

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月1日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791669

研究課題名（和文）ES細胞から網膜色素上皮細胞への分化・増殖における転写因子Tead1の機能解析

研究課題名（英文）The role of transcription factor Tead1 in the differentiation and proliferation of retinal pigment epithelial cells.

研究代表者

北川 道憲（MICHINORI KITAGAWA）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30314496

研究成果の概要（和文）：

網膜色素上皮細胞の分化・増殖過程におけるTead1の機能を、ヒトSCRAにおいて見出された変異Tead1を用いて解析した。マウス胎児より得た網膜色素上皮細胞の初代培養において外来的にTead1あるいはその変異型Tead1を発現し、同細胞の細胞増殖・Tead標的遺伝子の定量、さらに胎生期の眼組織形成期におけるTead転写因子、YAP/TAZ転写共役因子の発現部位を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

I studied the role of transcription factor Tead1 in the differentiation and proliferation of retinal pigment epithelial cells by using a mutant of Tead1 identified in human Sveinsson's chorioretinal atrophy. Tead1 or its mutant was expressed in mouse embryonic primary retinal pigment epithelial cells culture, and the cells were analyzed for the proliferation and the expression of Tead target genes. In addition, I clarified the expression patterns of Tead transcription factors and the coactivators, YAP and TAZ, during eye development in mouse embryos.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総 計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼発生、再生医学、細胞増殖、転写因子、網膜色素上皮細胞、ES細胞、細胞分化

1. 研究開始当初の背景

TEAモチーフはヒトTEF-1(TEAD1)・出芽酵母TEC1・麹菌AbaAの間において保存されていることから見出されたDNA結合領域の1つで、これまでに酵母からヒトに至る多くの種においてTEAモチーフを有する転写因子の存在が確認されている。それらの転写因子の機能解析から、出芽酵母においては偽菌糸形成を、ショウジョウバエにおいては翅の形態形成を制御するこ

とが知られており、TEAモチーフを有する転写因子は、それぞれの種において組織分化や器官形成に重要な役割を果たすと考えられている。脊椎動物の各種においてTEAモチーフをコードする遺伝子は複数存在し、特にヒト・マウスにおいては、それぞれ4つの遺伝子（ヒトTEAD1/2/3/4あるいはマウスTead1/2/3/4）が存在し、総称してTeadファミリーと呼ばれている。それぞれN末端側にTEAモチーフを含む構造

を持ち、そのアミノ酸配列は遺伝子間で高く保存されており、結合するDNA塩基配列にも差異は見出されていない。それぞれの発現する組織分布も広範囲に及び、重複して発現する組織も存在するが、発生段階や一部の組織においては差異が見られることから、Teadファミリー内では機能的差異が存在すると考えられていた。

TEAD1/Tead1 はヒト・マウスをモデルとしてTeadファミリーの中で最も解析が進められてきた遺伝子である。マウスTead1はジーントラップによる遺伝子破壊で胎生期における心臓形成異常を起こし胎生致死となることが知られているが、胎生期や成体にかけて心臓以外の広範囲な組織にその発現が確認されることから、他の組織においても何らかの機能を持つことが推測されていた。一方、ヒトにおいては、Sveinsson脈絡網膜萎縮症(SCRA)の連鎖解析から、患者のTEAD1遺伝子内にミスセンス変異が1つ存在することが最近報告された。SCRAはアイスランドの一部の家系において見出された常染色体優性遺伝病で、幼少期において視神経乳頭周囲部分より網膜色素上皮細胞層の裂開が生じ、損傷部位における脈絡網膜の萎縮を伴って視力を失う疾患である。何らかの原因で網膜色素上皮細胞層の裂開が生じ、出生前後に網膜色素上皮細胞が細胞増殖を停止するというモデルが提唱されているが、詳細な発症機序は不明のままであった。これまでの生化学的・分子生物学的解析から、TEAD1はN末端側のTEAモチーフによってDNAへ結合し、C末端側領域に幾つかの転写共役因子が相互作用することによってその転写活性が制御されていることが知られているが、SCRAの患者に見出されたミスセンス変異はC末端側領域内に位置していたことから、そのミスセンス変異がTEAD1の転写活性に影響を及ぼすことが推測された。

