

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11491

研究課題名(和文) 網膜ミュラー細胞の分化に関わる転写因子群の標的遺伝子遷移と再生能賦活の解析

研究課題名(英文) Analysis of target gene transitions of a transcription factors involved in retinal Muller cell differentiation and analysis of regenerative activation of retina

研究代表者

須藤 則広 (Sudou, Norihiro)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：80646216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの網膜の神経細胞は一度死ぬと再生することは無いが、魚類などの一部動物では網膜に含まれるミュラー細胞が増殖し、神経細胞に変化して網膜を再生させることができます。しかし生体内では増殖しない哺乳動物のミュラー細胞も体外で培養すると増殖することができます。本研究ではその現象に注目しました。その結果、増殖開始時に起こる遺伝子発現の変化をとらえることができ、生体内での網膜再生に応用するための基礎的情報が得られました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体外での網膜培養における遺伝子発現の変化については不明な点も多く、そこから得られる情報がヒトなどの網膜再生に有用な情報をもたらす可能性に注目した。その結果、培養開始時から一部iPS関連の遺伝子が上昇することが明らかとなった。これら遺伝子は網膜の発生時には徐々に減少していき、成体になるとほとんど検出されなくなる。しかし再び増殖を開始する時には必要であることが示唆された。本研究の成果は網膜再生医療における基礎的情報を与えるものといえる。

研究成果の概要(英文)：Neurons in the human retina do not regenerate once they die, but in some animals, such as fish, Muller cells in the retina can proliferate, transforming into neurons and regenerating the retina. However, mammalian Muller cells, which do not proliferate in vivo, can also proliferate when cultured outside the body. In this study, we focused on this phenomenon. As a result, we were able to capture the genetic changes observed at the onset of proliferation and obtained basic information for application to retinal regeneration in vivo.

研究分野：網膜発生・再生

キーワード：網膜発生 転写制御

1. 研究開始当初の背景

(1) 網膜発生において網膜前駆細胞は細胞増殖を繰り返し、適切な遺伝子発現により最終的に6種類の神経細胞と1種類のグリア(ミュラー細胞)を分化させる。この時分化したミュラー細胞は幹細胞的な特性を持つことが知られ、ゼブラフィッシュなどの魚類では網膜損傷時に脱分化・増殖し、神経細胞を再生させる。しかしヒトやマウスなど哺乳動物のミュラー細胞では再生能を示さない。網膜前駆細胞とミュラー細胞は網膜において機能は異なるが、発現している転写調節因子(以下、転写因子)群が極めて類似している(Blackshaw et al., PLOS Biol, 2004)。従ってゼブラフィッシュのミュラー細胞が成熟後でも多分化能を維持していることは理にかなう特性だと考えられる。一方で哺乳動物では発現している転写因子群が共通しているのにも関わらずミュラー細胞が再生能を示さない。この原因を明らかにすることは哺乳動物における網膜再生能の賦活化に重要な糸口になると考えられる。

(2) 転写因子 *rax*、*pax6*、*sox9*、*lhx2*、*chx10* は網膜前駆細胞から最後に分化するミュラー細胞において継続的に発現が見られ、網膜形成の転写制御ネットワークの上位に位置する転写因子群であると考えられる。これらの遺伝子は発生期の網膜前駆細胞およびミュラー細胞それぞれの特性を保つのに必要な因子として知られている(報告多数)。さらに遺伝子の制御関係には階層構造が存在し、上位遺伝子が動くことで下位の遺伝子を動かす遺伝子カスケードが重要となる。つまり哺乳動物のミュラー細胞では上記転写因子群が分化の前後で標的遺伝子を変え、多分化能に関わる遺伝子カスケードを失った可能性が推測される。

(3) 転写因子は標的遺伝子の活性を調節するゲノム上のエンハンサーに結合し、その遺伝子の転写活性を制御している。遺伝子ではエンハンサーの活性化が先に起こり、続いてプロモーターが活性化する(Arner et al., Science, 2015)。つまりはエンハンサーへの転写因子の結合が遺伝子の on/off を調節していることになる。近年エピジェネティクス制御が注目されているがこれはクロマチン(DNAがヒストンタンパク質に巻き付いた状態)のヒストンおよびDNA配列自体に対する化学的修飾(メチル化、アセチル化など)が、クロマチンの構造またはタンパク質の結合状態を変えることで遺伝子発現を制御する機構である。このようなクロマチン修飾はまず初めにパイオニアファクターと称される転写因子によって引き起こされると考えられている(Chen et al., nature reviews genetics, 2014)。この因子は最も先にゲノム領域に結合することで、リモデリング因子やエピジェネティクス因子を呼び込み、ヘテロクロマチン領域をオープンにする。しかし網膜発生におけるパイオニアファクターは未だ同定されておらず、上位に存在する転写因子群の役割分担についても不明な点多い。

