

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09789

研究課題名（和文）角膜内皮疾患の病態解明を目指したSLC4A11遺伝子の転写制御機構の解明

研究課題名（英文）Unraveling the Transcriptional Control Mechanisms of the SLC4A11 Gene Toward Understanding Corneal Endothelial Disease Pathogenesis

研究代表者

原 進（Hara, Susumu）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00536956

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）：本研究では、角膜内皮の重要な遺伝子であるSLC4A11の転写制御メカニズムを解明を目的とした。まず、転写制御因子の同定を試み、角膜内皮前駆細胞を用いた薬剤スクリーニングから候補化合物を特定した。さらにRNA-seq解析により、SLC4A11を含む遺伝子分が影響を受けることを明らかにした。また、選択的スプライシングバリエーションの解析により、新たな転写開始点の特定可能であった。これらの成果は、角膜内皮機能の理解や疾患治療に向けた基盤になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、角膜内皮細胞に発現するSLC4A11遺伝子の転写制御因子の探索および各種バリエーション等の解析から転写制御機構の一端を明らかにすることができた。今後、本研究の基盤研究に基づいて、SLC4A11を起因すると考えられる角膜内皮疾患の発症機序の解明やその治療法の開発や角膜内皮細胞を用いた再生医療研究分野において重要な知見が得られる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we elucidated the transcriptional control mechanisms of SLC4A11, an important gene in corneal endothelial cells. Initially, we attempted to identify transcriptional regulatory factors and conducted drug screening using human corneal endothelial progenitor cells. Subsequently, RNA-seq analysis revealed genes, including SLC4A11, affected by the identified compounds. Furthermore, analysis of selective splicing variants led to the identification of a new transcription start site upstream of previously reported ones. These findings provide insights into the transcriptional regulation of SLC4A11 and offer a foundation for understanding corneal endothelial function and potential therapeutic interventions for related diseases.

研究分野：再生医療、分子生物学

キーワード：角膜内皮 SLC4A11 転写制御 選択的スプライシング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

角膜組織は、角膜上皮、角膜実質、角膜内皮の3層から構成される。このうち角膜内皮はバリア機能・ポンプ機能によって角膜実質側から前房水側に水を汲みだすことによって角膜浮腫を防ぎ、角膜の透明性を恒常的に維持する重要な役割を担う。角膜内皮細胞が遺伝性疾患や外傷等によって機能不全になると徐々に角膜混濁を引き起こし、視力低下や失明をもたらす。角膜内皮のポンプ機能の分子メカニズムとして、角膜内皮細胞の角膜実質側と前房水側に Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase により形成された浸透圧勾配によって、AQP1 分子と Solute carrier family 4 member 11 (SLC4A11) 分子が協同的に水分子を角膜実質側から前房水側へと輸送することが知られている (Vilas, *et al.*, *Hum Mol Genet*, 2013)。また、SLC4A11 遺伝子は先天遺伝性角膜内皮変性症、Fuchs 角膜内皮変性症などの角膜内皮疾患の原因遺伝子として報告されており (Vithana *et al.*, *Nature Genetics*, 2006)、*Slc4A11* ノックアウトマウスでも角膜内皮障害を呈する (Han *et al.*, *IOVS*, 2013)。このように SLC4A11 は水分子のトランスポーターとしての機能を持ち、角膜内皮細胞の恒常性維持やヒト角膜内皮疾患の発症にも関与している。我々の研究グループでは、SLC4A11 遺伝子が角膜内皮に組織特異的に発現し、角膜内皮細胞を用いた再生医療の研究分野において重要な成熟分化マーカーであることを報告し (Yoshihara, Hara *et al.*, *EBioMedicine*, 2017)、さらに、SLC4A11 タンパク質の分解経路について小胞体関連分解が関与することも報告した (Hara *et al.*, *Exp Eye Res*, 2019)。

このように我々は角膜の恒常性に重要な *SLC4A11* 遺伝子のゲノム・タンパク質およびその生理機能を明らかにしてきたが、この分子の生理的病的な状態での発現制御機構、具体的には転写因子や選択的スプライシングなどの転写後修飾に関する mRNA の制御機構に関しては、いまだほとんど解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、角膜内皮における *SLC4A11* 遺伝子の転写制御因子および選択的スプライシングによるバリエーションに関する一連の転写制御機構のメカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

