

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301  
研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2011～2013  
課題番号：23592606  
研究課題名(和文) 網膜の発生・維持・疾患における Oct-3/4 遺伝子の役割

研究課題名(英文) Role of Oct3/4 in retinal development and diseases

研究代表者

小阪 美津子 (KOSAKA, MITSUKO)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：50270476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円、(間接経費) 1,260,000 円

研究成果の概要(和文)：網膜の発生・維持・疾患に関わると考えられる Oct3/4 遺伝子の働きを明らかにすることによって、網膜変性疾患や網膜芽腫などの腫瘍の発症機構の一端を解明しようとした。マウス網膜で発現する転写産物タイプ、ヒト網膜芽腫やその他のがん細胞で発現する転写産物タイプを新規同定し、マウスとヒトではそのタイプの使われ方に違いがある事が判明した。この結果は網膜を含めた体性組織における Oct3/4 遺伝子の機能を解明する上で重要な手がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：We tried to investigate roles of Oct3/4 gene during development of normal retina and retinal diseases including tumors. At the first step, we re-investigated Oct3/4 expression in mouse eye. We isolated a novel Oct3/4 variant from normal mouse retina, which is regulated under translational control. Using human retinoblastoma and other carcinoma cell lines, we tested the expression of Oct3/4 transcripts and identified a variety of novel ones. Our results showed the clear different pattern between mice and human Oct3/4 gene variants expression, providing available relevant information for understanding the function of Oct3/4 in somatic tissue.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：網膜 幹細胞 Oct3/4 転写調節因子 再生 がん

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの癌でOct4遺伝子発現が関連する報告が近年多く報告されているが、多くが偽遺伝子との区別がなされず、抗体の非特異性等の問題で真偽が不明で未解決であった。すでに報告された論文30報余りを精査した結果、29報が偽遺伝子と区別できない事が我々の調査で明らかとなり問題視した。我々は、幼若マウス体性組織にOct3/4遺伝子の発現があり複数のvariantが発現していること、また発現細胞が幹細胞様性質を持つことを報告した (J Biol Chem. 2008 Nov ;283(45):30997-1004. doi: 10.1074/jbc.M802992200). 最近の我々独自の知見から、この遺伝子が網膜の発生・疾患に深く関与する可能性が想定され、これらの分子の働きを明らかにするために、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

マウスですでにOct3/4遺伝子の特異的に検出するプライマーの設計に成功しているため、同様の手法を用いて偽遺伝子を確実に排除できる検出方法を確立することを実施する。ヒトのOct4遺伝子産物を網羅的に同定し比較検証を行う。ヒト組織内での発現を確認し、疾患との関連を明らかにする。マウスでは遺伝子発現を人為コントロールできる遺伝子改変動物の活用を試みる。

すでに存在するトランスジェニックマウス (GOF:pOct4-EGPF) マウスを用いて、発現細胞の性状解析を実施する。

## 3. 研究の方法

(1) マウスおよびヒトOct4遺伝子発現を正しく解析できる検出系をRT-PCR法を用いて検出した。

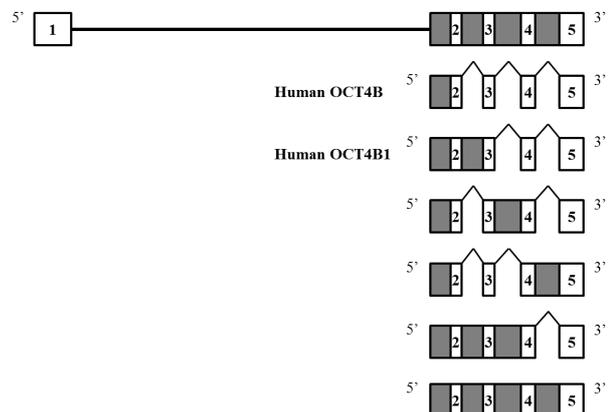
(2) 得られたクローンのDNAシーケンサーにより塩基配列を決定した。新規のクローンは論文投稿時にデータベースに登録予定である。

