

機関番号：74415

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390087

研究課題名（和文）脊椎動物の網膜視細胞の細胞運命決定機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of cell fate determination of vertebrate retinal photoreceptor cells

研究代表者

古川 貴久（FURUKAWA TAKAHISA）

財団法人大阪バイオサイエンス研究所・発生生物学部門・研究部長

研究者番号：50260609

研究成果の概要（和文）：視覚は人の生活に必須である。目で光を受ける神経細胞である網膜視細胞が形成・維持される機構かを明らかにすることは、学問上の意義のみならず、視覚障害の診断や治療に重要である。私達は視細胞が形成される機構を、主にマウスを用いて解析し、網膜幹細胞の増殖のメカニズム、視細胞の分化と維持のメカニズム、視細胞からのシグナルを伝える網膜双極細胞の機能メカニズムと人疾患の関連について、分子レベルでの理解を大きく進めることができた。

研究成果の概要（英文）：Vision is critical to our lives. To elucidate molecular mechanisms underlying development of retinal photoreceptor cells is not only important for biology but also for development of diagnosis and treatment of retinal diseases. We studied mechanisms of retinal photoreceptor development mainly by using mouse genetics. We progressed our understanding on molecular mechanisms underlying retinal stem cell proliferation, differentiation and maintenance of photoreceptor cells, function and related human diseases of bipolar cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：発生医学

1. 研究開始当初の背景

申請者は脊椎動物の中枢神経系の細胞運命決定の分子メカニズムの解明を目指している。それを生物学的な見地からのみ追求していくのではなく、ヒトの疾患との関連からも追求していきたいと考えている。脊椎動物の網膜は中枢神経系由来で、構造が比較的単純であり、比較的発生過程が遅く、生体レベルでの実験操作が容易であったことから、網膜は中枢神経系発生の良

いモデルとして知られている。申請者は、特に網膜視細胞の運命決定機構に注目している。網膜視細胞は哺乳類において唯一の光センサーであり、杆体・錐体の2種類よりなる。杆体は暗所での光を識別する感度が高く、錐体は明所での光と色彩を識別し、ヒトの視覚は主に錐体が担う。また、網膜視細胞の異常に起因する病気であるヒト遺伝的網膜変性症の患者は全世界に約400万人いるが、根本的な治療法は存在しない。

また糖尿病性網膜症、黄斑部変性症などの多くの網膜疾患でも網膜視細胞が変性あるいは障害されるので、網膜視細胞の再生や新生を可能にするためにその発生・分化の分子機構の解明は非常に重要である。したがって網膜視細胞の分化機構を明らかにすることは神経発生のモデルとしてだけでなく臨床医学的にも重要である。

2. 研究の目的

申請者は以前、網膜視細胞の分化の鍵をにぎる転写因子 *Crx* を単離した (Furukawa et al., *Cell*, 91, 531, 1997)。その発現は網膜未分化前駆細胞では認められず、分化しつつある視細胞および最終分化した視細胞に非常に高いレベルで発現していた。そして *Crx* はロドプシン、コーンオプシンやトランスデュシンといった光受容経路の分子や視細胞の構造を形成する多くの網膜視細胞特異的分子の発現を調節することを明らかにした。つまり、*Crx* が長らくこの分野の多くの研究者により探されてきた、視細胞特異的遺伝子群の上流転写因子であった。また生体レベルで *Crx* は視細胞の分化を誘導する活性があること、ノックアウトマウスの解析から *Crx* が視細胞の機能発現に必須であることを見出した (Furukawa et al., *Nat Genet.*, 23, 466 1999)。

さらに、我々の共同研究 (Freund, Furukawa et al., *Cell*, 91, 543, 1997) ならびに他のグループからの報告により、臨床的には、ヒトにおいては *Crx* が3つのタイプの遺伝性網膜変性症の原因遺伝子であることが明らかになった。さらに我々は転写因子 *Otx2* が網膜視細胞の運命決定に必須であることを見出し、報告した (Nishida et al., *Nature Neurosci.* 2003)。*Otx2* は胎生期の視細胞に発現し、*Otx2* が *Crx* の転写活性化因子であることも見出した。さらに、我々は最近 *Otx2* が生後、双極ニューロンの終末分化にも機能していることを明らかにした (Koike et al., *Mol. Cell Biol.* 27, 8318-8329, 2007)。申請者は、本研究で、視細胞の運命決定における遺伝子制御と蛋白質制御のメカニズムを明らかにしていくことを目的とする。

3. 研究の方法

申請者らは、分子生物学的手法により、網膜の発生や機能に重要な因子を同定し、ノックアウトマウス、トランスジェニックマウス、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュなどのモデル生物を用いて、免疫組織学的解析、電子顕微鏡、機能解析を行うとともに、生化学的解析、細胞生物学的解析を行い、遺伝子レベル、蛋白質レベルでの機能解析を行った。さらには、電気生理学的方法によって、網膜神経回路における生理機能の解析も行った。

4. 研究成果

(1) - ① 網膜細胞運命決定における転写抑制因子 *Blimp1* の機能解析

近年、この *Otx2* の下流分子として、*Blimp1* を見出した。*Blimp1* はN末に PR/SET domain、C末に Zinc finger motif をもつ転写制御因子であり、B細胞が形質細胞へと最終分化する際に機能するマスター因子であることや、生殖細胞への運命決定に必須の因子であること等が報告されている。そこで、網膜特異的 *Blimp1* コンディショナルノックアウトマウスを作製し、解析を行った結果、*Blimp1* を欠損すると、視細胞発生の初期から視細胞の数が半減することが明らかとなった。さらに、*Blimp1* 欠損網膜では、双極細胞様細胞および増殖性細胞が増加することを見出した。また、逆に *Blimp1* を過剰発現させた網膜では、双極細胞形成および細胞増殖が阻害された。*Blimp1* の作用機序を明らかにするため、野生型と *Blimp1* 欠損網膜における遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析によって比較したところ、*Blimp1* 欠損網膜では *Chx10* の発現が有意に増加することを見出した。*Chx10* は双極細胞への運命決定および網膜前駆細胞の増殖を制御する転写因子である。さらに、ルシフェラーゼアッセイおよび ChIP 解析の結果、*Blimp1* が網膜において直接 *Chx10* の発現を抑制することが明らかとなった。以上の結果から、網膜前駆細胞から視細胞へと分化する過程において、*Blimp1* は視細胞前駆細胞が双極細胞や細胞増殖に不適切に運命転換するのを抑制している可能性が示された。このメカニズムには *Blimp1* による *Chx10* の発現抑制が寄与しているものと考えられる。これらのことから、正常な視細胞の運命決定には、*Otx2* などによる正の制御因子による遺伝子活性化だけでは十分ではなく、*Blimp1* のような転写抑制因子によって視細胞への分化を安定化することが必須であることが明らかとなった。また、本研究は視細胞発生機構において新たな制御機構を加えたのみならず、*Blimp1* が初期視細胞前駆細胞の可塑性を制御する鍵となる分子である可能性をも示しており、興味深い知見を見出すことができたものと考えられる。

(1) - ② 視細胞の運命決定における新規転写調節共役因子 *Panky (photoreceptor ankyrin repeat protein)* の同定と機能に関する研究

遺伝子情報の正確な時間的・空間的制御は個体の発生や機能発現にとって重要である。遺伝子の発現調節機構において、その中心的役割を果たす転写因子は比較的よく研究されてきた。しかし、この転写因子と共に働く転写共役因子については未解明な点が多い。我々は以前、*Otx2* の視細胞特異的コンディ

