

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861477

研究課題名(和文)ダイレクトリプログラミングによる網膜神経節細胞の次世代分化誘導法の確立

研究課題名(英文)Direct conversion of mouse fibroblast into functional retinal ganglion-like cell by novel combination factors

研究代表者

橘 晃弘(Tachibana, Akihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・リサーチアソシエイト

研究者番号：80630871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：多くの細胞が繊維芽細胞から多能性の経路を通らずに、直接細胞転換により誘導されている。神経では、様々なサブタイプをが、直接誘導されている。そこで、CNSのモデルである網膜の神経、中でも網膜神経節細胞が直接誘導できるかを証明した。繊維芽細胞から誘導後3日目で神経細胞様の細胞が観察され、作製された神経様細胞は、神経細胞固有の機能であるアクションポテンシャルが観察され、また、単一細胞レベルでの遺伝子発現解析においても、in vivoの網膜神経節細胞と同等の発現を示していた。これらによって作成された細胞は、緑内障のモデルにも応用可能であり、細胞移植や、薬物スクリーニングにおいて、有用な細胞である。

研究成果の概要(英文)：The vertebrate retina is a special model of central nervous system (CNS) such as development, structure, and function. Retinal ganglion cells death lead to loss of vision in glaucoma. Recent studies many type of cells could be induced from somatic cells, particularly in CNS, many subtype neurons and glia can be induced from mouse and human somatic cell by combination of lineage specific transcription factors. Here we show that the forced expression of retinal ganglion cell (RGC) specific transcription factors which are included DNA binding site is sufficient to convert mouse fibroblast into functional retinal ganglion like cells. These induced retinal ganglion cells (iRGs) displayed neuronal morphology and expressed retinal ganglion signature genes. Moreover iRGs were able to generation action potentials. These iRG cells might could be used for new glaucoma research, such as drug screening and transplantation and to understanding mechanism of glaucoma,

研究分野：細胞工学

キーワード：ダイレクトリプログラム 神経 一細胞解析 発生学 眼科学 再生医療

1. 研究開始当初の背景

(1) 長年にわたり、発生のメカニズムや個々の遺伝子の働きが解明されてきたが、細胞や組織で働いているネットワークは想像以上に複雑で、細胞間のコミュニケーション、環境など様々な要因に対しても変化し、多くの謎が秘められている。目的の細胞を人工的に試験管内で作出す方法として a) ES 細胞(胚性多能性幹細胞)や iPS 細胞(誘導多能性幹細胞)を使った自然発生的分化誘導(differentiation)、b) 発生学上近系統の細胞に外来遺伝子導入等を用いた分化誘導(trans-differentiation)、c) 繊維芽細胞などの体細胞に外来遺伝子導入等を用いた分化誘導(direct reprogramming)、d) ES 細胞(胚性多能性幹細胞)や iPS(誘導多能性幹細胞)に外来遺伝子導入等を用いた分化誘導(direct differentiation)が挙げられる

(2) 遺伝子導入により、ある細胞を別の細胞へと転換するといった研究は古典的に行われてきた。古くは、繊維芽細胞に転写因子 MyoD を導入し筋細胞への細胞転換が報告されているまた、その後の研究により、体細胞に転写因子 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 を導入し ES 細胞(胚性多能性幹細胞)と同程度の性質を持った iPS 細胞(誘導多能性幹細胞)が樹立されることが報告された。この報告の以前までは、ある細胞の一つもしくは、二つの遺伝子導入により、細胞を転換させるといった報告がされてきたが、iPS 樹立の方法論により、細胞を大きく転換させるためには複数個の遺伝子導入が必要であることが予測された。

この方法論に基づき、近年、遺伝子導入による目的細胞の直接的創出技術(ダイレクトリプログラミング)は、次世代分化誘導法として注目され、マウスのみならず、ヒトにおいても数多くの報告がされており、心筋細胞、肝臓細胞、造血幹細胞などから、神経系では、神経幹細胞、神経細胞、オリゴデンドロサイト、アストロサイトなどのグリア細胞に至るまで、幅広く報告されている。さらに、眼の領域においては、繊維芽細胞から網膜錐体細胞への転換、網膜色素上皮細胞への転換、ならびに、皮膚上皮細胞からの角膜上皮幹細胞への転換の報告が挙げられる。そこで、ベクトルをどの方向に向けるかにより、目的の細胞を再構築できることが示唆され、本研究において、網膜の神経節細胞に着目し、ダイレクトリプログラミングにより、短時間で、作製が可能かどうかを検証した。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、次世代分化誘導法であるダイレクトリプログラミングを用いた、マウス繊維芽細胞からの、網膜神経節細胞の創出における リプログラミング・ファクターの同定 網羅的遺伝子発現解析による、神経様細胞作成に伴う遺伝子ネットワークの解明 電気生理学的手法を用いた機能解析ならびに、ヒトへの応用に向け、試験管内

で人為的に遺伝子ネットワークを再構築することにより、効率的な細胞作製を目的としている。本研究の確立は、細胞転換における基盤技術となり、再生医療・薬物スクリーニングへの応用により、緑内障の革新的な治療効果が期待でき、眼科学、神経学分野への大きな波及効果が予測される

3. 研究の方法

(1) スクリーニングシステムの樹立

レポーター遺伝子を用いて繊維芽細胞が網膜神経節細胞に転換した時に赤色蛍光タンパクが発現するような繊維芽細胞を樹立する。

(2) リプログラミングファクターのスクリーニング

上記で樹立した繊維芽細胞を用いて、網膜神経節細胞の発生や分化に関わる重要な転写因子群の中から、網膜神経節細胞に細胞転換させるための転写因子を選び出す。

(3) 単一細胞レベルでの遺伝子発現解析。

元の繊維芽細胞と誘導網膜神経節細胞、ならびに、生体内の網膜神経節細胞に関して、単一遺伝子発現解析を行う。

(4) 電気生理学的手法を用いた、機能解析

パッチクランプ法により、ナトリウム、カルシウム、カリウムチャネルを測定し、活動電位を測る。また、薬剤阻害実験を行う。

(5) 成熟繊維芽細胞からの人工誘導網膜神経節細胞の作製。

アダルトマウス繊維芽細胞からも、同じような細胞が作成されるかの検証を行う。

4. 研究成果

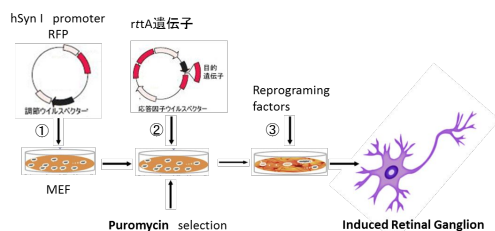
(1) スクリーニングシステムの樹立

通常マウスでのダイレクトリプログラミングの研究分野において、目的の細胞を特異的に光らせるために、目的の細胞で特異的に発現している遺伝子の下流に直接緑色蛍光タンパク遺伝子(green fluorescent protein(GFP))もしくは、赤色蛍光タンパク遺伝子(red fluorescent protein(RFP))を組み込んだノックインマウスを使用するか、目的の細胞で特異的に発現している遺伝子のプロモーターの下流に GFP もしくは、RFP を組み込んだトランスジェニックマウスを作製しそのマウスから繊維芽細胞を樹立して使用する。

しかし、ダイレクトリプログラミングを広く一般的なものにするため、さらにはヒト細胞での応用を見込んで、これまでに上記 と同等の繊維芽細胞を、つまりは本研究の目的細胞である網膜神経節細胞が光るマウスから樹立した繊維芽細胞と同等の細胞を樹立するために、報告をもとに試験管内で Synapsin1 プロモーターの下流に RFP を組み込んだレンチウイルスを市販の胚性繊維芽細胞(mouse embryo fibroblast(MEF))に感染させ樹立した。(下図)さらに、将来的に単一細胞での遺伝子発現の網羅的解析を見込んで、外来遺伝子であるリプログラミングファクターをド

キシサイクリンの存在下・非存在下により発現のオン・オフを調節できるような細胞を樹立する必要があり、このためテトラサイクリンシステムを取り入れた。

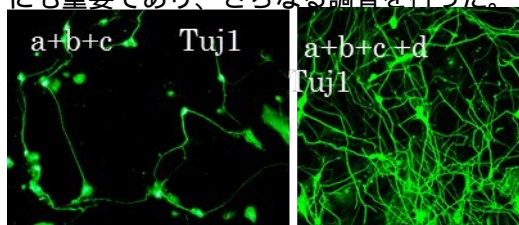
テトラサイクリン誘導発現系で、目的の外来遺伝子を発現させるためには、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (Reverse Tetracycline Trans Activator (rttA)) の発現が必要であり、この遺伝子も CMV プロモーターの下流に IRES-Puro と共に組み込み、レンチウイルスにより感染させピューロマイシン選択により細胞を樹立した。これらにより、Synapsin1 promoter-RFP のマウスと Rosa26-rttA のマウスを掛け合わせた、二重トランスジェニックマウスから樹立した繊維芽細胞と同等の細胞株を試験管内で樹立した。



(2) リプログラミングファクターのスクリーニング

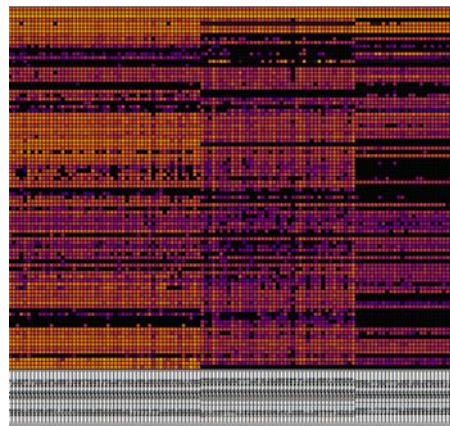
まず網膜神経節細胞の発生や分化において、重要な転写因子をテトラサイクリン発現系レンチウイルスベクター (Tet-o-gene) に組み込み、ウイルスを作製した。それらの遺伝子群の中から、最も重要だと思われる3因子 (a,b,c) を上記で樹立した MEF に導入し、ドキシサイクリン含有の神経用培地で培養したところ、わずかな細胞が RFP を発現し、形態的にも神経様であった (下図、左)。しかしながら、細胞転換の効率が低く形態的にも不完全であったため、他の候補遺伝子から、4番目の遺伝子を決定したところ、dの遺伝子を加えた時に最も効率が良く、誘導後3日でレポーター遺伝子の蛍光がみられ、日数と共に、蛍光が増加し、形態も変化していった。誘導後14日が経過すると、神経軸索も長く複雑な形態を示した。(下図、右) さらに、免疫染色においては、成熟神経マーカーである、Map2, NeuN, NFL も観察された。

スクリーニングによって得られた4つの遺伝子はリプログラミングファクターとして、未だ報告がなく、さらに得られた細胞が網膜神経節細胞であることが証明されれば、学術的にも重要であり、さらなる調査を行った。

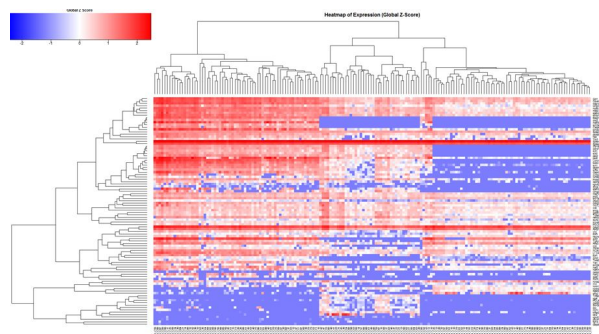


(3) 単一細胞レベルでの遺伝子発現解析

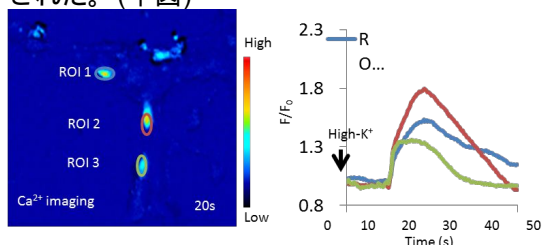
網膜神経節細胞に関わる遺伝子 96 個に対して、上記で得られた (induced retinal ganglion: iRG) 細胞、元の繊維芽細胞 (fibroblast: FN)、目的の生体内の網膜神経節細胞 (mouse retinal ganglion: mRG) において一細胞での遺伝子発現解析を行う上で、細胞を純化する必要があり、iRG に関しては誘導後 21 日目で RFP の蛍光を元に FACS により純化した。繊維芽細胞は神経用培地で 21 日間培養し、そのまま使用し、目的の生体内の網膜神経節細胞の純化においては、p5 のマウスから網膜を取り出し、papain で細胞をバラバラにしたのち、immuno panning と Thy1 (CD90) の表面抗原標識のマグネットビーズにより純化を行った。純化した細胞を Fluidigm 社の c1 システムを用いて、マイクロ流路デバイスにより、シングルセルに分画し、個々の細胞から、RNA 抽出、cDNA 合成、pre-amplification の順に反応を行った。それぞれ得られた cDNA をテンプレートとし、BioMark のダイナミクスアレイにより、定量的 PCR を行った。(一部データを抜粋: 下図) iRG mRG FB



得られた遺伝子発現のデータを統計解析ソフト R を使った解析により、クラスタリングを行い、iRG が生体網膜神経節細胞と同等の発現パターンを示しているかどうかを調査した結果、発現パターンは似ているものの iRG においては過剰に遺伝子発現を行っているため、発現量が全体的に高かったため、ドキシサイクリン非存在下で培養を行い、外来遺伝子をオフにしたサンプルも加えて解析を行っている。

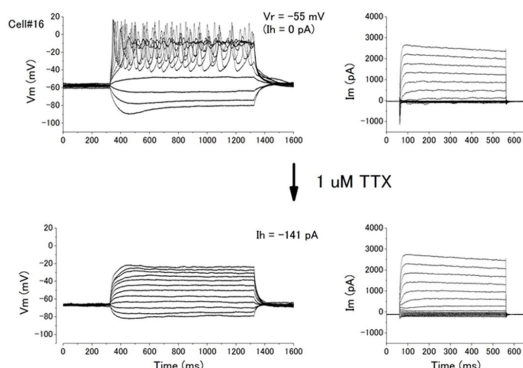


(4) 電気生理学的手法を用いた、機能解析 iRG の機能を確認するために、まず、誘導後 21 日目の細胞に対して、カルシウムインジケータを用いてカルシウムイメージングを行ったところ、神経細胞とよく似たカリウムの刺激によるカルシウムの隆起が観察された。(下図)



その後、パッチクランプ法により、電気的刺激にゆる反応を確認したところ、voltage clamp mode では Na/k チャネルの反応は見られたものの、current clamp mode では活動電位であるアクションポテンシャルは、あまり観察されず、機能としては未成熟な神経細胞であることが示唆された。

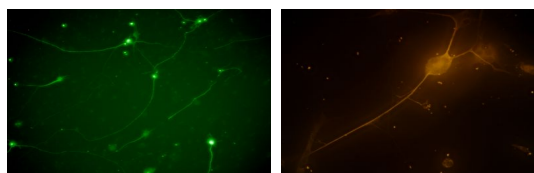
そこで、機能を成熟させるために、アストロサイトとの共培養を行うことにし、誘導後 14 日目の iRG を FACS で純化し、アストロサイトと 7 日間共培養を行い、同様にパッチクランプを行った結果、成熟した機能が観察された。さらに、Na/K チャネルの特異的阻害剤であるテトラドトキシンによる薬理実験を行いデータとしての裏付けを行った。(下図)



一方、シナプスの形成を証明するための調査も行ったが、興奮性シナプス後電流や、抑制性シナプス後電流の応答は見られなかったため、シナプスを形成するには、さらなる日数が必要だと思われた。

(5) 成熟繊維芽細胞からの人工誘導網膜神経節細胞の作製。

アダルトマウスの繊維が細部 (mouse dermal adult fibroblast) に MEF 実験と同様に CMV-M2rttA IRES Puro と網膜神経節細胞に細胞転換させるための転写因子 4 つをレンチウイルスにより導入し、ドキシサイクリン含有の神経用培地で培養したところ、MEF 実験と比べ効率は落ちるものの、神経細胞様の細胞が観察された。(下図)



TUJ1 positive

Map2 positive

さらに、すでに induced neuron で報告されている、低分子化合物を用いて、細胞の転換の効率が高くなるかを調査したが、際立った変化は見られなかった。すなわち、今回同定した転写因子群が新規のものであり、すでに報告されている転写因子 *Ascl1* を使った induced neuron とは、細胞転換におけるメカニズムが異なると予想された。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋 晃弘 (Tachibana, Akihiro)

国立研究開発法人理化学研究所

多細胞システム形成研究センター

リサーチアソシエイト

研究者番号: 80630871