

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462699

研究課題名(和文) エピジェネティクス制御によるマウス網膜再生能の獲得の試み

研究課題名(英文) Attempts to acquire the regenerative ability by use of epigenetic regulation in the damaged mouse retina

研究代表者

須藤 則広 (SUDOU, Norihiro)

東京女子医科大学・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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は哺乳類における網膜再生を目指した基盤研究である。眼の形成に関わる遺伝子群は多くの動物で共通しているが、再生できる動物とそうでないものに分かれる。この原因は遺伝子の機能を調節するエピジェネティクス修飾の違いが原因であると推測し研究を行った。その結果発生期(未成熟)網膜では、損傷後網膜を再生できる能力が存在するが、成熟するにつれてその能力が失われていくことが明らかとなった。さらに再生能の担い手となるミュラー細胞では遺伝子の活性を抑制するエピジェネティクス修飾が強くなっていることも示された。しかし本研究によりこの抑制状態は変えうる可能性があることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to regenerate the retina after injury. Although genes involved in eye development very similar to those of other animals, the regenerative ability of retina differs between mammal and fish. We guessed that one of the cause of inability to regenerate is epigenetic modification that regulate genes expression. We found that immature retina has the regenerative ability of retina after the damage and also found this ability is gradually lost until the retinal maturation. Furthermore, we elucidated that genes of mature Müller cells that is the source of retinal regeneration were strongly repressed by epigenetic modification. Our results indicated the possibility that this repression will be removed.

研究分野：再生

キーワード：再生 網膜 エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

### 【遺伝子発現のエピジェネティクス制御】

近年、クロマチン (DNA がヒストンタンパク質に巻き付いた状態) の修飾が遺伝子発現に重要な役割を果たしていることが示されている。これはエピジェネティクス制御と言われ、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。これまで発生や再生など形態形成における分子機構の研究が盛んに行われてきているが、いまだに十分な解明には至っていない。それは遺伝子発現を直接制御する転写調節因子 (以下、転写因子) の動態のみに注目して研究が行われてきたことが一因であると考えられ、今後エピジェネティクス制御を含めた解析を行うことで、より総合的な分子メカニズムの理解が可能になると考えられる。

### 【網膜発生とヒストン H3K27 のメチル化】

Ezh2 はヒストン H3 の 27 番目のリシン (H3K27) をメチル化する PRC2 複合体の中心因子として働き、修飾領域の転写活性を抑制することで、様々な組織の増殖や分化の制御に関わっている。カエル網膜の発生において Ezh2 は網膜前駆細胞に強く発現し 1) 細胞周期を促進すると同時に神経分化の誘導にも作用する 2)。一方、Jmjd3 は Ezh2 とは逆に H3K27 を脱メチル化することで、そのゲノム領域における転写因子などのアクセスを容易にする。申請者らによるカエル胚を用いた先行研究において、眼で発現している転写因子 7 つを予定上皮割球に共注入すると小さな色素細胞しか誘導されないが、Jmjd3 と共発現させると眼組織を異所的に誘導することができる。この時、Jmjd3 は共注入した転写因子 Pax6 の標的 DNA 配列に対する結合性を促進させていることが明らかとなった (投稿準備中)。これらのデータは H3K27 のメチル化制御が網膜発生に重要な役割を果たしていることを示唆しており、転写因子とエピジェネティック因子の共役に着目した研究の必要性が強く認識される。

【網膜再生能の種差とエピジェネティクス制御】 網膜のグリアであるミュラー細胞は網膜損傷に際して神経を再生する能力があるため、網膜内在性幹細胞として注目されている。しかしこの再生能力には著しい種差があり、魚類では損傷後ミュラー細胞が増殖し、神経細胞に再分化することで網膜を再生するが 3) 哺乳類のミュラー細胞はほとんど増殖せず、損傷された網膜を修復することはない。この種差の理由は不明であるが、眼の発生に関わる転写因子群は魚類からヒトまでほぼ共通しており、ミュラー細胞の特性の種差 (魚類 vs 哺乳類) はエピジェネティクス制御によって説明できるのではないかと推測される。