シヨナルノックアウトマウスでは、視細胞前駆細胞がアマクリン様細胞に細胞運命を転換することを報告した。我々はこのマウス網膜を用いて、視細胞で働く新規な遺伝子をマイクロアレイで探索した。この解析において、mRNA の発現が *Otx2* CKO で著しく低下している遺伝子の一つとして *Panky* (*photoreceptor-specific ankyrin repeat protein*) を同定した。*Panky* は網膜視細胞と松果体特異的に発現していた。切片 *in situ* ハイブリダイゼーションによって網膜における発現パターンを調べると、*Panky* は生後 1 日目頃から視細胞に発現し始め、成体マウスでも視細胞にその発現が維持されていることが明らかとなった。*PANKY* は 385 アミノ酸からなる蛋白質であり、錐体視細胞由来細胞株 661W に強制発現させた *PANKY* の細胞内局は細胞質と核に認められた。そこで *CRX* によって活性化される遺伝子のプロモーターを用い、*CRX* による遺伝子の転写活性化に対する *PANKY* の影響を検定した。その結果、*PANKY* は *CRX* による転写活性化を抑制する機能を有することを見出した。

(2) 網膜幹細胞の増殖機構の解析

神経前駆細胞の増殖の制御は、正常な中枢神経系の形成に必須である。我々は、中枢神経系の初期発生における細胞増殖の制御機構の解析を目的として、眼・前脳の初期発生に必須であり、細胞増殖を制御することが知られている転写因子 *rax* により誘導される因子の同定を試み、クロマチン制御因子のひとつである High mobility group B3 (*Hmgb3*) 遺伝子を単離した。我々は以前、アフリカツメガエルの初期胚を用いた機能解析により、*xhmgb3* が発生中の中枢神経系の細胞増殖制御において重要な役割をもつことを報告した。*xhmgb3* は、その構造から他のタンパク質と機能する可能性が考えられたため、我々は、酵母ツーハイブリッドシステムを用いて結合するタンパク質を探索し、Ubiquitin conjugating enzyme 9 (*Ubc9*) を単離した。*Ubc9* は、脊椎動物において現在同定されている、唯一の SUMO 結合酵素である。我々は、*ubc9* が網膜の中で網膜幹細胞の存在する毛様体周縁部(ciliary marginal zone)に発現することを見出した。そこで、*xhmgb3* と *Ubc9* の共発現を試みると、*xhmgb3* 単独の場合に対して、2 倍以上の高頻度でアフリカツメガエル胚の眼の巨大化が認められた。一方で、*Ubc9* の機能阻害は、眼の縮小を引き起こした。*xhmgb3* と *Ubc9* の大量発現は、アフリカツメガエルの網膜発生において、細胞死には影響を与えなかった。また、DAPI 染色により核密度を検討した結果、影響が認められなかったことから、細胞密度に影響しないことが示唆された。さらに、BrdU を用い

て細胞増殖について検討した結果、細胞周期の離脱に影響が認められた。これらのことより、*xhmgb3* と *Ubc9* は発生中の網膜前駆細胞の増殖の制御に共同的に機能することが示された。さらに、*Ubc9* は細胞周期抑制因子を抑制することで、幹細胞増殖に関わっていることを見出し、論文投稿中である。これらの知見は、再生医療において神経幹細胞などの未分化性を維持したまま増やす場合にも応用できると期待される。

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 25 件)

- 1). 加藤君子, 荒木章之, 大森義裕, 古川貴久, 網膜視細胞の機能構築—細胞運命・シナプスと繊毛の形成・ヒト疾患, 実験医学, 査読無, 29, 514-520 (2011)
- 2). Okada, I. & Furukawa, T.(計 28 名, 26 番目), SMOC1 is essential for ocular and limb development in humans and mice., Am. J. Hum.Genet., 査読有, 88, 1-12 (2010)
- 3). Omori, Y. & Furukawa, T. (計 10 名, 最後), Negative Regulation of ciliary length by ciliary ale germ cell-associated kinase(Mak) is required for retinal photoreceptor survival., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 査読有, 107, 22671-22676 (2010)
- 4). Omori, Y. & Furukawa, T.(計 10 名, 最後), Negative Regulation of ciliary length by ciliary male germ cell-associated kinase(Mak) is required for retinal photoreceptor survival., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 査読有, 107, 22671-22676 (2010)
- 5). Krizaj, D., Huang, W., Furukawa, T., Punzo, C. & Xing, W. Plasticity of TRPM 1 expression and localization in the wild type and degenerating mouse retina., Vision Research, 査読有, 50, 2460-2465 (2010)
- 6). Terada, K. & Furukawa, T., Sumoylation controls retinal progenitor proliferation by repressing cell cycle exit in *Xenopus laevis*., Developmental Biology, 査読有, 347, 180-194 (2010)
- 7). Kanagawa, M. & Furukawa, T.(計 9 名, 8 番目), Post-translational maturation of

