

平成21年6月11日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592048  
 研究課題名（和文） 網膜視細胞の発生・分化および疾患に関わる遺伝子の探索  
 研究課題名（英文） Key genes related to retinal development and diseases  
 研究代表者  
 小阪 美津子（KOSAKA MITSUKO）  
 岡山大学・医学部・客員研究員  
 研究者番号：50270476

研究成果の概要：幼弱期のマウス網膜組織内に、光受容体細胞（視細胞）の形質を獲得しているにもかかわらず、取り出して培養すると増殖を開始して他の網膜神経細胞へ分化転換するという細胞を発見した。その細胞は組織傷害時などに細胞分裂を開始し他の神経を生み出す幹細胞として機能しうる可能性が器官培養系の結果から得られ、全く新規の網膜幹細胞であることが示唆された。またその細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、網膜の発生・分化・疾患に関わる遺伝子候補を多数同定した。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,200,000 | 660,000   | 2,860,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：幹細胞生物学  
 科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学  
 キーワード：幹細胞、細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

虹彩上皮組織の幹細胞の同定に成功してその実体解明に取り組んでいた。その過程で実は虹彩上皮幹細胞と似た性質を持つ幹細胞活性を示す細胞が網膜視細胞（特にコーン型視細胞）に存在する可能性を見いだしていた。さらにこの細胞が未分化多能性幹細胞のマーカーとして知られる遺伝子(Oct-3/4など)を発

現していることが示唆されていた。この新規網膜コーン型視細胞幹細胞に着目し本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

網膜色素変性疾患の多くは遺伝性疾患であるが、現在その有効な治療法は確立されていない。遺伝病の診断・治療のためには、原因

遺伝子の同定とその機能解析が必要不可欠である。我々が着目する網膜の新規幹細胞の分子基盤を解析することにより、網膜視細胞の発生・分化および疾患に関わる遺伝子の候補をリストアップしそれらの機能を明らかにすることを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

生後の網膜に存在するコーン型視細胞様幹細胞を蛍光 (EGFP) で可視化するトランスジェニック (Tg) マウスを導入して、細胞の特性を明らかにするとともに、その細胞で特異的に発現する遺伝子についての解析を実施した。

#### (1) コーン型視細胞様幹細胞の特性

EGFP蛍光を指標にTgマウスの網膜組織内での細胞の特性を免疫組織学解析で明らかにする。同時にセルソーティングによりコーン型視細胞様幹細胞を濃縮して、それらの増殖能・分化能について培養系を用いて解析した。

#### (2) 器官培養系での解析

Tgマウス網膜の器官培養を行い、成長因子を添加しコーン型視細胞様幹細胞の組織内増殖の可能性を検証した。

#### (3) DNA マイクロアレイ解析

pOct-3/4-EGFP Tgマウスの網膜細胞からセルソーターを用いてコーン型視細胞様幹細胞を濃縮し、特異的発現を示す遺伝子を網羅的に解析し同定した。

#### (4) 体細胞におけるOct-3/4遺伝子の発現についての解析

体細胞における Oct-3/4 遺伝子の発現は偽遺伝子の存在により否定的な見解となっていた。そこで網膜および各組織における発現を精査し詳細を明らかにした。

### 4. 研究成果

#### (1) 生後マウスの網膜組織内ではコーン型視

細胞はすでに増殖停止し分化を完了しているとされてきた。しかしながら、今回我々が着目した細胞は、コーンの形質である s-opsin, recoverin などの発現は示すものの、PNA 陰性であることから、視細胞としては未成熟な状態で存在する細胞であることが明らかとなった。

さらにそれらの細胞を取り出し LIF 存在かで培養すると、増殖を開始し sphere を形成すること、さらにラミニンの上に接着培養すると他の網膜神経種の細胞へ分化転換することが分かった。

(2) コーン型視細胞様幹細胞は通常組織内で BrdU を取り込まないことから増殖は停止状態にあると考えられた。しかし、網膜の器官培養をすると、LIF 依存的に増殖を開始することを見つけた。この結果から、コーン型視細胞様幹細胞は組織傷害時などには増殖して組織修復に関与している可能性が考えられた。

(3) DNA マイクロアレイにより特異的に高い発現を示す遺伝子を同定したところ、コーン型視細胞の形質を示す遺伝子の他に、多数の網膜変性疾患原因遺伝子と癌関連遺伝子が含まれていた。またそれらの癌関連遺伝子の多くが試験管内の sphere 形成時発現が有意に増大することを確認した。この結果は、出生後の網膜発生期に存在するコーン型視細胞様幹細胞は、その存在意義はまだ充分明確にはなっていないものの、網膜の発生・維持に深く関与している可能性が示唆された。上記(1)-(3)の成果については、現在論文投稿準備中である。

