

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19570216  
 研究課題名（和文）  
 網膜の幹細胞を維持する分子メカニズムの解明  
 研究課題名（英文）  
 Elucidation of molecular mechanism that controls the maintenance of retinal stem cells

## 研究代表者

中川 真一 (Nakagawa Shinichi)

独立行政法人理化学研究所・中川独立主幹研究ユニット・ユニットリーダー(独立主幹研究員)

研究者番号：50324679

## 研究成果の概要（和文）：

網膜の最もマージン側の領域には長期間にわたって多分化能と分裂能を保つ網膜幹細胞が存在しており、それらは分泌性のシグナル分子である Wnt2b によって維持されている。本研究においては、Wnt の下流で働いている転写因子に注目し、それらが作るネットワーク構造を解明することを目指した。その結果、Wnt によって活性化されるβ-catenin/LEF1 複合体が c-myc を含む複数の転写因子群を活性化していること、それらが協調して転写抑制因子である c-hairy1 を活性化していること、c-hairy1 は Wnt の幹細胞維持活性を細胞に伝えるためのノードとして働いている事などを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

The marginal region of the retina contains retinal stem cells that continue to proliferate and remain undifferentiated for a long period. We have previously identified a signaling molecule Wnt2b as a retinal stem cell factor that maintains undifferentiated state of the retinal stem cells. In this research project, we investigated downstream pathway of the Wnt signaling, especially focusing on transcription factors. We have found that Wnt activates multiple transcription factors including c-myc, which in turn cooperatively activate a transcriptional repressor c-hairy1. We have also revealed that the activation of c-hairy1 in turn was necessary and sufficient to inhibit differentiation of the retinal stem cells. Thus, c-hairy1 functions as a node downstream of Wnt signaling to maintain the retinal stem cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学 ・発生生物学

キーワード：網膜、幹細胞、Wnt、ニワトリ、c-hairy1、ノード、転写因子、ネットワーク

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の中樞神経系の特定の領域には、機能的な組織が形成された後も長期間にわたって増殖を続け複数の細胞タイプに分化する能力を持った神経幹細胞が存在する。網膜のマージン領域、神経性網膜と毛様体の中間領域 (Ciliary Marginal Zone: CMZ) に存在する幹細胞は古くからその存在が知られており、ほかの領域に存在する幹細胞と比較して細胞系譜が詳細に調べられている。CMZの網膜幹細胞は機能的な網膜組織の形成終了後も長期間にわたって未分化性を維持し、網膜の全ての細胞タイプを含む大きな子孫細胞のクローンを形成する。一方、発生初期の神経性網膜で見られる未分化な前駆細胞は幹細胞同様の多能性を有するものの、未分化状態を保ったままの増殖は一定期間しか継続することが出来ず、カラム状に並んだ比較的小さな子孫細胞のクローンしか作らない。このようなCMZの幹細胞の性質がどのようなメカニズムによって決められているかについては、長らく不明であった。

我々はこれまでの研究を通して、CMZに隣接する領域で発現しているシグナル分子Wnt2bが幹細胞を維持する主要な因子として働いているというモデルを提唱してきた。この考えは以下のような実験観察事実から生まれてきた。まず、Wnt2bを本来発現していない網膜の中心部に異所的に発現させると、その領域での細胞分化を抑制し、長期間にわたって細胞増殖を維持する。また、Wntのシグナルを下流に伝える転写因子LEF1のドミナントネガティブ変異分子を発現させると、網膜のマージン領域の未分化状態が保てなくなり、CMZにおける異所的な神経細胞の分化が誘導される。さらに網膜前駆細胞のクローナル培養を行うと、Wnt2bの添加により自己複製能をもつ細胞のクローンサイズが増大する。また、Wnt2bの刺激にตอบสนองして発現量が上昇する遺伝子をサブトラクションスクリーニングにより同定したところ、その多くは幹細胞が存在するCMZで特異的に発現していた。網膜においてWntシグナルが幹細胞因子として働いているという我々の仮説は、他の研究グループによっても、ゼブラフィッシュの変異体を用いた実験やES細胞の分化誘導の系などで次々と追試されている。