*SLC4A11* 遺伝子の転写制御因子の同定のために、輸入研究用眼球から採取し、培養したヒト角膜内皮前駆細胞および角膜内皮細胞を培養した。成熟角膜内皮細胞へと分化を促進させる低分子化合物ライブラリーを用いて薬剤スクリーニングを実施し、SLC4A11 遺伝子の発現を定量 PCR および免疫染色法および RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を実施した。フィーダーフリーで培養したヒト iPS 細胞にリポフェクション法で遺伝子導入し、目的の遺伝子座への導入をサンガーシークエンス法によって確認した。

### 4. 研究成果

SLC4A11 遺伝子発現の細胞モデルを決定するためにまず、角膜内皮培養細胞株および HEK293T 細胞を用いて検討すると、HCEC-B4G12 株では転写レベルで発現が確認されなかった。HEK293T 細胞は転写レベルでは発現が認められたものの、タンパクレベルでの検出が困難であった。そこで、本研究では、発生期での SLC4A11 遺伝子の転写活性化因子を探るために、評価系として、

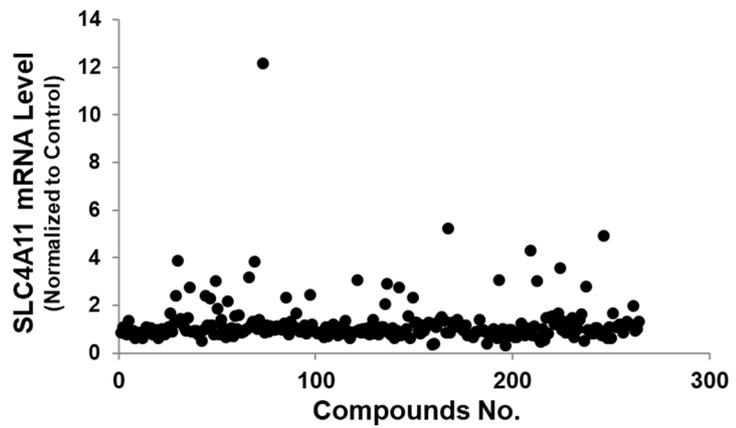


図 1. 低分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニング

SLC4A11 遺伝子を発現していない未成熟かつ高い増殖能を有する角膜内皮前駆細胞を用いた (Hara et al., Stem Cell Dev, 2014)。角膜内皮前駆細胞は角膜内皮分化培地を用いて成熟分化すると SLC4A11 を発現する。スクリーニング系として、低分子化合物ライブラリー (LPAC1280) の中から抽出した約 250 の分子について、定量 PCR を用いて SLC4A11 遺伝子の発現を評価した。その結果、図 1 に示すように複数の低分子化合物が SLC4A11 遺伝子発現を亢進させる候補化合物であると考えられた。さらに複数種類の低分子化合物が濃度依存的な発現亢進を示すことが分かった (図 2A)。免疫染色により、SLC4A11 タンパク質の発現を検討すると、候補化合物を添加した群において、発現が増加した (図 2B)。

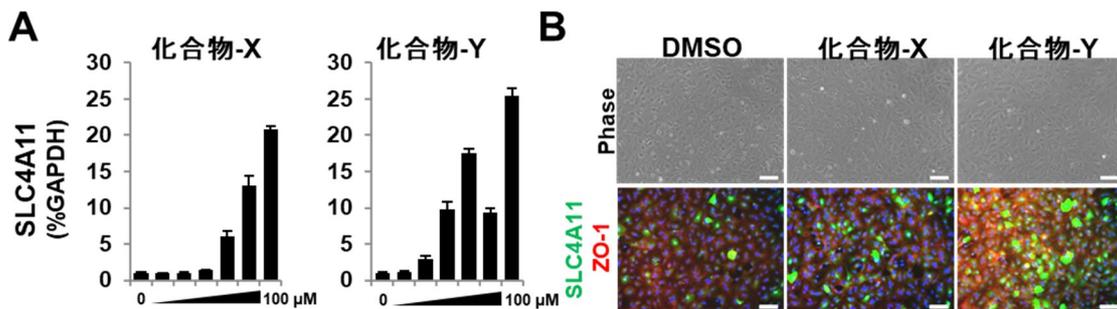


図 2. SLC4A11 遺伝子の発現亢進に関する因子の解析

少なくとも 2 種類の化合物の濃度依存的な SLC4A11 発現が認められた (A)。さらにタンパクレベルでの発現も増加した (B)。

次に、選定した低分子化合物について、*SLC4A11* 遺伝子以外の遺伝子発現を確認するために、RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析を実施した。その結果、この低分子化合物は角膜内皮細胞では *SLC4A11* 遺伝子を含む 19 種類が変動遺伝子として確認された (図 3)。これらの結果から、この低分子化合物に作用するシグナルが SLC4A11 遺伝子の転写制御の一端に関与することが示唆された。

