝子過剰発現によって見られた細胞増殖誘導の現象が、成熟したミュラーグリア細胞でも同様の結果が見られるのかを確認する。

(2) Ascl1 と NICD3 によって増殖したミュラーグリア細胞が神経細胞に分化するのかを各種神経細胞マーカーを用いた免疫組織化学染色によって明らかにする。

(3) 網膜変性モデルマウスにおいて遺伝子導入実験を行い、細胞増殖や神経細胞分化によって網膜組織がどの程度回復するのかを検討することで、候補遺伝子の再生誘導能を評価する。

3. 研究の方法

マウス網膜組織に候補遺伝子をエレクトロポレーションにより導入し、タモキシフェンによる遺伝子発現誘導後4日目に細胞増殖能を評価することで、有望な候補遺伝子の同定を行なう。また、有望な候補遺伝子については、増殖した細胞が神経細胞へ分化できるのかを明らかにするために、モキシフェンによる遺伝子発現誘導後7日目に神経細胞マーカーの発現(PNR, HuC/D, Islet1)を評価する。

in vitro の実験系で有望な候補遺伝子が同定された場合には、網膜障害モデルを用いた実験を行なうことにより、候補遺伝子の網膜再生誘導能を評価する。具体的な評価項目としては、成体のマウスでAscl1 と NICD3 を遺伝子導入した後に細胞増殖が誘導されるかを確認する。さらに増殖細胞から神経細胞が生み出されるのかについても検討を行なう。

4. 研究成果

(1) in vitro の遺伝子導入実験において、Ascl1 と NICD3 遺伝子導入によってミュラーグリアの細胞増殖が誘導されていることを確認した(図1)。これらの増殖細胞を性質を明らかにするために増殖細胞マーカーや

網膜前駆細胞で発現している転写因子の発現を調べたところ、さらに増殖した細胞が神経細胞に分化するのかを免疫染色によって確認したが、神経細胞マーカーの発現は見られなかった。これらの結果から Ascl1 と NICD3 は細胞増殖を誘導するが、神経細胞分化においては他の転写因子が必要であることが示唆された。また、in vivo の遺伝子導入実験の結果では、生後 9, 21, 60 日のミュラーグリアで Ascl1 と NICD3 の遺伝子導入によって細胞増殖が誘導されていた (図 3)。この結果から成熟したミュラーグリアが細胞増殖能を獲得するには Ascl1 と NICD3 の組み合わせが充分であることが示唆されたが、遺伝子導入効率が低かったため、今後より活性の強いプロモーターを選択することで効率を上げる工夫が必要である。

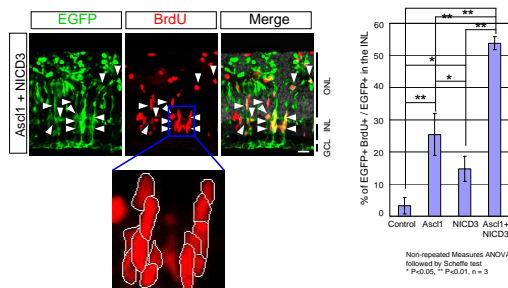


図 1 Ascl1とNICD3の遺伝子過剰発現による増殖促進の効果

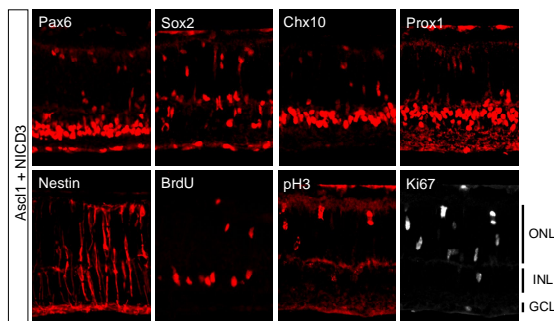


図 2 Ascl1とNICD3遺伝子過剰発現による細胞増殖マーカーと網膜前駆細胞関連転写因子の発現亢進

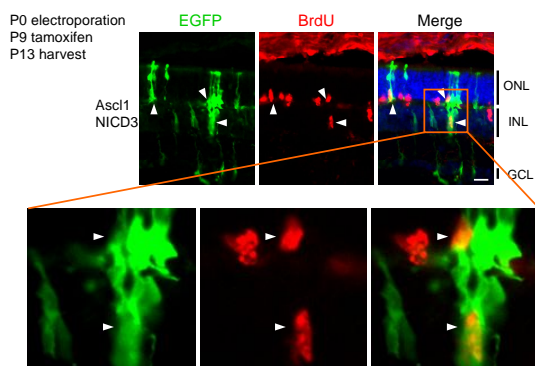


図 3 in vivoにおけるAscl1とNICD3の遺伝子過剰発現による細胞増殖促進効果

(2) 神経細胞への分化を誘導する機能を持つ転写因子の探索を行った。Ascl1 と NICD3 に 17 の転写因子をそれぞれ加えて遺伝子導入を行い、神経分化マーカーの発現を指標にしてスクリーニングを行った。その結果、いくつかの転写因子の組み合わせでは神経細胞分化マーカーである HuC/D や Islet1 の発現誘導が認められた。特に転写因子 X の組み合わせでは、網膜組織培養後のホルマウント染色において、遺伝子導入された細胞が長い神経突起を伸張している様子が観察され、神経細胞マーカーの発現の誘導が認められた (図 4)。今後、これらの細胞がアマクリン細胞なのか神経節細胞なのかを特定し、神経細胞として機能的であるかを解析する必要がある。

	PNR (rod)	HuC/D (amacrine)	Islet-1 (ganglion)
Ascl1+NICD3	-	-	-
+Pax6	-	-	-
+Sox2	-	-	-
+Vsx2	+	+	+
+Rax	-	-	-
+Otx2	-	-	-
+Ngn2	-	-	-
+Sox4	-	+	+
+Sox11	-	-	-
+Foxn4	-	+	-
+Jmjd3	+	-	-
+Lhx2	+	+	-
+Prox1	-	+	-
+Sall1	-	-	-
+Sall3	-	+	-
+Six3	-	-	-
+Zic1	-	+	-
+Zic2	-	+	+

図 4 Ascl1、NICD3および各転写因子の組み合わせによる遺伝子過剰発現後の神経細胞マーカーの発現

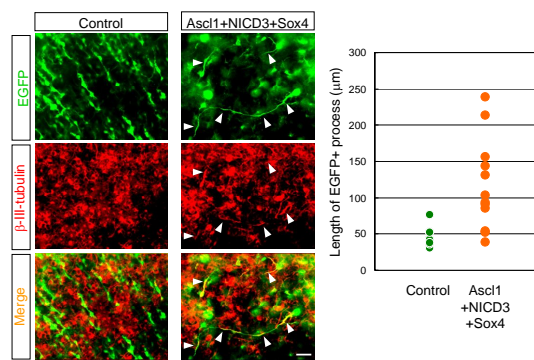


図 5 Ascl1、NICD3およびSox4遺伝子導入による神経突起の伸張と神経細胞マーカーの発現の誘導

(3) 網膜変性モデルマウスにおいて遺伝子導入実験を行い、細胞増殖や神経細胞分化によって網膜組織がどの程度回復するのかを検討する項目については、Ascl1、NICD3 および Sox4 遺伝子導入細胞の定性、in vivo での遺伝子導入実験、および誘導効率の上昇を達成した後に行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1件)

馬場行広、遺伝子導入による網膜神経細胞へのダイレクトリプログラミング、第16回日本再生医療学会総会、2017年3月08日、宮城県・仙台市

6. 研究組織

(1)研究代表者

馬場 行広 (Baba Yukihiro)
東京大学・医科学研究所・再生基礎医科学
寄付研究部門・特任研究員
研究者番号：40581418

(4)研究協力者

渡邊 すみ子 (Watanabe Sumiko)
東京大学・医科学研究所・再生基礎医科学
寄付研究部門・特任教授
研究者番号：60240735