では、具体的に Wnt2b は細胞内にどのようなシグナルを伝えることによって CMZ の幹細胞の分化を抑制し、長期間にわたる増殖を

可能にしているのであろうか。網膜の細胞分化を抑制するメカニズムとしては Delta リガンドと Notch 受容体を介した側抑制のシグナルが良く知られているが、そのシグナル経路を DAPT と呼ばれる低分子化合物や Delta のドミナントネガティブ分子を用いてブロックしたような条件下においても、Wnt の分化抑制効果に変化は見られなかった。実際、Delta や Notch は CMZ では発現しておらず、幹細胞の未分化状態は Notch シグナルとは独立の経路を介して Wnt2b によって保たれていると考えられる。一方、神経細胞の分化の第一ステップは、プロニューラル遺伝子と呼ばれる basic Helix-Loop-Helix (bHLH) モチーフを有する転写活性化因子群の発現によって制御されているということが広く受け入れられている。Wnt2b と同時にプロニューラル遺伝子のひとつ *ath5* を過剰発現させると分化抑制の効果が中和されてしまうことから、Wnt シグナルによる幹細胞の維持にはプロニューラル遺伝子の発現抑制が「必要」であると考えられる。一方、Wnt2b を異所的に過剰発現させた網膜においてもこれらのプロニューラル遺伝子群の発現は総じて抑制されており、ほぼ全てのプロニューラル遺伝子の活性を負に制御する Id2 を網膜に過剰発現すると Wnt2b の過剰発現とほぼ同等の効果がみられることから、プロニューラル遺伝子群の発現抑制が幹細胞の維持に「十分」であることが予想される。ただし内在の Id2 は CMZ では発現が見られず、Wnt2b の下流でプロニューラル遺伝子群の発現を抑制している転写因子に関する情報は全く無い状態であった。

## 2. 研究の目的

本研究においては、ニワトリ網膜をモデルシステムとして用い、Wnt の下流で具体的にどのようなイベントが起きることによって幹細胞が維持されているのかを明らかにする事を目的としていた。特に、Wnt のシグナルの下流で発現が変化する転写因子に注目し、幹細胞を維持する転写因子ネットワークの全容を明らかにする事を目指した。

## 3. 研究の方法

網膜幹細胞において Wnt2b の下流でプロニューラル遺伝子群の発現を抑制している遺伝子を同定するために、candidate molecule approach、即ち他の系でそのような活性を持つことが期待されている HES ファミリー遺伝子に注目し、その発現パターンや生体内での機能を *in situ* hybridization や *in ovo* electroporation などの技術を用いて解析した。また、より網羅的に Wnt 応答遺伝子を同定するために、Wnt シグナルを恒

常に活性化した網膜とコントロールの網膜由来の RNA を用いて、マイクロアレイ解析を行った。転写因子による遺伝子発現制御が直接であるか間接であるかを調べるためには、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイを用いた。

#### 4. 研究成果

まず、Wnt2b に反応している細胞で特異的に発現している遺伝子を同定するために単一細胞由来の cDNA からサブトラクショナルライブラリーを作製し、ディファレンシャルスクリーニングを行う事によって Rdh10、Cath6 を同定した。次にこれらの遺伝子の生体内での発現を確認したところ、幹細胞領域である CMZ で特異的に発現していることが確認された。また、Wnt2b を網膜中心部に異所的に発現すると、Rdh10、Cath6、共にその発現が網膜中心部で誘導された。一方、Wnt のレセプターである Frizzled4 の細胞外ドメインのみを発現させて Wnt シグナルを阻害したところ、CMZ におけるそれらの遺伝子の発現は消失した。これらのことから、CMZ 特異的な分子マーカーの発現は、Wnt シグナルによって制御されていることが明らかとなった。これまで CMZ 特異的に発現する分子マーカーは全く知られておらず、網膜幹細胞の存在は、Notch が発現していない、分化マーカーが発現していない、などのあいまいな基準で判断するより他なかった。また、網膜幹細胞は毛様体マーカーを弱く発現しているため、Wnt の過剰発現時には毛様体マーカーが異所的に発現されることになる。そのため、Wnt が毛様体の細胞の運命決定に関わっているのか、CMZ の幹細胞も誘導できるのか、という問題に対して、我々の研究グループと、海外の別の研究グループで見解の相違が存在していた。本研究において CMZ に特異的に発現する分子マーカーが同定できたことによって、Wnt は確かに CMZ に存在する幹細胞を誘導する活性を持つことが確かめられ、この論争に終止符を打つことが出来た。

