

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15802

研究課題名（和文）筋収縮関連遺伝子群を利用した上皮組織の厚み制御機構の研究

研究課題名（英文）Investigation of regulatory mechanism of epithelial thickness through muscle contraction-related genes

研究代表者

瀬戸 裕介（Yusuke, Seto）

京都大学・医生物学研究所・助教

研究者番号：40738481

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：上皮組織の厚みは、組織が機能するために適切に制御される必要があるが、その制御機構には未解明な点が多い。本研究では、眼組織の発生過程において網膜色素上皮が薄いシート状に変形する際に一過的に筋収縮に関連する遺伝子を発現することに着目し、その発現制御機構と遺伝子の機能について解析を行なった。その結果、筋収縮関連遺伝子Taglnの発現が、組織の変形・歪みによって誘導され、またTagln自身も組織の変形を通じた上皮の厚み制御に積極的に関与している可能性を示唆する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、いまだ未解明な点が多い上皮組織の厚み制御機構について、筋収縮に関連する遺伝子が寄与している可能性を検証した。本研究の成果から、細胞が自身の本来あるべき形とずれが起きている際に、筋収縮関連遺伝子はその修正のために誘導され、結果として上皮組織の厚みが制御されている可能性が示唆された。上皮組織の厚み制御機構について、そのような新たなメカニズムの存在可能性を示したことに本研究の学術的な意義がある。

研究成果の概要（英文）：Although proper regulation of the thickness of epithelial tissue is important for its proper function, the underlying mechanisms remain largely unknown. I focused on the transient expression of muscle contraction-related genes during the thin sheet-like deformation of retinal pigment epithelium in developing eye tissue and analyzed regulatory mechanisms and function of those genes. Experimental results suggested the possibility that the expression of muscle contraction-related gene, Tagln, is induced by distortion of cells associated with deformation of the developing tissue and Tagln itself is actively involved the regulation of epithelial thickness through tissue deformation.

研究分野：発生生物学

キーワード：網膜色素上皮 上皮の厚み 筋収縮関連遺伝子

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

生体内において、上皮組織の厚みは均一ではなく、場所ごとに大きく異なっている。発生過程における上皮組織の厚みの適切な制御は、組織の形態形成とそれを通じた機能獲得に欠かすことができない。しかしながら、上皮組織の厚みの制御に関わる分子メカニズムの詳細については未だ知見が少ないのが現状である。上皮組織の厚みを適切に制御するメカニズムを解明することは、生体組織の発生の仕組みのさらなる理解につながるのほもとより、将来的には再生医療に向けた組織作製などにも応用できる可能性がある。

ヒトやマウスの眼組織は、光シグナルを受容する網膜とそれを裏打ちする網膜色素上皮 (RPE) からなる。網膜と RPE はもともと眼胞と呼ばれる共通の神経上皮組織に由来しており、その先端部が網膜に分化する際に組織の内側へと陥入することで、RPE が網膜を包み込む形を作る。このとき、RPE は薄いシート状に変形することで網膜全体を包み込み、機能的な眼組織の形成を可能にしている。この RPE の厚みの変化を制御する分子メカニズムは明らかにされていない。研究代表者はこれまでの研究で、マウス胎児の眼組織および ES 細胞由来の眼オルガノイドにおいて、RPE の厚みが薄くなる際に、一過的に筋収縮に関連する遺伝子群の発現が上昇していることを見出した。しかしながら、この筋収縮関連遺伝子群が、RPE の厚みの制御に関与しているのか、また、その発現がどのようにして制御されているのかについては分かっていない。

2. 研究の目的

本研究は、RPE を対象に、その厚みが増加する際に一過的に発現している筋収縮関連遺伝子群が、実際に上皮の厚みの制御に関与しているのかを明らかにすることを目的としている。その解明のために、筋収縮関連遺伝子の発現を制御しているシグナルの同定と、その上皮の厚み制御への影響を解析するための各研究テーマを遂行した。

3. 研究の方法

(1) マウス ES 細胞由来の眼組織オルガノイドに対する阻害剤添加実験

研究代表者は、これまでの研究でマウス ES 細胞由来の眼組織オルガノイドにおいて、RPE が薄くなる過程で筋収縮関連遺伝子が発現することを明らかにした。そこで、その中でも特に発現量の高かった *Tagln* 遺伝子に着目し、その蛍光ノックインレポーター細胞を作製することにより、発現を可視化できる実験系を作製した。その実験系に対し、様々なシグナルの阻害剤などを添加することにより、*Tagln* の発現制御に関わるシグナル因子の同定を試みた。

(2) マウス頭部器官培養系に対する阻害剤添加実験

実際の組織においても *Tagln* の発現誘導に関わる因子を同定するために、マウス頭部の器官培養系を作製し、それに対し、阻害剤の添加実験を試みた。研究代表者は、実際のマウス胚においては、胎生 10.5 日前後で *Tagln* の発現が一過的に上昇することを見出していたため、胎生 9.5 日から 24 時間以上の培養を目指し、系の改良を試みた。阻害剤の有無のもと、24 時間培養した組織に対して凍結切片を作製し、免疫染色により *Tagln* の発現解析を行なった。

(3) 眼組織細胞の分散培養系における *Tagln* の発現解析

細胞の形態的な変化が *Tagln* の発現に与える影響を解析するために、*Tagln* を発現していないマウス ES 細胞由来眼オルガノイドの細胞をトリプシン処理により単離・分散し、培養ディッシュ上で培養し、24 時間後の *Tagln* の発現を解析した。

(4) ヒト ES 細胞由来眼組織オルガノイドにおける TAGLN の発現条件の探索

マウス ES 細胞由来の眼組織オルガノイドとヒト ES 細胞由来の眼組織オルガノイドは、その分化誘導方法が異なるが、おそらくそれが原因となり、ヒト ES 細胞由来の眼組織オルガノイドにおいては、マウス由来のもののように、TAGLN を強く発現する領域がほとんど得られない。そこで、従来のヒト ES 細胞からの眼組織オルガノイド誘導法に改変を加え、TAGLN の発現する条件を探索した。

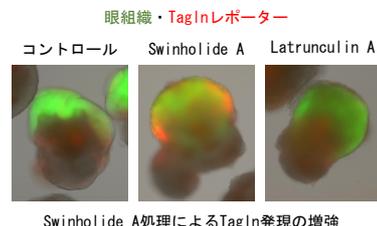
(5) 眼組織オルガノイドへのエレクトロポレーションによる TAGLN の機能解析

TAGLN が本来ほとんど発現しないヒト ES 細胞由来の網膜のオルガノイドに対し、CAG プロモーターの下流で TAGLN を発現するプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入したオルガノイドをインキュベーター一体型の二光子顕微鏡で継時的に観察することにより、組織の形態に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

(1) マウス ES 細胞由来の眼オルガノイドに対する阻害剤添加実験

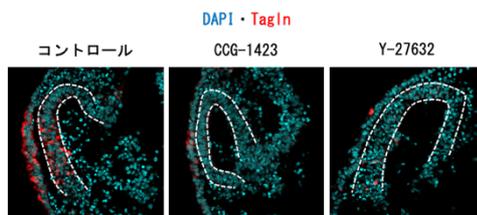
Tagln の蛍光ノックインレポーター細胞由来の眼組織オルガノイドにおいては、培養 8 日目に強くレポーター遺伝子の発現が誘導される。そこで、培養 7 日目から様々なシグナルの阻害剤などを添加し、24 時間後のレポーター発現の解析を行なった。RPE 以外に、神経堤細胞で Tagln が発現することが知られており、PDGF や PTEN シグナルがその上流であることが示唆されていたため、まずそれらのシグナルに対する阻害剤の作用を解析したが、レポーターの発現には大きな影響はみられず、RPE と神経堤細胞では異なるメカニズムで Tagln の発現が制御されていることが示唆された。しかしながら、細胞内のアクチン繊維を切断する Swinholide A により、Tagln の発現が強く惹起されることが分かった。Swinholide A と同じようにアクチン繊維を切断する Latrunculin A においては Tagln の発現は増強されなかった。Latrunculin A がアクチン繊維をモノマー化するのに対し、Swinholide A はダイマー化させる作用を持つことから、SRF などのように、モノマーアクチンの濃度低下が転写の活性化につながる転写因子が Tagln の活性化に重要であることが示唆された。また、眼組織オルガノイドにおける Tagln の発現は培地中の血清と、細胞の ROCK 活性に依存しており、その阻害剤である Y-27632 で抑制されることも分かった。