### 【網膜前駆細胞 vs ミュラー細胞】

マウスのミュラー細胞は上述のように網膜損傷後もほとんど増殖しないが、転写因子の発現は増殖能・多分化能をもつ網膜前駆細胞と極めて類似している 4)。したがって、発生期に網膜前駆細胞がミュラー細胞に分化する過程でエピジェネティックな制御によりその増殖能や神経分化能を失っていくものと推測される。また発生期の未成熟なミュラー細胞は増殖因子に対する反応性を保持するが、分化と共に失っていくことも報告されている 5)。従って未分化な網膜前駆細胞、未成熟ミュラー細胞、成熟ミュラー細胞という細胞系列間で、その再生能とエピジェネティック因子の動態を比較することにより、哺乳類の網膜再生能を制御するエピジェネティック因子を探索することができると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は将来網膜再生を実現するために必要な基盤的知識を得ることにある。(1) 網膜前駆細胞の分化過程における再生可能時期を特定する。(2) エピジェネティクス制御は網膜の再生能の違いの原因となり得ること明らかにする。(3) 適切なエピジェネティック因子および転写因子の導入により、哺乳類ミュラー細胞の再生能の賦活化を検証する。

## 3. 研究の方法

網膜再生のエピジェネティック制御について解析を行う前に、まず正常網膜におけるエピジェネティック因子の発現及びヒストン修飾の状態を明らかにする必要がある。これまで個々の因子について解析が行われた例はあるが網羅的に調べられた例はない。

【実験】 発生期網膜におけるヒストンメチル化・脱メチル化因子の mRNA の局在を *in situ hybridization* 法により解析を行った。

【実験】 発生期網膜におけるヒストンメチル化修飾の変化を蛍光抗体染色法により解析を行った。解析に用いた抗体は主に転写制御に関わることが知られているヒストン H3K4、H3K9、H3K27、H3K36、H4K20 のそれぞれモノメチル (me1)・ジメチル (me2)・トリメチル (me3) である。【実験】 本研究では哺乳類ミュラー細胞が網膜前駆細胞のように増殖できない理由を細胞のエピジェネティックな修飾の違いによるものであると推測している。そこで網膜前駆細胞とミュラー細胞のヒストンメチル化修飾の違いを解析した。

【実験】 細胞培養系に注目し増殖中のミュラー細胞のヒストン修飾の解析を行った。

【実験】 本実験では、視細胞変性後に視細胞を再生する能力を網膜前駆細胞、未成熟ミュラー細胞、成熟ミュラー細胞の間で比較することを計画した。このために、任意の時期に視細胞変性を誘導できる動物モデルが必要である。図 1 に示すように時期特異的視細胞変性マウスは視細胞 (桿体、錐体細胞) 特

異的に発現する *crx* 遺伝子のプロモーター下に CreERT2 酵素遺伝子を導入したマウス（大阪大学古川貴久博士より供与）とユビキタスプロモーター（ROSA）下に flox-stop カセットおよびジフテリア毒素（DT-A）遺伝子を導入したマウス（ジャクソン研究所より購入）を交配して作製した。視細胞において発現する Cre リコンビナーゼはタモキシフェン投与によりジフテリア毒素が発現する。ジフテリア毒素が翻訳阻害を引き起こすことで、視細胞が変性（細胞死）する。

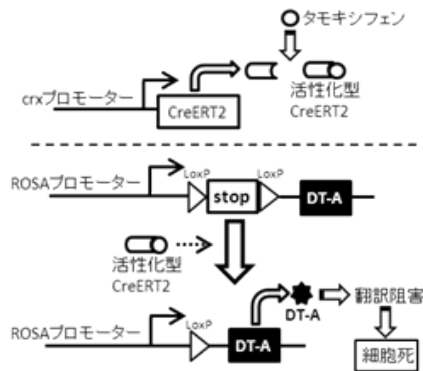


図 1

#### 4. 研究成果

【実験】25 個のヒストン脱メチル化因子と 3 つのヒストンメチル化因子の配列をクローニングし in situ hybridization 法により mRNA の発現を解析した。その結果ヒストン脱メチル化因子 KDM1A、1B、2A、2B、3A、3B、4A~D、5A~D、6A、6B、7A~C、N066 およびヒストンメチル化因子 G9a、SETDB、SUV39H1 がそれぞれ程度差は見られるが広く胎生初期（胎生 12-14 日）の網膜で発現していることが明らかとなった。これらの結果から網膜神経細胞の分化開始時にエピジェネティック修飾が大きくかわっている可能性が示唆された。

【実験】マウス網膜の発生過程（胎生 12、14、18 日、生後 4、10 日及び 5 週齢（成体））におけるヒストンメチル化修飾の変遷を明らかにした。網膜全体における概要を以下に示す。ヒストン H3K4me1、2、3 の修飾は活性化している遺伝子のエンハンサーやプロモーターで見られる。網膜前駆細胞から分化を開始した細胞群（胎生 14 日の内神経芽細胞層）において最も強い修飾を示すが、分化の進行と共に修飾レベルは徐々に減少する。一部の網膜神経細胞では強い修飾が維持されている。一方で遺伝子の抑制に関わる修飾（H3K9me1、2、3 及び H3K27me1、2、3）は大きく異なる修飾パターンを示した。H3K9me1、2、3 は発生初期から成体に至るまで常時維持されているが、特に H3K9me1 は胎生 14 日の内神経芽細胞層で一時的に強くなり、その後減少する。しかし成体の内顆粒層（網膜神経細胞の核が集まる層）の一部の細胞では強く修飾が維持されている。H3K9me2 は神経細胞の分化と関わりなく、各細胞均一に低いレベルで修飾が維持されていた。H3K9me3 は

H3K9me1 同様に胎生 14 日の内神経芽細胞層で一時的に強くなるが、その後徐々に弱くなり、成体網膜では特に外顆粒層（視細胞核の存在する層）の視細胞核の中心部で強く染色されるようになる。次に H3K27 のメチル化修飾は網膜の分化が進むにつれて修飾が強くなる傾向が見られた。特に H3K27me1、3 は胎生 12 日ではほとんど検出されないが、成体網膜の内顆粒層では弱～中程度の修飾が見られた。H3K27me2 の修飾は胎生期から維持されるが、成体ではほぼすべての細胞で核膜内部を裏打ちするよう見られる。H3K36me1 のヒストン修飾の機能は明らかになっていない。いずれの発生段階でも低いレベルで染色された。初期では核内の一部領域に偏って染色されるが、成体に近づくにつれ核膜内を裏打ちするような染色像を示す。H3K36me2 は複製フォークの修正に関わることが知られる。これも H3K36me1 同様に発生初期では核内の一部領域に偏って染色されるが、次第に修飾が強くなり成体の内顆粒層では多くの細胞で修飾が維持される。外顆粒層の視細胞では H3K36me1 同様に核膜内を裏打ちするような染色像を示した。H3K36me3 は活性化遺伝子の遺伝子配列を修飾していることが知られる。その意味で H3K4 のメチル化と同様に胎生 14 日の内神経芽細胞層で一時的に強くなる。成体に至っても修飾が比較的強く維持されており、核膜内を裏打ちするような染色を示す。H4K20me1 は活性化遺伝子のプロモーターでの修飾が知られ、H4K20me2 は細胞周期との関連が報告されている。両者は類似した変化を示し、胎生期において一部の細胞においてのみ染色が見られ、H3K36me1、2 同様に核内において一部領域に偏っているように見られる。しかし生後にはいずれの細胞においても修飾が見られるようになる。H4K20me3 の修飾は H3K4 のメチル化と同様に胎生 14 日の内神経芽細胞層で一時的に強くなり、成体に至っても内顆粒層で修飾が強く維持される。また H4K20me1、2、3 はいずれも外顆粒層の視細胞核の核内を裏打ちするような染色を示した。

これら結果から発生期網膜におけるヒストンメチル化修飾の程度及びクロマチンの核内配置がダイナミックに変化していることが明らかとなった。またヒストンのメチル化修飾が単なる転写の指標であるならば全ての網膜神経細胞が同様の修飾状態を示すと考えられるが、実際にはそうではないようである。分化後の機能やその維持にも関わっていることが推測される。

【実験】網膜前駆細胞とミュラー細胞におけるヒストンメチル化修飾の比較を行った（表 1）。網膜前駆細胞では遺伝子の活性化に関わるヒストン H3K4me1、2、3 の修飾が強く、抑制に関わる修飾 H3K27me1、2、3 は非常に弱いまたはほとんど検出されないレベルであった。一方ミュラー細胞では H3K4me1、2、3 の修飾が弱く、H3K27me1、3 の修飾が強い

ことが分かった。また抑制に関わる H3K9me1、3 もミューラー細胞で非常に強く修飾が見られた。H3K9me2 および H3K36me1 はいずれの細胞も大きな変化はなく低いレベルで維持されている。H3K36me2、3 は網膜前駆細胞では比較的強く染色が見られるが、ミューラー細胞では低くなっている。H4K20me1、2 は両細胞とも中程度の修飾を示すが、H4K20me3 はミューラー細胞において特に強く染色されていた。

	網膜前駆細胞	ミューラー細胞	作用	
H3K4me1	中程度	低	活性化	
H3K4me2	中程度	低	活性化	
H3K4me3	低	中程度	活性化	
H3K9me1	中程度	高	抑制	
H3K9me2	低	低	抑制	
H3K9me3	低	高	抑制	
H3K27me1	無し	低	抑制	
H3K27me2	低	中程度	抑制	
H3K27me3	ほとんど無	低	抑制	
H3K36me1	低	低	—	
H3K36me2	低	中程度	活性化	
H3K36me3	中程度	低	活性化	
H4K20me1	低	中程度	活性化	
H4K20me2	低	中程度	—	
H4K20me3	低	中程度	高	抑制

(表1)

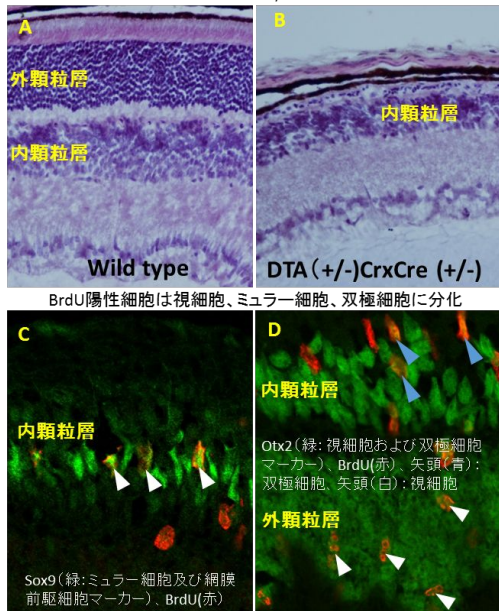
まとめると網膜前駆細胞では遺伝子の活性化に関わるヒストン修飾が強く、抑制に関わる修飾は低い。一方でミューラー細胞では活性化に関わる修飾が低く、遺伝子の抑制に関わる修飾が強い。従って網膜前駆細胞とミューラー細胞で明らかにヒストン修飾が大きく異なる。これらの結果は本研究の仮説を支持するものといえ、さらに哺乳動物においてミューラー細胞による網膜再生が起こらないエピジェネティックな原因の一端を示したものとと言える。

【実験】網膜前駆細胞とミューラー細胞のヒストン修飾の比較より、増殖中のミューラー細胞ではどのようなヒストン修飾状態にあるのか新たな疑問が生じた。そこでマウス網膜の初代培養系を用いて増殖中のミューラー細胞におけるヒストン修飾について解析を行った。網膜は生後9日、14日、3週齢(成体)マウスを用い、S期の細胞周期マーカーであるBrdUを用いて細胞周期に入っている細胞を確認した。結果、いずれのサンプル群でも細胞周期に入る細胞が存在することが分かった。増殖中の細胞では遺伝子の抑制に関わるH3K9me3及びH3K27me2、3の修飾が大きく減少し、一方で遺伝子の活性化に関わるH3K4me2の修飾レベルには大きな変化は見られなかった。では細胞周期に入った細胞が何の細胞であるのか検討すると、生後9日の網膜では後期の網膜前駆細胞が存在する可能性が考えられるが、生後14日(未成熟ミューラー細胞)並びに3週齢(成熟ミューラー細胞)では明らかにミューラー細胞が細胞周期に再進入したと考えられる。これらの結果からマウスミューラー細胞は分化後に遺伝子の抑制に関わるヒストンメチル化修飾が強くなるが、それらは細胞環境の変化により取り除かれることで細胞周期に再進入することが可能であることを示したとと言える。さらに驚く

べきことに3週齢マウスにおいても細胞周期に再進入した点である。一般的に生体内で成熟したミューラー細胞が細胞周期に入ることは無いと考えられている。しかし培養系においては成熟ミューラー細胞でも細胞周期に再進入するコンピテンスが維持されていることが明らかとなった。従ってミューラー細胞のヒストン修飾を変化させる原因因子の解明に大きな進展をもたらす有用な手段を得たといえる。

【実験】時期特異的視細胞変性実験を行う為にDTA+/-、CrxCre+/-マウスにおいてタモキシフェン投与し、視細胞変性(細胞死)を誘導することが確認された(図2-A,B)。このトランスジェニックマウスを用いて生直後から順にタモキシフェンを投与し、視細胞変性後の再生可能時期について検討を行った。結果、生後3日までにタモキシフェン投与を行ったDTA+/-、CrxCre+/-マウスでは細胞周期マーカーであるBrdUの取り込みが野生型のコントロールマウスに比べて多く見られた。生後4日目以降に投与したマウスでは視細胞変性後のBrdUの取り込みは見られなかった。さらに生後1日のマウスにタモキシフェン投与し、5日後にBrdUを投与、生後20日目で固定したマウスで、BrdU陽性細胞が視細胞、ミューラー細胞、双極細胞の3種に分化していることが明らかとなった(図2-C,D)。しかしタモキシフェン投与後細胞死が確認されるまでに2日程度かかることから、生後3日に誘導をかけたマウスは生後5日ごろに細胞死が見られることになる。この時期には後期網膜前駆細胞又は未成熟ミューラー細胞が存在しており、どちらの細胞が細胞死に反応して細胞周期に再進入したかは確認できていない。