次に、このマーカーを用い、Wnt の下流で転写が活性化し、かつ神経細胞の分化を抑制する活性を持つ遺伝子を探索することにした。我々は以前の研究で、Wnt が神経分化を抑制する際に複数のプロニューラル遺伝子の発現を総じて抑制することを見出していた。このような活性を持つ転写抑制因子として、HES ファミリーに属する分子が知られている。そこで、ニワトリ網膜における HES ファミリーの発現パターンを調べたところ、幹細胞が存在する CMZ においては c-hairy1 が、網膜中心部に存在する未分化な神経前駆細胞においては HES5 が発現していることが分かった。次に、

CMZ における c-hairy1 の発現が Wnt シグナルによって制御されているかどうかを調べたところ、Wnt2b を異所的に発現した網膜で c-hairy1 の発現が誘導されること、また、Wnt シグナルを阻害すると c-hairy1 の発現が消失することが分かった。これらのことから、Wnt は c-hairy1 の発現を誘導することによって、CMZ において幹細胞を維持している可能性が考えられた。この仮説を検証するために、c-hairy1 および HES5 の過剰発現実験を行い、各種分化マーカーの発現に対する影響を調べた。その結果、どちらの HES ファミリー分子も神経細胞の分化を抑制すること、c-hairy1 の過剰発現は幹細胞マーカーである Rdh10 の発現を誘導すること、HES5 を過剰発現した網膜においては成熟ミューラー細胞のマーカーである Glutamine Synthetase の発現が誘導されることなどが分かった。これらのことから、神経細胞の分化は網膜の領域によって異なる HES ファミリー分子の発現によって制御されており、CMZ では c-hairy1 が発現することによって網膜幹細胞としての性質が維持されているのに対して、網膜中心部においては HES5 が神経前駆細胞の未分化状態を維持しつつ最終的にはグリア細胞への分化を促進していることが分かった。

次に、Wnt シグナルによる c-hairy1 の発現誘導メカニズムについて解析を行った。まず c-hairy1 のプロモーターの上流 2 kb をルシフェラーゼ遺伝子につないだレポーターを作製したところ、Wnt シグナルの活性化に応じてルシフェラーゼ活性が上昇することが分かった。通常、Wnt シグナルが細胞に伝わると、エフェクター分子である  $\beta$ -catenin が安定化し、LEF1 と複合体を形成することでターゲットの遺伝子の発現を活性化することが知られている。実際、上記の c-hairy1 プロモーターには、LEF1 の結合配列が複数個存在していた。そこで、これらの LEF1 の結合配列に変異を入れたレポーター遺伝子を作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。すると、LEF1 の結合配列を持たないようなプロモーターも Wnt シグナルの活性化に応答することが分かった。この観察事実は、Wnt による c-hairy1 の発現誘導は間接的なものであることを示唆していた。

そこで、Wnt の下流で発現が上昇し、さらに c-hairy1 のプロモーターに働きかけてその発現を誘導するような因子を同定するために、Wnt2b を恒常的に発現させた網膜とコントロールの網膜から得られた RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。そして Wnt2b を発現させた網膜で発現が特異的に上昇している遺伝子の中から転写因子を選び出し、それらの発現を in situ hybridization によって調べた。その結果、c-myc、Elk1、LMO4、Zic2 の 4 つの転写因子が Wnt シグナルの活性化に応答し、かつ CMZ で発現していることが分かった。

また、これらの遺伝子が **c-hairy1** のプロモーターを活性化すること、生体内においても **c-hairy1** の発現を誘導することが明らかとなった。一方で、これらの転写因子のいずれかの機能をドミナントネガティブ分子を用いて阻害しても、**Wnt** による **c-hairy1** の発現誘導には影響がないことが分かった。従って、**Wnt** シグナルは **c-myc** を含む複数の転写因子の発現を誘導し、それらの転写因子が **redundancy** をもって **c-hairy1** のプロモーターを活性化していることが予想された。以上の結果から我々は、「**c-hairy1** は **Wnt** シグナルの下流で網膜幹細胞を維持するためのノードとして働いている」という考え方を提唱している。