(3) 各variantをCOS細胞等に過剰発現させ、蛋白質を検出した。この場合適するOct4抗体がないため、N末およびC末にFLAG,MYCタグを付加し、タグ抗体でwestern blot法にて特異的に検出した。

(4) マウスOct3/4ゲノムより調節領域を単離、遺伝子改変に必要なDNAコンストラクトを作成した。

## 4. 研究成果

(1) マウス網膜で発現するOct3/4遺伝子産物の新規variantを含めた網羅的同定：ヒトの癌細胞増殖との関連が注目されているヒトOct4B遺伝子に相当する新規variant (mOct3/4Blong) を同定した。以下の模式図は今回確認したヒトOct4Bの splicing variantの例を示したものである。少なくとも既知の2種類に加えて、新規の4種類が存在することが明らかとなった (下に模式図を示す)。



これらの結果は従来一般的に行われてきたヒトOct4遺伝子解析の検出方法では

不十分であり再調査が必要であることを意味する。

- (2) mOct3/4BlongおよびヒトOct4Bはタンパク質翻訳レベルで抑制されている事を詳細に確認した。
- (3) ヒトOct4遺伝子の特異的検出方法を確立し、ヒト網膜芽細胞種を含む様々な癌細胞株を用いてvariantの同定を実施した。また、それらがコードする蛋白質解析の結果、他の研究者が報告した既知情報 (Stem Cells. 2010 May;28(5):885-93. doi: 10.1002/stem.419.) には誤解釈があることが判明した。
- (4) ヒトとマウスの遺伝子variantの発現様式には明確な差があり、マウスをモデルとして活用する上での問題点だと判明した。以上の結果は、体性組織のがんや変性疾患におけるヒトOct4遺伝子の機能を解析する上での極めて重要な基盤情報として役立つものである。
- (5) 各variantの過剰発現マウスやノックアウトマウスの作成を試みた。これらは様々な問題点の克服が想定外に必要となり期間内には必要な遺伝子コンストラクトの作成を完了させた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Exp Eye Res. 2014 Apr 18;123C:16-26. doi: 10.1016/j.exer.2014.04.007. Immediate differentiation of neuronal cells from stem/progenitor-like cells in the avian iris tissues.

Matsushita T, Fujihara A, Royall L, Kagiwada S, Kosaka M, Araki M.

査読あり

2. Microsc Microanal. 2013 Apr;19(2):406-14. doi: 10.1017/S1431927612014341. Architecture of the subendothelial elastic fibers of small blood vessels and variations in vascular type and size. Shinaoka A, Momota R, Shiratsuchi E, Kosaka M, Kumagishi K, Nakahara R, Naito I, Ohtsuka A. 査読あり
3. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Sep 6;108(36):14962-7. doi: 10.1073/pnas.1100513108. Tsukushi functions as a Wnt signaling inhibitor by competing with Wnt2b for binding to transmembrane protein Frizzled4. Ohta K, Ito A, Kuriyama S, Lupo G, Kosaka M, Ohnuma S, Nakagawa S, Tanaka H. 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

三宅望、高畠あゆむ、水野伸彦、小阪美津子、大塚愛二、体性組織で発現する Oct3/4 遺伝子 variant の機能解析、第 118 回日本解剖学会全国学術集会、2013 年 03 月 28 日、サンポート高松、香川

入江恭平、水野伸彦、小阪美津子、大塚愛二、マウス Oct3/4 遺伝子 variant がコードする Oct3/4C 蛋白質の性状解析、第 118 回日

本解剖学会全国学術集会、2013年03月28日、サンポート高松、香川

宮本朋幸、水野伸彦、大野英治、大塚愛二、小阪美津子、ヒト癌細胞で発現するOct3/4 遺伝子 variant の同定、第118回日本解剖学会全国学術集会、2013年03月29日、サンポート高松、香川

宮本朋幸、小阪美津子、水野伸彦、大野英治、大塚愛二、ヒト Oct4 遺伝子発現解析における問題点の克服、2013年10月19日、鳥取大学医学部、鳥取

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小阪 美津子 (KOSAKA MITSUKO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：50270476

### (2) 研究協力者

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

大塚 愛二 (OHTSUKA AIJI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：50168986