- dystroglycan is necessary for pikachurin binding and ribbon synaptic localization., *J. Biol. Chem.*, 査読有, 285, 31208-31216 (2010)
- 8). Katoh, K., Omori, Y., Onishi, A., Sato, S., Kondo, M. & Furukawa, T., Blimp1 suppresses Chx10 expression in differentiating retinal photoreceptor precursors to ensure proper photoreceptor development., *J. of Neurosci.*, 査読有, 30, 6515-6526 (2010)
 - 9). Nakamura, M. & Furukawa, T.(計 10 名, 最後), TRPM1 mutations are associated with the complete form of congenital stationary night blindness., *Mol. Vision*, 査読有, 16, 425-437 (2010)
 - 10). Katahira, T., Nakagiri, S., Terada, K. & Furukawa, T., Secreted factor FAM3C (ILEI) is involved in retinal laminar formation., *BBRC*, 査読有, 392, 301-306 (2010)
 - 11). Muranishi, Y., Sato, S., Inoue, T., Ueno, S., Koyasu, T., Kondo, M. & Furukawa, T., Gene expression analysis of embryonic photoreceptor precursor cells using BAC-Crx-EGFP transgenic mouse., *BBRC*, 査読有, 392, 317-322 (2010)
 - 12). Koike, C., Numata, T., Ueda, H., Mori, Y. & Furukawa, T., TRPM1: a vertebrate TRP channel responsible for retinal ON bipolar function., *Cell Calcium*, 査読無, 48, 95-101 (2010)
 - 13). 近藤峰生, 古川貴久, 眼疾患と動物モデル網膜・視神経疾患動物モデルの網膜電図解析, *日本眼科学雑誌*, 査読無, 114, 248-279 (2010)
 - 14). Sanuki, R., Omori, Y., Koike, C., Sato, S. & Furukawa, T., Panky, a novel photoreceptor-specific ankyrin repeat protein, is a transcriptional cofactor that suppresses CRX-regulated photoreceptor genes., *FEBS Letters*, 査読有, 584, 753-758 (2009)
 - 15). Koike, C. & Furukawa, T.(計 15 名, 最後), TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 査読有, 107, 332-337 (2010).
 - 16). Kanamoto, T., Mizuhashi, K., Terada, K., Minami, T., Yoshikawa, H. & Furukawa, T., Isolation and characterization of a novel plasma membrane protein, osteoblast induction factor (obif), associated with osteoblast differentiation., *BMC Developmental Biology*, 査読有, 9:70 (2009)
 - 17). Cao, Y. & Furukawa, T.(計 11 名, 8 番目), Retina Specific GTPase Accelerator RGS11/Gβ5S/R9AP is a Constitutive Heterotrimer Selectively Targeted to mGluR6 in ON-Bipolar Neurons., *J. of Neurosci.*, 査読有, 29, 9301-9313 (2009)
 - 18). Sasaki, T. & Furukawa, T.(計 17 名, 14 番目), Elevated Intraocular Pressure, Optic Nerve Atrophy, and Impaired Retinal Development in ODAG Transgenic Mice., *IOVS*, 査読有, 50, 242-248 (2009)
 - 19). 佐藤茂, 不仁門尚, 古川貴久, 網膜シナプスの高次構造を形作る細胞外マトリックス蛋白質ピカチュリン, *神経眼科*, 査読無, 26, 439-446 (2009)
 - 20). 加藤君子, 大森義裕, 古川貴久, シナプスの高次構造をかたちづくる細胞外マトリックス蛋白質ピカチュリン, 蛋白質核酸 酵素, 査読無, 54, 1166-1172 (2009)
 - 21). 大森義裕, 古川貴久, 網膜の視細胞における繊毛タンパク質の輸送機構と疾患, *細胞工学*, 査読無, 28, 1036-1041 (2009)
 - 22). Sato, S. & Furukawa, T.(計 18 名, 最後), Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation., *Nat. Neurosci.*, 査読有, 11, 923-931 (2008)
 - 23). Omori, Y. & Furukawa, T.(計 9 名, 6 番目), Elipsa is an early determinant of ciliogenesis that links the IFT particle to membrane-associated small GTPase, Rab8., *Nat. Cell Biol.*, 査読有, 10, 437-444 (2008)
 - 24). 大森義裕, 古川貴久, 繊毛におけるタンパク質輸送機構と Rab GTPase のつながり, *実験医学*, 査読無, 26, 1744-1747 (2008)
 - 25). 小池千恵子, 古川貴久, 網膜視細胞の細胞極性と細胞内オルガネラの制御ー外節形成、繊毛内輸送、核のポジショニング