(4) 申請者らによる先行研究において、時期特異的視細胞変性マウスを用いた視細胞再生可能時期の検討の結果、生後6日までに変性させると、細胞増殖が起こり視細胞が再生することが明らかとなった。また生後10日になると転写因子 *Ascl1* をミュラー細胞に過剰発現させることで一部再生能を示すが十分ではない(Ueki et al., PNAS, 2015)。更にこれらの結果に関連して成体マウスのミュラー細胞では神経分化に関わる遺伝子のDNA結合性が減少していることをDNase1 hypersensitivity assay(クロマチンに対するDNaseIの感受性テスト)によって示している(Ueki et al., PNAS, 2015)。つまりマウスは生後6日と10日の間に、また生後10日から成体までの間で段階的に再生能力が失われ、その原因はクロマチンのDNA結合性の変化による可能性が高いことを示唆するものである。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、次の仮説を設定した。【仮説1】哺乳類ミュラー細胞は分化の過程で多分化能に関わる遺伝子カスケードを失う。【仮説2】エンハンサーにおけるエピジェネティクス修飾の変化が多分化能遺伝子カスケードを失う原因になる。【仮説3】適切なエピジェネティクス因子および転写因子を導入することで不活性化したエンハンサーを賦活化し、哺乳類ミュラー細胞の再生能が獲得される。本研究の目的は上記の仮説を検証し、将来網膜再生を実現させるために必要な基盤的知識を得ることにある。具体的には(1)網膜前駆細胞およびミュラー細胞における *rax*、*pax6*、*sox9*、*lhx2*、*chx10* 遺伝子の標的遺伝子の変化やエンハンサーの切り替え、また標的遺伝子の転写量の変化についてクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)およびRNA-シーケンス(RNA-seq)を用いて明らかにする。(2)転写因子の標的遺伝子の変化とエピジェネティクス修飾との関連性について明らかにする。(3)エピジェネティクス因子と転写因子を共注入することで、不活性化エンハンサーを活性化し、ミュラー細胞に再生能が獲得されるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 転写因子の標的遺伝子とその遺伝子発現をマウス網膜前駆細胞とミュラー細胞で比較す

る。その為に4つの発生段階（胎生期-網膜前駆細胞、生後-網膜前駆細胞、未成熟-ミュラー細胞、成熟-ミュラー細胞）を用いる。

(2) 主要な実験手法は①細胞分離：ミュラー細胞を分離する為にセルソーターを使用し、分離した細胞からはトータル RNA の抽出、RNA-seq 解析を行う。また ChIP-seq 解析の為にクロマチン調整を行う。②クロマチンと抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) : ChIP assay において抗体の特異性は結果大きく左右する。その為クロマチン免疫沈降定量 PCR により十分に検討を行った後に ChIP-seq 解析を行う。③次世代シーケンスおよびそのデータ解析：次世代シーケンスの機器・維持は数億円単位の費用がかかる為、外部に委託し、データ解析は基本的に自身で行う。解析の為に講習会なども頻繁に開かれておりこれらも積極的に活用する。さらに ChIP-seq と RNA-seq の結果をもとに、転写因子の転写ネットワークモデルを構築すると共に、上記解析の検証を目的としたエンハンサー解析 (ルシフェラーゼレポーター法やゲルシフト法) を行う。また特定されたエンハンサーに対するエピジェネティクス修飾を明らかにする為のヒストンメチル化 ChIP-seq 解析や解析結果を応用したミュラー細胞への遺伝子導入を行い網膜再生の実験を行う。

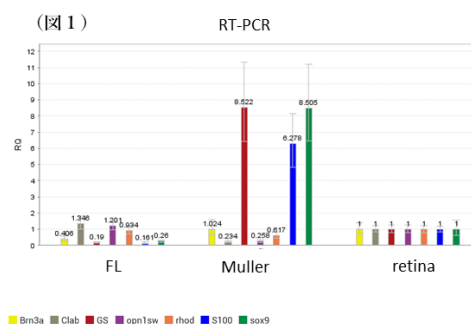
4. 研究成果

(1) ChIP-seq 解析の立ち上げ

ChIP-seq と RNA-seq 解析を行うためにはミュラー細胞の分離が重要となる。ミュラー細胞は網膜組織の2-3%程度しか存在しない。その為より多くのミュラー細胞を回収する為に細胞を侵襲しない条件での組織分散が重要となる。ただこれまでもいくつかの論文でミュラー細胞を分離・解析された報告があるが再現性が得られていない。トリプシンを用いた分離方法で高い生細胞数などが得られるよう条件検討を行い、セルソーターでの細胞分離に取り掛かった。またセルソーターは当初学内で使用する予定であったが管理運用や費用面の問題から外部機関（東京大学医科学研究所 FACS コアラボラトリー）での使用となった。ところが条件検討途中でコロナウイルスによる緊急事態宣言などにより外部からの使用ができなくなった為、セルソーターでの分離を中断した。その代替方法としてより安価に短時間で処理できる磁気ビーズを用いた細胞分離 (MACS) 方法に変更して行うことにしたが、その時点では ChIP-seq 解析に必要な量のクロマチンを得ることができなかった。よって細胞分離を行わない網膜前駆細胞での ChIP-seq 解析を先行させ、ChIP-seq 解析のためのクロマチン抽出、ChIP assay、シーケンス、データ解析の一連の実験系を立ち上げることにした。転写因子は網膜前駆細胞とミュラー細胞特異的に発現し、特異性の高い抗体がそろっている *sox9* 遺伝子を用い、細胞は比較的数が多い生後-網膜前駆細胞 (生後1日) でクロマチン調整した。ChIP assay 後、シーケンスでは 100bp、ペアエンドで 2 千万リードのデータを得た。シーケンスは外部委託し、得られたデータは複数のプログラム bowtie2 (ゲノムマッピング) や MACS2 (ピークコーリング) などを利用し、より最適なピークを得られるよう試行錯誤しながら解析を行った。結果、*Sox9* のピークは *sox9* 自身や *asc11* や *vsx1* 遺伝子など眼の初期発生において重要な遺伝子で検出された。今後ミュラー細胞のデータと比較する予定である。最終的に自前で ChIP-seq 解析ができたことは、今後の研究の進展においても大きな前進であり、経費削減にも大きく貢献するものであるといえる。

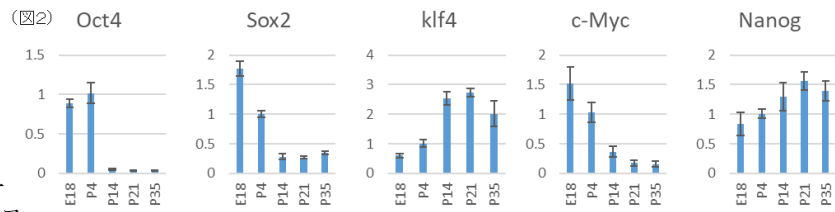
(2) 磁気ビーズを用いた細胞分離 (MACS) 方法によるミュラー細胞の分離

前述の通り、網膜に存在するミュラー細胞は少なく、網膜全体でクロマチンを調整すると ChIP assay 時の容量が膨大になり、免疫沈降が上手く行えない問題が生じた。その為できる限りミュラー細胞を濃縮させてクロマチンを調整する必要がある。最近になりパルパイン処理による細胞分散と CD29 抗体を用いてミュラー細胞を分離する手法が複数報告されたので再現を試みた。図1に示すように、リアルタイム RT-PCR 解析においてミュラー細胞特異的な遺伝子 *GS*、*S100β*、*sox9* 遺伝子がコントロールの網膜 (retina) および素通り画分 (FL) と比較して大きく濃縮された結果が得られた。また Western Blotting 解析においてもミュラー細胞特異的な *sox9*、*p27*、*glast* 遺伝子の濃縮を確認した。現時点で研究期間が終了してしまうが、ミュラー細胞における ChIP-seq 解析への進展が可能となった為、継続して研究を続ける予定である。