研究代表者はこれまでに、SCRAに見出されたTEAD1のミスセンス変異に相当する変異をマウスTead1へ導入し、その転写因子としての機能に対する影響について解析を行ってきた。その結果、Tead1のミスセンス変異体は、DNA結合能は失わないものの、転写共役因子として知られているYAP、TAZとの結合能を失い、培養細胞内における転写活性が低下することが明らかとなった。また、Tead1、YAP、TAZの発現は、胎生期後期においては網膜色素上皮細胞層に確認されているものの、成体マウスの網膜色素上皮細胞層においてはほとんど発現が見られなかった。したがって、SCRAに見出されたTEAD1のミスセンス変異は、TEAD1の転写因子としての機能喪失をもたらす、あるいはその変異体がドミナントネガティブに働くことによって、その標的遺伝子の発現を低下させ、網膜色素上皮細胞層の形成異常につながると予想された。最近の報告では、転写共役因子YAP、TAZは細胞間接着・細胞密度などの細胞外シグナルにより活性化されるHippoシグナル経路の仲介因

子として核内外を移動し、Teadファミリーを活性化することで細胞増殖・臓器の大きさを制御していると推測される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、網膜色素上皮細胞の分化・増殖過程においてTead1/変異型Tead1の発現を制御できる細胞株を樹立し、Tead1の役割を明らかにすることである。転写因子Teadファミリーの共役因子であるYAP、TAZは、ショウジョウバエ・マウスにおいて組織・器官の大きさを制御するという報告がこれまでになされているが、実際にTeadファミリー遺伝子の機能が各組織・器官における最終分化細胞の細胞数規定へ関与することを裏付ける報告は少ない。したがって、網膜色素上皮細胞の増殖におけるTead1の機能を解明することは脊椎動物における転写因子Teadファミリーと発生段階における細胞数規定の関係を明らかにする上でも意義深いものであると考えられる。また、未分化細胞からの網膜色素上皮細胞への分化段階におけるTead1の役割を明らかにすることは、*in vitro*における網膜色素上皮細胞の効率的な増殖方法の確立へとつながり、網膜色素変性症や加齢黄斑変性症などの網膜色素上皮細胞層の変性に起因する疾患の治療方法確立の一助となることが予想される。

3. 研究の方法

研究に先立ち、マウスTead1の網膜色素上皮細胞における発現を検討したところ、胎生期の同細胞分化過程から出生前後の一定期間に限られており、成体マウスの網膜色素上皮細胞層には、その発現がほとんど見られなかった。以上のことから、既存の成体由来網膜色素上皮細胞株はTead1の機能解析には適切ではなく、その分化過程を培養系で再現できるES細胞がより適当であると考えた。特に、最近の研究ではES細胞等の未分化細胞から特定の液性因子添加により効率的に網膜色素上皮細胞を誘導する培養手法が報告されていることから、ES細胞の網膜色素上皮細胞への分化過程において、Tead1、あるいはヒトSCRAに見出された点変異に相当する変異型Tead1を外来的に導入し、その機能解析を行うことを計画した。特に、Cre-loxPシステムにより簡易にテトラサイクリン誘導系の外来遺伝子を導入できるES細胞株が提供されており、当細胞から目的の細胞株を樹立すれば、ES細胞から網膜色素上皮細胞への分化誘導の任意の過程におけるTead1/変異型Tead1の発現誘導と機能解析が可能であると考えられた。変異型Tead1はヒトSCRA患者のTEAD1遺伝子内に見出されたミスセンス変異に相当する変異をマウスTead1へ導入したもので、転写活性の低下はすでに網膜色素上皮細胞株において確認していた。ヒトSCRA患者では野生型と変異型TEAD1が同量発現して混在してい