(4) Oct-3/4 遺伝子は、iPS 細胞誘導にも使われる全能性維持に重要とされる遺伝子で初期胚や ES 細胞、iPS 細胞で発現している。体細胞での発現についての報告はあるものの、偽遺伝子の存在などのために、再検討が必要

とされていた。

そこで我々はマウス Oct-3/4 遺伝子の偽遺伝子を排除し真の発現を確認できる特異的プライマーを設計して精査した。生後3日のマウスの各臓器における Oct-3/4 遺伝子を RT-PCR 法にて調べた結果、生殖巣以外では眼で最も強い発現がみられ、他には脳での発現を確認した。しかもその転写産物について詳細に解析した結果、初期胚やES細胞などで従来知られる全長タイプの転写産物ではなく、Exon1を欠損した variant 型の転写産物を体細胞では発現しており、それらがコードするタンパク質は既知の全長タイプ意外に少なくとも2種類 (Oct-3/4B, Oct-3/4C) が存在することが示唆された (論文①)。

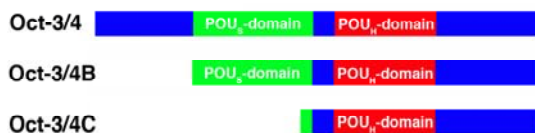


図1) Oct-3/4B, Cの構造

NIH細胞への強制発現解析により、Oct-3/4Cタイプは全長タイプと同様にトランスフォーム活性を有することがわかり、生体内でも何らかの機能を持つ可能性が高いと考えられた。

さらに、Oct-3/4 variant 型遺伝子の転写調節領域も新たに同定し、その領域をEGFPにつなげて variant 型発現細胞を可視化できるトランスジェニックマウスも新たに作製して生体内でもその領域が転写調節活性を持つことを確認した。

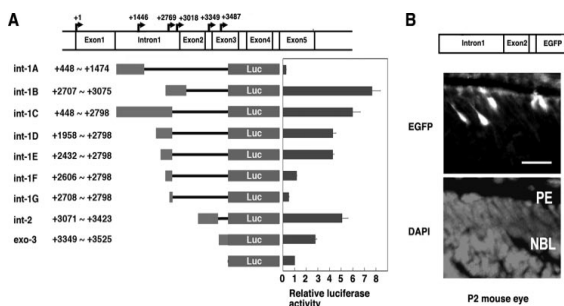


図2) Oct3/4 variant の転写調節領域

A: ルシフェラーゼ活性測定による転写調節領域の同定

B: 同定された領域を用いた Tg マウスの網膜の切片

以上の結果は、体細胞での Oct-3/4 遺伝子の発現を明確に結論づけることができた上、マウス Oct-3/4 variant 型転写産物の最初の発見となった。網膜のみならず体性組織内での Oct-3/4 遺伝子の発現・機能を解析する上でも有力なツールが得られ、幹細胞生物学分野においても幅広く貢献しうる。

### 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)

[雑誌論文] (計3件)

① Mizuno N and Kosaka M. Novel variants of Oct-3/4 gene expressed in mouse somatic cells. Journal of Biological Chemistry, 査読有、2008 (283) 30997- 31004.

② Mitsuko Kosaka. Iris pigment epithelium as a potential source for both basic biology and therapeutic applications for retinal regeneration. Strategies for retinal tissue repair and regeneration in vertebrates: From fish to human. 査読有. 2008 pp139-151.

③ Asami M, Sun GW, Yamaguchi M, Kosaka M. Multipotent cells from mammalian iris pigment epithelium. Developmental Biology. 査読有. 2007 (304) 433-446.

[学会発表] (計4件)

1) 小阪美津子、体細胞のフレキシビリティ

の理解と応用、第 35 回日本臓器保存生物医学定期学術集会シンポジウム講演、  
2008. 11. 23、東京

2) 小阪美津子、組織幹細胞の実体解明から  
癌幹細胞研究への新展開、第 2 回産学官連携  
新産業創出研究会「大腸癌幹細胞の生物学的  
特性の解析と新癌治療法の開発」研究会  
2008. 11. 07、岡山

3) 小阪美津子、眼組織幹細胞としての虹彩  
上皮細胞の基礎と応用、第 34 回日本臓器保  
存生物医学定期学術集会シンポジウム講演、  
2007. 11. 17、北海道

4) 渡邊康行、浅見真紀、孫こうい、土田順  
二、小阪美津子、Developmental plasticity  
of cone-photoreceptor precursor cells in  
postnatal mouse retina, 第 40 回日本発生  
生物・細胞生物学会合同大会、2007. 05. 28、  
福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小阪 美津子 (KOSAKA MITSUKO)  
岡山大学・医学部・客員研究員  
研究者番号：50270476

### (2) 研究分担者

水野 伸彦 (MIZUNO NOBUHIKO)  
兵庫県立大学・生命研究科・研究員  
研究者番号：60462735

### (3) 連携研究者

なし