(3) リアルタイム RT-PCR を用いた網膜発現遺伝子の解析

RNA-seq 並びに ChIP-seq 解析を行った際に、データの検証や解釈の為に網膜で発現している転写因子、エピジェネティクス因子、リプログラム関連因子の発現解析を行った。



* 生後4日 (P4) を基準とした相対値

(胎生 18 日、

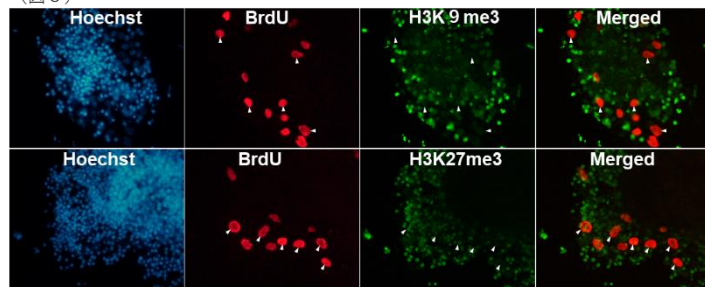
ステージは発生期から成体に至る過程

生後 4 日、14 日、35 日) におけるもので 60 遺伝子以上調べた。特に図 2 に示すように、iPS 遺伝子 (oct4, sox2, c-Myc) は生後急激に減少することが明らかとなった。また klf4 や多分化維持に関わる nanog 遺伝子は成熟に伴いわずかに増加した。特に oct4, sox2, c-Myc 遺伝子の変化は網膜前駆細胞の減少と一致していると考えられる。

(4) 網膜の初代培養系を用いた遺伝子発現解析

マウスなどの哺乳動物では網膜が損傷してもミュラー細胞は増殖しないが、培養系の in vitro 条件においてはミュラー細胞だけが細胞周期に再進入する。この現象は本研究を遂行する上で網膜再生の際の有用な参考情報が得られるものと考え、培養系における遺伝子発現の変化を生後 14 日、21 日、35 日網膜で比較した。その結果、通常は生後 10 日前の未成熟なミュ

(図 3)

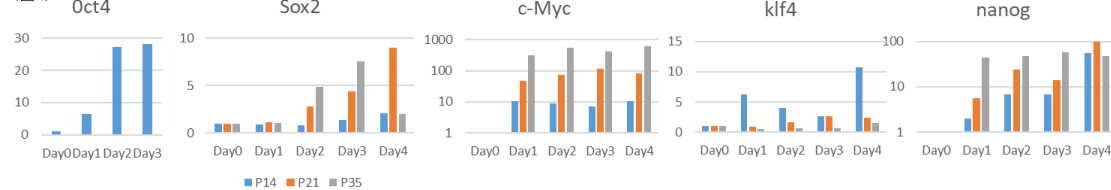


* 生後21日網膜の初代培養・BrdUは増殖マーカー

ラー

細胞が含まれる網膜で初代培養を行うが、生後 14 日、21 日、35 日網膜でも一部増殖するミュラー細胞が見られた。ただ増殖するミュラー細胞の割合は発生が進むにつれて減少したが、細胞分裂に入ったミュラー細胞では増殖マーカーの BrdU の取り込みが見られた。また遺伝子の抑制に関わるヒストン修飾 (H3K9me3, H3K27me2, 3) が、成体の培養前ミュラー細胞のものよりも減少していることが明らかとなった (図 3)。リアルタイム RT-PCR の解析では細胞周期の促進に関わる ccna2, b1, d1, e1 遺伝子はいずれも上昇し、ヒストン脱メチル化因子 KDM4a, 4d (H3K9, K36)、KDM7a (H3K27) 遺伝子はわずかに上昇していた。また大変興味深いことに iPS 遺伝子の oct4, c-myc, sox2 および nanog などが培養開始後から増加する結果が得られた。これらの遺伝子は眼の発生・成熟と共に大きく減少していたことから、発現が回復したといえる。その為分化したミュラー細胞は iPS 遺伝子などにより一部リプログラムすることで、ヒストンの修飾状態が変わり、再び細胞増殖のプロセスに入ることができるようになったと推測される。したがって生体内では網膜組織が成熟するほどリプログラム関連遺伝子のカスケードが失われていくことで、再生能が消失するという仮説を支持する結果ともいえる。