グから網膜変成症まで, 査読無, 80, 224-232, (2008)

[学会発表] (計 31 件)

- 1). 沼田朋大, TRPM1: a vertebrate TRP channel responsible for retinal ON bipolar function, 第 88 回日本生理学会大会, 2011. 3. 29, パシフィコ横浜
- 2). 杉田祐子, Role of ON-Direction Selective Ganglion Cells of Mouse Retina in Optokinetic Responses, 第 88 回日本生理学会大会, 2011. 3. 28, パシフィコ横浜
- 3). 古川貴久, 網膜の細胞運命決定、シナプスと繊毛の形成の分子制御, 東京大学大学院医学系研究科「医学共通講義Ⅲ機能生物学」, 2011. 2. 14, 東京大学
- 4). 古川貴久, 網膜研究による中枢神経系の構築機構の解明～細胞分化からシナプス形成まで～, 富山大学大学院特別セミナー, 2010. 12. 13, 富山大学
- 5). Takahisa Furukawa, Molecular control of retinal photoreceptor cell fate and cilia formation, Pfizer, 2010. 11. 22, Pfizer, San Francisco, U.S.A.
- 6). Takahisa Furukawa, Molecular control of retinal photoreceptor cell fate and morphogenesis, UCA Neuroscience Seminar, 2010. 11. 18, UCLA, U.S.A.
- 7). Takahisa Furukawa, Sumoylation controls retinal progenitor proliferation by repressing cell cycle exit in *Xenopus*, Neuroscience 2010, 2010. 1. 14, San Diego Convention Center, U.S.A.
- 8). 古川貴久, マウスおよびヒト網膜 ON 双極細胞における TRPM1-L チャネルの機能解析, 視覚科学フォーラム, 2010. 8. 26, 筑波大学
- 9). 古川貴久, 網膜の発生と機能の分子機構～遺伝情報による神経回路の作られ方, 第 5 回感覚器シンポジウム, 2010. 3. 11, 臨床研究(感覚器)センター
- 10). 古川貴久, 網膜の発生と機能の分子機構～遺伝情報による神経回路の作られ方, 大阪大学生命機能研究交流会, 2010. 2. 26, 大阪大学
- 11). 古川貴久, 網羅的遺伝子解析によって同定した網膜視細胞形成に関わる遺伝子群の解析, 「統合脳」冬のシンポジウム, 2009. 12. 19, 学術総合センター
- 12). 古川貴久, 転写抑制因子による視細胞の運命決定と分化の制御機構, 第 2 回 Retina Research Meeting, 2009. 12. 12, 東京大学
- 13). Takahisa Furukawa, Molecular control of photoreceptor cell development by Otx2 transcription factor, OIST Workshop, 2009. 11. 10, OIST Seaside house
- 14). 古川貴久, 中枢神経系において特異的に高発現する網膜非コード RNA3(RNCR3)の機能解析, 第 82 回日本生化学大会, 2009. 10. 22, 神戸ポートピアホテル
- 15). Takahisa Furukawa, Functional Analysis of TRPM1 in Visual Signal Transmission of Retinal ON Bipolar Cells, ISOCB 2009, 2009. 9. 10, Vila Galé Ericeira Hotel, Portugal
- 16). Takahisa Furukawa, Sumoylation-activity of Ubc9 controls retinal progenitor proliferation by repressing the cell cycle exit in *Xenopus laevis*. 2009. 9. 5, University of Oxford
- 17). 古川貴久, 網羅的遺伝子解析によって同定した網膜視細胞形成に関する遺伝子群の解析, 「統合脳」夏のワークショップ, 2009. 8. 12, 北海道厚生年金会館
- 18). Takahisa Furukawa, Functional Development of Retinal Bipolar Cells, The 18th CDB Meeting, 2009. 4. 15, 神戸理化学研究所
- 19). 古川貴久, 網羅的遺伝子発現解析による網膜視細胞発生機構の解明, 犬山共同利用研究会「個体レベル比較生物学をめざして」, 2009. 3. 6, 犬山国際観光センター
- 20). 加藤君子, 網羅的遺伝子解析によって同定した網膜視細胞形成に関する遺伝子群の解析, 「統合脳」冬のシンポジウム, 2008. 12. 14, 一ツ橋学術総合センター
- 21). 古川貴久, 網膜視細胞の発生機構, 第 81 回日本生化学大会, 2008. 12. 11, 神戸ポートピアホテル
- 22). 古川貴久, 新規細胞外マトリックス蛋白質 pikachurin による網膜シナプス形成機