Swinholide A 処理による Tagln 発現の増強

(2) マウス頭部器官培養系に対する阻害剤添加実験

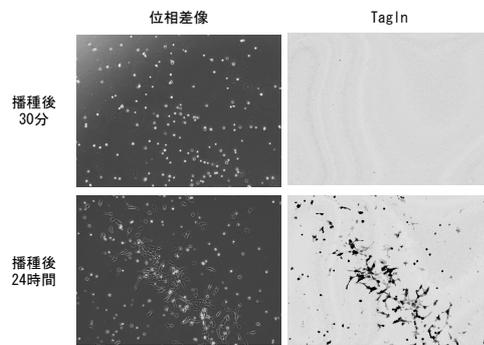
Tagln が発現する前の胎生 9.5 日齢のマウス胚の頭部を単離し、Tagln が発現する胎生 10.5 日に相当する 24 時間後まで浮遊培養する系を作製した。この時、各種阻害剤を加えることで、Tagln の発現に対する影響を調べた。まず、本実験系においては、培養 24 時間後の段階で、網膜が正常に眼胞の内側に陥入している眼組織が少ないことが分かった。凍結切片に対し、Tagln 抗体で免疫染色を行うことにより、網膜が正常に陥入していない眼組織において、本来 Tagln を発現しない網膜部分にその発現が見られた。また、この時の Tagln の発現はアクチン細胞骨格の状態に応じて転写活性が調節される転写因子 SRF の阻害剤 CGC-1423 および Y-27632 の添加で減弱した。これらの結果から、細胞骨格系を介した、細胞の本来の形態からのずれの感知が Tagln の発現制御に関わる可能性が示唆された。



マウス頭部器官培養系における Tagln の発現

(3) 眼組織細胞の分散培養系における Tagln の発現解析

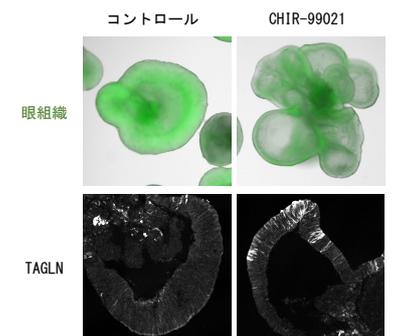
レポーター ES 細胞由来の眼オルガノイドの中から、Tagln を発現しない網膜の細胞をセルソーターにより分取し、培養ディッシュ上に播種し、24 時間後のレポーター発現を解析した。その結果、Tagln を発現していなかった網膜由来の細胞が、培養 24 時間後には Tagln を発現するようになることが分かった。この時の Tagln の発現については ROCK 阻害剤である Y-27632 で抑制することができなかった。これらの結果は、Tagln の発現が細胞の本来の形からのずれに起因している可能性を示唆するとともに、組織での Tagln の発現に対する ROCK 阻害剤の抑制効果は二次的なものである可能性を示唆しているが、本研究期間中では実際のずれの検知機構については同定することができなかった。



ディッシュ上に播種した網膜細胞における Tagln の発現誘導

(4) ヒト ES 細胞由来眼組織オルガノイドにおける TAGLN の発現条件の探索

ヒト ES 細胞由来の眼組織オルガノイドはマウス ES 細胞由来のものとは比べ分化系自体は安定しているものの、TAGLN をほぼ発現しない網膜領域が組織の大半を占めており、TAGLN の発現制御機構やその機能に対する解析に用いるのが難しかった。そこで、培養系に RPE 寄りの性質を付加するために背側化を促しうる BMP4 や CHIR-99021 といった因子を添加し、TAGLN の発現に及ぼす影響を解析した。その結果、3 μ M 前後の CHIR-99021 を添加した際に、眼組織オルガノイドの変形及び TAGLN の発現が誘導されることを明らかにした。これにより、マウス ES 細胞由来のオルガノイドに比べ、より分化が安定しているヒト ES 細胞

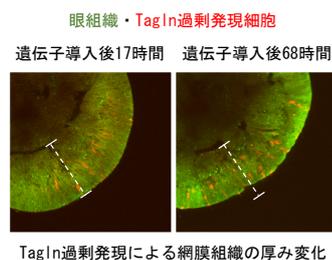


CHIR-99021 によるヒト眼組織オルガノイドでの TAGLN 誘導

由来の眼組織オルガノイドでの TAGLN の発現・機能解析が可能となった。

(5) 眼組織オルガノイドへのエレクトロポレーションによる TAGLN の機能解析

TAGLN をほぼ発現しない培養 3 週目のヒト ES 細胞由来の眼組織オルガノイドに対し、TAGLN の過剰発現ベクターをエレクトロポレーションで導入し、組織の形態変化を観察した。通常、この時期の眼組織オルガノイドは、培養が進むにつれ組織の厚みが増大する傾向にあるが、エレクトロポレーションを行なった側の領域においては、組織の厚みの減少が見られた。組織の厚みが減少は、細胞のアピカル面の収縮の可能性を示唆しており、TAGLN が細胞の変形によって発現制御されているだけでなく、自身も積極的に細胞の形態変化に寄与している可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------