(図 4)



(5) まとめ

本研究は網膜前駆細胞およびミュラー細胞で共通して発現している転写因子がどのように標的遺伝子を変えているか、ChIP-seq 解析を中心に行うはずであったが、様々な要因により成しえなかった。しかし今後の研究につながる十分な準備的成果が得られたことは確かである。まず第一に網膜からのミュラー細胞の分離である。一部ラボでは上手く動いているようであるがまだ一般的な技術ではなく、それらが稼働させることができるようになったことの成果は大きい。第二に ChIP-seq 解析におけるデータ解析ができるようになったことである。余裕のあるラボでは外部委託したり情報技術者を雇うことが可能だが一般的にはそうではない。様々な外部ツールを利用し解析手法を獲得したことは今後の解析に大いに役立つものである。三点目はミュラー細胞の初代培養系を用いた遺伝子発現解析による iPS 遺伝子の変動をとらえたことである。本来生体内で見られない現象が生体外の培養系ではミュラー細胞が増殖することは知られていたが、それは特に幼若なミュラー細胞であった。しかし成体のミュラー細胞であっても一部増殖する細胞があり、同時に oct4, c-myc, sox2, nanog 遺伝子などの iPS 関連遺伝子の変動していたことは今後の網膜再生研究の基盤的情報となりうるものであるといえる。

状況説明

研究代表者（前所属：東京女子医科大学）は校舎移転の為の新校舎計画から移転計画までの準備委員として参画していた為、移転一年前の平成 31 年度は特に忙しく、実験時間を十分に確保できなかった。さらに東京大学医科学研究所 FACS コアラボラトリーの協力を得て進行中であった細胞分離がコロナウイルスによる影響で外部の使用が出来なくなり中止に至った。またコロナウイルスによる大学の経営問題により約一か月間の一次帰休が行われ、緊急事態宣言時や感染等により出勤できない場合に備えマウスの飼育数も削減、最終的に引越しに伴いマウスの全処分などの状況にあった。令和 2 年 2 月から 5 月にかけて新校舎への移転期間は実験が完全停止となり、加えて物品等の入荷に非常に時間がかかるなど多方面の影響があった。令和 3 年度は研究代表者が東邦大学に移動し、新規立ち上げに時間を要し、物品入荷遅延などの影響により研究の進展が遅れた。しかし本研究は最後の段階で目的の達成が可能な準備的成果が得られているため研究を継続して行い、網膜前駆細胞とミューラー細胞の標的遺伝子の解析による成果をまとめる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Paraiso Kitt D., Blitz Ira L., Coley Masani, Cheung Jessica, Sudou Norihiro, Taira Masanori, Cho Ken W.Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 Endodermal Maternal Transcription Factors Establish Super-Enhancers during Zygotic Genome Activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2962 ~ 2977.e5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.05.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ogawa Mariko, Saitoh Fuminori, Sudou Norihiro, Sato Fumi, Fujieda Hiroki	4. 巻 12
2. 論文標題 Cell type-specific effects of p27KIP1 loss on retinal development	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neural Development	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13064-017-0094-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Norihiro Sudou, Hiroki Fujieda
2. 発表標題 Target gene analysis of transcriptional regulator Sox9 in retinal progenitor cells of mouse
3. 学会等名 the 126th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists/ the 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須藤則広、藤枝弘樹
2. 発表標題 成体マウスMuller cell初代培養における細胞進入と遺伝子発現変化の解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川 亨、齋藤文典、須藤則広、蔭池かおり、藤枝弘樹
2. 発表標題 光傷害ラット網膜における神経細胞再生の検討（第三報）
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤万季、須藤則広、飯田知弘、藤枝弘樹
2. 発表標題 マウス網膜p27遺伝子による神経分化・多分化能遺伝子の発現調節
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤則広、藤枝弘樹
2. 発表標題 成体マウス網膜初代培養におけるMuller cellの細胞周期再進入と遺伝子発現変化の解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川亨、齋藤文典、須藤則広、蔭池かおり、藤枝弘樹
2. 発表標題 光障害ラット網膜における神経細胞再生の検討（第三報）
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川亨、齋藤文典、須藤則広、蔭池かおり、藤枝弘樹
2. 発表標題 光障害ラット網膜における神経細胞再生の検討（第二報）
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関