構, 第 6 回日本糖鎖科学コンソーシアム
シンポ, 2008. 12. 3, 東京コンファレンス
センター

- 23). 古川貴久, 網膜視細胞のシナプス形成機
構, Retina Research Meeting, 2008. 11. 8,
順天堂大学
- 24). 古川貴久, 網膜視細胞発生の分子コント
ロール~細胞運命からシナプス形成へ~,
日本学術振興会 回折構造生物第 169 委
員会 第 27 回研究会, 2008. 10. 28, 京都
大学
- 25). Takahisa Furukawa, Molecular control of
vertebrate retinal development ~From cell
fate determination to synapse formation~,
BSI セミナー, 2008. 10. 9, 和光理化学研
究所
- 26). Takahisa Furukawa, Roles of OTX2 and its
downstream factors in developmental and
functional construction of the vertebrate
retina, ICER 2008, 2008. 9. 29, Beijing
Wuzhou Crown Plaza Hotel, China
- 27). Takahisa Furukawa, An essential role of
pikachurin in photoreceptor ribbon synapse
formation, ISOCB 2008, 2008. 9. 4,
Paradise Point, San Diego, California, USA
- 28). 古川貴久, 網膜双極細胞に発現する
TRPM1 の機能解析, 第 12 回視覚科学フ
ォーラム, 2008. 8. 28, 大阪大学
- 29). 古川貴久, 網羅的遺伝子解析によって同
定した網膜視細胞形成に関する遺伝子
群の解析, 「統合脳」夏のワークショップ,
2008. 8. 7, 北海道厚生年金会館
- 30). 小池千恵子, 網膜 ON 型双極細胞におけ
る TRPM1 の機能解析, 第 4 回 TRP 研究
会「TRP チャンネルの機能的多様性とそ
の統一的理解」, 2008. 6. 5, 岡崎カンファ
レンスセンター
- 31). Takahisa Furukawa, Molecular control of
vertebrate retinal development~From cell
fate determination to synapse formation~,熊
本大学グローバル COE リエゾンラボ研
究会, 2008. 4. 23, 熊本大学

[図書] (計 1 件)

- 1). 古川貴久他, 高エネルギー加速器研究機
構 構造生物学センター, 入門 構造生物
学-放射光 X 線と中性子で最新の生命

現象を読み解く, 2010, 240
[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 骨芽細胞分化誘導因子遺伝子及びその
利用

発明者: 古川貴久

権利者: (財)大阪バイオサイエンス研究所

種類: 特許

番号: 特願第 2008-133591

取得年月日: 22 年 5 月 21 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.obi.or.jp/dept4/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古川 貴久 (FURUKAWA TAKAHISA)

研究者番号: 50260609