ると考えられるが、変異型 TEAD1 がドミナントネガティブに作用していると仮定すれば、網膜色素上皮細胞系において変異型 Tead1 を内在性 Tead1 より過剰に発現すればその作用は強く現れると予想された。外来遺伝子の発現誘導は、Tead1 に付加したタグペプチドを検出するウェスタンブロット解析と Tead ファミリーの標的候補遺伝子として知られている増殖因子 CTGF プロモーターのレポーターベクターによる転写活性解析によって確認する系を確立した。実際に、複数の細胞株を樹立したが、外来的に導入した Tead1 の発現量は非常に弱く、薬剤誘導による転写活性の制御も当初予想より小さい結果となった。そのため、同細胞株による網膜色素上皮細胞への分化・増殖過程における Tead1 の機能解析が困難であると判断し、マウス胎児由来の網膜色素上皮細胞を初代培養として調製し、Tead1 を外来的に導入する系の確立を試みた。マウス妊娠18.5日目胎児より、眼組織を摘出し、コラゲナーゼ・ヒアルロニダーゼ処理によって網膜層から視細胞層と脈絡膜・強膜層を除去後、単離した網膜色素上皮細胞層をトリプシン処理してコラーゲン存在下に培養を行うことで同細胞を調製・維持した。レトロウイルスベクターによって Tead1 あるいは同変異体を網膜色素上皮細胞へ導入し、組換え蛋白質の発現が確認され、Tead 標的遺伝子である CTGF, Cyr61 の発現変動を定量 PCR により測定した。その結果、導入した Tead1 による内在性 Tead1 の機能阻害は見られなかったが、Tead1 変異体の導入による標的遺伝子の発現抑制が見出された。さらに、同細胞の増殖能について経日観察したところ、Tead1 変異体の導入によって、その増殖速度が抑制されることが明らかとなった。当初、網膜色素上皮細胞としての機能解析を目的として、細胞間接着因子であるアクチン束・タイトジャンクション構成蛋白質 ZO-1 の発現、集密単層状態における構造変化、タイトジャンクション形成における電気抵抗値を測定する予定であったが、同手法による網膜色素上皮細胞の調製では測定に足る充分量を確保することが困難であった。

4. 研究成果

Tead1 あるいはその変異型 Tead1 発現誘導ベクターを構築し、マウス ES 細胞 EBRTcH3 へ導入後、マーカー選択により目的の ES 細胞株を樹立したが、同 ES 細胞から網膜色素上皮細胞への分化誘導について予想通りの成果が得られなかった。そこで、妊娠 18.5 日目のマウス胎児より網膜色素上皮細胞の初代培養を試み、数日間の維持培養が可能であることを確認した。その培養細胞に対してレトロウイルスにより Tead1 あるいはその変異型 Tead1 を外来的に発現する遺伝子発現ベクターを導入するシステムを確立し、細胞増殖能等の解析を行った。その結果、継続的な培養による網膜色素上皮細胞の増殖は

困難であったが、一過性に Tead1 あるいはその変異型 Tead1 を発現し、同細胞の増殖速度を数日間にわたり測定できる事を確認した。Tead1 の発現は網膜色素上皮細胞の増殖に影響を与えなかったが、変異型 Tead1 の発現は同細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。また、PCNA, Ki67 等の細胞増殖マーカー遺伝子の発現を確認すると同時に、定量 PCR により Tead 標的遺伝子である結合組織増殖因子 CTGF, 分泌蛋白質 Cyr61 の発現を定量する系を確立した。変異型 Tead1 の発現により、網膜色素上皮細胞における CTGF, Cyr61 遺伝子の発現は減少する事が明らかとなった。さらに、マウス胎生期の眼組織形成期における Tead 転写因子、YAP/TAZ 転写共役因子の発現部位を in situ hybridization により解析し、胎児期後期から出生後7日目までの各遺伝子の発現時期を明らかにした。その結果、Tead1, YAP, TAZ は胎生期後期から出生直後までの網膜色素上皮細胞層において継続的に発現が認められたが、出生後にはそれらの発現がほとんど検出されなかった。以上の結果は、マウス胎生期の眼組織の網膜色素上皮細胞において、Tead1, YAP, TAZ の発現が同細胞における Tead 標的遺伝子の発現制御に関与し、その細胞増殖に重要な役割を果たしている事を示唆した。

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1件)

1. Kitagawa M, Era T.

Differentiation of mesodermal cells from pluripotent stem cells.

Int. J. Hematol. 91 巻、査読有り、2010, pp373-383

[学会発表] (計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.hiroshima-u.ac.jp/bimes/p_ebhys6.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 道憲(MICHINORI KITAGAWA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号:30314496

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: