

令和元年5月23日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17672

研究課題名(和文) 遺伝子導入による網膜神経細胞へのダイレクトリプログラミング

研究課題名(英文) Direct reprogramming for the differentiation into retinal ganglion cells by gene transfection

研究代表者

馬場 行広 (Baba, Yukihiro)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：40581418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子の遺伝子導入によって網膜神経節細胞マーカーであるBrn3bの発現が誘導されるのかを調べたところ、Brn3b陽性細胞が観察されたことから、網膜神経節細胞への分化が誘導されるといった結果を得た。しかし、その分化誘導効率は著しく低かったため、その分化誘導効率を上げることを目的として、メチル基転移酵素Dnmt1、Dnmt3a、DNA脱メチル化酵素Tet3、あるいはヒストン脱メチル化酵素Jaridの阻害剤を用いて検討を行った。その結果、いずれの条件においても網膜神経節細胞への分化誘導効率の上昇は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障の治療は変性を遅らせることが主な治療法となっており、失明の患者に対する治療法がない状況である。本研究によってミュラーグリア細胞から網膜神経節細胞へと分化誘導する遺伝子群が明らかになりつつある。しかしその誘導効率が低いといった課題があるので、今後その効率を上げる条件の検討し、緑内障患者に対する根本的治療の開発に向けて研究を進展させていきたい。

研究成果の概要(英文)：We found that Ascl1-NICD3-Sox4 cotransfection induced the expression of retinal ganglion cell (RGC) marker Brn3b in transfected cells. However, the efficiency was very low. Therefore, I have been seeking to increase the efficiency of RGC differentiation by Ascl1-NICD3-Sox4 cotransfection with Dnmt1, Dnmt3a, Tet3 and Jarid inhibitor compound. However, the efficiency of RGC differentiation was not increased.

研究分野：網膜再生

キーワード：網膜再生 遺伝子導入 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症は視細胞や網膜色素上皮に変性が起こり、緑内障は網膜神経節細胞死によって引き起こされる。近年、細胞移植による治療を目指して、虹彩上皮細胞、線維芽細胞、あるいは多能性幹細胞から視細胞、網膜色素上皮、網膜神経節細胞へと分化誘導することが *in vitro* のレベルで試みられている。しかし、視覚機能の回復、細胞の安全性、およびコストの面で多くの課題があり、根本的な治療法として確立されていない。一方、脳の研究の分野では、生体内で遺伝子導入によってダイレクトリプログラミングを引き起こし、グリアから神経細胞が生み出されることが報告され、生体内ダイレクトリプログラミングによる遺伝子治療に期待が高まっている。幼弱期の傷害モデルマウスの網膜においても、Ascl1 によってミューグリア細胞から双極細胞が生体内ダイレクトリプログラミングによって生み出されることが報告されている(Ueki et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2015)。しかし、網膜再生は完全には起こらないため、網膜再生に必要な遺伝子セットは明らかになっていない。また、網膜の疾患の治療に必要な視細胞や網膜神経節細胞を生み出すためには Ascl1 以外のファクターも必要であると考えられる。

2. 研究の目的

申請者らはゼブラフィッシュの網膜再生で得られた知見をマウスに応用し、遺伝子導入による網膜再生誘導の可能性を検証し、再生による網膜変性疾患の新規治療法を確立するための基盤研究を行っている。これまでにマウス網膜において Ascl1 と NICD3 を多重遺伝子導入するとミューグリアの増殖が誘導されることを見出してきた(未発表)。将来の研究の発展として、視細胞、あるいは網膜神経節細胞特異的なダイレクトリプログラミングを引き起こす遺伝子セットを特定することにより、網膜疾患ごとの新規治療法の開発に結び付けたい。

本研究期間内に以下の実験を行い、ミューグリアの神経細胞分化誘導に焦点を当てて、ダイレクトリプログラミングの可能性を検証する。

1. Ascl1、NICD3、Sox4 の多重遺伝子発現によって神経突起を伸ばした細胞が網膜神経節細胞に分化しているのかをマーカーを用いた免疫組織化学染色、活動電位測定ならびに遺伝子発現解析を行うことによって明らかにする。

2. 視神経変性モデルマウスにおいて Ascl1、NICD3、Sox4 の遺伝子導入実験を行い、網膜神経節細胞分化誘導によって視機能がどの程度回復するのかを検討する。