タモキシフェン投与6日目(生後15日) 外顆粒層(視細胞核)の消失



(図2)

これらの結果をまとめると、分化中の網膜は損傷に反応し、細胞周期に再進入することで視細胞を再生させることができる。しかしそ

の再生能は分化と共に（生後6日以降）失われたと考えられる。これらの知見はマウスの網膜再生可能時期の存在を初めて明らかにしたものである。

これまでの報告から、網膜損傷と同時にEGFなどの成長因子を眼球に直接投与し、再生させる例6)が報告されているが、わずかなアマクリン細胞しか再生しない。また生後10日のマウスで網膜損傷と同時にミユラー細胞に転写因子Ascl1を発現させると視細胞を再生できることが報告されている7)。本研究では生後4-5日であれば何の投与もなく自己再生する可能性を示した。以上の結果から生後4-5と10日の間に一段階再生能力が失われ、さらにAscl1を成体網膜で発現させても再生が行わないことから7)、生後10日から成体に至る間でさらに再生能が失われていくと考えられる。その原因についてUekiらは、成体マウスのミユラー細胞ではproneural geneへのchromatin accessibilityが減少していることを示唆する結果を示している7)。従って成熟ミユラー細胞のエピジェネティック修飾を変える因子を同定し、修飾を変えることで成体網膜の再生を引き起こす可能性が見いだせると考えられる。

#### 〔引用文献〕

- 1) Kawaguchi et al., The International Journal of Developmental Biology, 56巻、295 - 300 (2012)
- 2) Aloia et al., Development, 140(12):2525-34 (2013)
- 3) Blake V. Fausett, Daniel Goldman, Journal of Neuroscience 26巻、6303-6313 (2006)
- 4) Blackshaw et al., PLOS Biology, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020247>(2004)
- 5) Close et al., Glia, 54巻、94-104(2006)
- 6) Karl et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 105巻、19508-19513 (2008)
- 7) Yumi Ueki et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 112巻、13717-13722 (2015)

#### 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)

Reeshan ul Quraish, Norihiro Sudou, Kaori Nomura-Komoike, Fumi Sato, Hiroki Fujieda, p27KIP1 loss promotes proliferation and phagocytosis but prevents epithelial-mesenchymal transition in RPE cells after photoreceptor damage, Molecular vision, 査読有、22巻、2016、1103 - 1121、<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5040454/>

Norihiro Sudou, Garcés-Vásconez Andrés, López-Latorre María A, Masanori Taira, Del Pino Eugenia M, Transcription factors Mix1 and VegT, relocalization of vegt mRNA, and conserved endoderm and dorsal specification in frogs, Proc Natl Acad Sci U S A, 査読有、113巻、2016、5628 - 5633、DOI: 10.1073/pnas.1605547113

Yuuri Yasuoka, Yutaka Suzuki, Shuji Takahashi, Haruka Someya, Norihiro Sudou, Yoshikazu Haramoto, Ken W. Cho, Makoto Asashima, Sumio Sugan, Masanori Taira, Nature Communications, 査読有、5巻、2014、4322、DOI: 10.1038/ncomms5322

#### 〔学会発表〕(計 5件)

須藤則広、齋藤文典、藤枝弘樹、マウス網膜前駆細胞とミユラー細胞におけるヒストンメチル化修飾の比較解析、第122回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017年3月29日、長崎大学医学部(長崎県長崎市)

Norihiro Sudou, Reeshan ul Quraish, Kaori Nomura-Komoike, Hiroki Fujieda, p27 BEHAVES AS A REGULATOR OF PHAGOCYTOSIS AND EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN RPE CELLS AFTER PHOTORECEPTER DAMAGE, XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research, 2016年9月27日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

須藤則広、齋藤文典、藤枝弘樹、マウス網膜発生過程におけるヒストンメチル化修飾の解析、第121回日本解剖学会・全国学術集会、2016年3月30日、ビックパレット福島(福島県郡山市)

須藤則広、エピジェネティクス制御による組織誘導と再生能獲得への試み、第121回日本解剖学会・全国学術集会、2016年3月28日、ビックパレット福島(福島県郡山市)

Norihiro Sudou, Fuminori Saitoh, Hiroki Fijieda, Expression of epigenetic factors in the developing mouse retina, 第120回日本解剖学会・全国学術集会、2015年3月22日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

須藤則広 (SUDOU, Norihiro)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 80646216