また、**Wnt** に応答する細胞がどのような形態をしているのかを明らかにするために、**Wnt** シグナルの活性化に応じて蛍光タンパク質を発現するレポーター遺伝子を導入し、**Wnt** 応答細胞を可視化することも試みた。遺伝子導入の方法としてはニワトリ胚へのエレクトロポレーション法を用い、また、ゲノム上に安定にレポーター遺伝子を取り込ませるために **Tol2** トランスポゾン組換え酵素とシス配列を利用した。まず、レポーター遺伝子が正しく働いているかを確認するために孵卵後7日目胚でレポーター遺伝子の発現を確認したところ、幹細胞様の細胞が存在する網膜のマージン領域で特異的に発現が見られた。また、**Wnt** のシグナルが伝わっていない網膜の中心部ではこのレポーターの発現は見られなかったが、**Wnt** を過剰発現することにより強い発現が誘導された。さらに **Wnt** シグナルを阻害するために **Wnt** 受容体である **Frizzled** の細胞外領域を過剰発現したところ、マージン領域におけるレポーターの発現が消失した。これらのことから、導入したレポーター遺伝子は **Wnt** シグナルの活性化状態を正しく反映しているものと考えられた。次に、網膜幹細胞の形態を詳しく観察するために、様々なステージにおいてレポーターを導入した胚を固定し、切片を作製してコンフォーカル顕微鏡による観察を行った。その結果、限られた増殖能しか持たない網膜の中心部分の前駆細胞と比較するとマージン領域の幹細胞は **apical-basal** の長さが短くくびれも少ない形態をしており、また多数の細かい突起を有していることが明らかとなった。このことから、網膜幹細胞は増殖能だけでなく、形態的にも特徴のある細胞であることが明らかとなった。

## 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)

[雑誌論文] (計 3 件) (査読有り)

1) Kubo, F. and Nakagawa, S. (2009) **Hairy1** acts as a node downstream of **Wnt** signaling to maintain retinal stem cell-like progenitor cells in the ciliary marginal zone. *Development* 136, 1823-1833.

2) Suga, A., Taira, M. and Nakagawa, S.\* (2009) LIM family transcription factors regulate the subtype-specific morphogenesis of retinal horizontal cells at post-migratory stages. *Dev Biol.* 330, 318-328.

3) Kubo, F. and Nakagawa, S. (2008). **Wnt** signaling in retinal stem cells and regeneration. *Dev Growth Differ* 50, 245-251.

[学会発表] (計 4 件)

1) 中川真一、第 1 回日本発生生物学会秋季シンポジウム (岡崎コンファレンスセンター)、「網膜の研究から広がる世界」、2007 年 11 月 6 日

2) Fumi Kubo, Masatoshi Takeichi, and Shinichi Nakagawa, 40th JSDB/59th JSCB joint meeting (Fukuoka Convention Center), Mini-symposium “New horizon of **Wnt** signaling”, **c-hairy1** controls retinal stem cell maintenance downstream of **Wnt** signaling, independent of Notch signaling at the ciliary marginal zone. (June 22, 2007).

3) Fumi Kubo, Masatoshi Takeichi and Shinichi Nakagawa, **Wnt** meeting 2007 (UCSD, San Diego, USA), **c-hairy1** controls retinal stem cell maintenance downstream of **Wnt** signaling, independently of Notch signaling at the ciliary marginal zone. (May 29, 2007).

4) 中川真一\*、竹市雅俊、久保郁、第 111 回日本眼科学会総会シンポジウム「網膜細胞分化の分子メカニズム」、「網膜幹細胞の未分化性を制御する分子メカニズム」、大阪、2007 年 4 月 20 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.jp/lab-www/nakagawa/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 真一 (Nakagawa Shinichi)

独立行政法人理化学研究所・中川独立主幹研究ユニット・ユニットリーダー (独立主幹研究員)

研究者番号 : 50324679