3. Ascl1、NICD3 によって未分化になった細胞に Crx などの細胞種特異的転写因子を加えて、視細胞や双極細胞への選択的な分化誘導が起きるのかを検討する。

4. ダイレクトリプログラミングに関わる遺伝子セットの発現を制御する miRNA や薬剤をスクリーニングで探索する。

3. 研究の方法

Ascl1、NICD3、Sox4 の多重遺伝子導入によってミューグリア細胞が網膜神経節細胞へと分化しているのかを、免疫組織化学染色、電気生理学的手法ならびに遺伝子発現解析を用いて明らかにする。さらに視神経変性モデルマウスを用いて、網膜神経節細胞としての機能を評価する。また、網膜変性疾患ごとの新規治療法の開発するために、Ascl1、NICD3 に細胞種特異的な転写因子を組み合わせた遺伝子導入を行い、視細胞や双極細胞への選択的なダイレクトリプログラミングが起こるのかを検討することで、それぞれの神経細胞分化誘導に必要な遺伝子

セットを同定する。将来、アデノウイルスを用いた遺伝子治療の応用へと発展させるために、同定した遺伝子セットの発現を制御する miRNA や薬剤をスクリーニングにより見つけ出す。

4. 研究成果

平成 29 年度の実験では、Ascl1、NICD3、Sox4 遺伝子導入細胞が網膜神経節細胞へと分化しているのかを定性するために、免疫組織化学染色を用いて評価した。EGFP で標識した遺伝子導入細胞での網膜神経節細胞マーカーである Brn3a の発現を調べたところ、EGFP、Brn3a 二重陽性細胞が観察されたことから、Ascl1、NICD3、Sox4 によって網膜神経節細胞への分化が誘導されるといった結果を得た。しかし、その分化誘導効率は著しく低かったため、予定していた遺伝子発現解析や電気生理学的手法を用いた解析を行うには困難な状況であった。今後の課題として、分化誘導効率を上げる取り組みが必要であると思われた。また、その他の実験として、Ascl1、NICD3 に細胞種特異的転写因子を加えて、視細胞や双極細胞への選択的な分化誘導が起きるのかを検討した。視細胞特異的転写因子 Crx をクローニングした後に、Ascl1、NICD3 と共に遺伝子導入実験を行った結果、錐体細胞マーカーである RXR α の発現誘導が見られたが、成熟錐体細胞マーカーである Arr3 の発現は認められなかった。この結果から、成熟した錐体細胞への分化には Crx は充分ではなく、他の因子が必要であることが示唆された。

平成 29 年度の実験結果において、Ascl1、NICD3、Sox4 遺伝子導入細胞で網膜神経節マーカーの発現を確認したがその分化誘導効率は著しく低かったため、平成 30 年度ではその分化誘導効率を上げることを目的として実験を遂行した。DNA のメチル化やヒストン修飾の状態を制御することで分化誘導効率が上昇する可能性が考えられたので、メチル基転移酵素 Dnmt1、Dnmt3a、DNA 脱メチル化酵素 Tet3、あるいはヒストン脱メチル化酵素 Jarid の阻害剤を用いて検討を行った。その結果、いずれの条件においても網膜神経節細胞への分化誘導効率の上昇は認められなかった。今後の実験計画として、網膜神経節細胞分化を制御する転写因子群の同定を行ったうえで、ミュラーグリア細胞からの網膜神経節細胞へのリプログラミングに着手していきたい。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

発表年；2018 年、学会名；第 11 回 R R M、発表表題；転写因子による網膜神経節細胞への分化誘導

発表年；2018 年、学会名；第 5 回 国際組織工学・再生医療学会 世界会議 2018 (国際学会) 発表表題；Development of retinal degeneration model in vitro and identification of retinal regeneration inducing factors

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：渡辺 すみ子

ローマ字氏名：(WATANABE, sumiko)

研究協力者氏名：中内 啓光

ローマ字氏名：(NAKAUCHI, hiromitsu)

研究協力者氏名：岡田 尚巳

ローマ字氏名：(OKADA, takashi)

研究協力者氏名：鈴木 穰

ローマ字氏名：(SUZUKI, yutaka)

研究協力者氏名：長崎 正朗

ローマ字氏名：(NAGASAKI, masao)

研究協力者氏名：Daisy Umutoni

ローマ字氏名：(DAISY umutoni)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。