さらに、これまでに多能性幹細胞からヒト角膜内皮細胞へと分化させる報告が多数報告されており、SLC4A11 遺伝子発現をモニター可能なレポーター iPS 細胞によって簡便に各種評価が可能である。そこで、ヒト iPS 細胞の SLC4A11 遺伝子座に対するターゲティングベクター (5' 相同領域-P2A-EGFP-polyA、薬剤耐性遺伝子カセットおよび 3' 相同領域) を作製し、CRISPER/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術による相同組み換えを実施した。ヒト iPS 細胞株にトランスフェクション法に遺伝子導入し、薬剤に選択した。さらに、生存したコロニーを

増殖させゲノム PCR によって目的の PCR 産物かを確認し、さらにサンガーシーケンスによって遺伝子配列を確認し、SLC4A11-レポーターiPS 細胞の樹立に成功した(図4)。SLC4A11

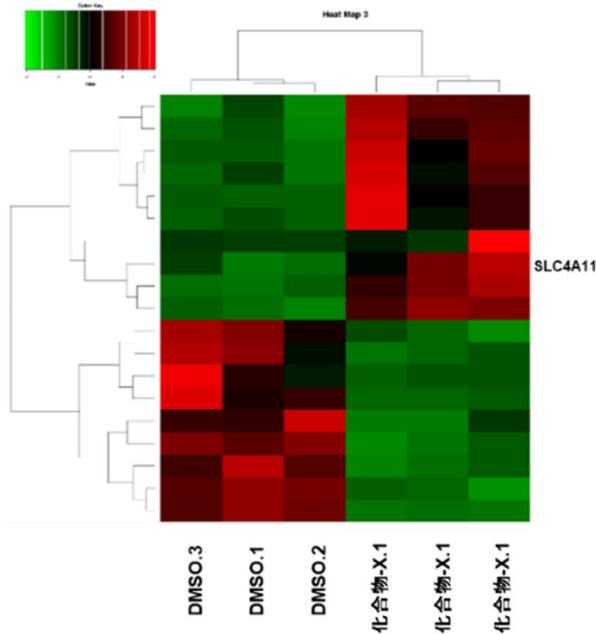


図3. RNA-seq による網羅的遺伝子発現解

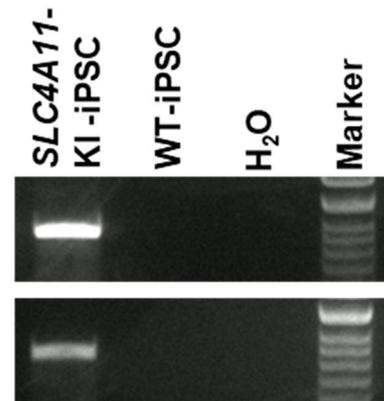


図4. PCR 産物によるジェノタイプ結果

の発現を評価できる細胞モデルとして有用であることが示唆された。

*SLC4A11* 遺伝子の転写開始点および選択的スライシングバリエントに関して、まず *SLC4A11* 遺伝子に報告された3つの主要なバリエントについて定量PCRで検討すると、バリエント2の発現がヒト角膜内皮組織では有意に高いことを以前我々は明らかにした(Hara *et al.*, *Exp Eye Res*, 2019)。本研究課題では、バリエント2に関してコード配列内でスプライシングバリエントをサンガーシーケンス法で検討すると、終止コドンより5'側に位置するエクソンの欠損が認められるバリエントの存在が明らかとなった。これは正常のスプライシングバリエントの一部に含まれるデータを得た。さらにCAGE解析の結果に基づいて、*SLC4A11* 遺伝子の新規転写開始点を明らかにした(図5、赤矢印)。この転写開始点は、これまでに報告されている転写開始点よりも上流に存在し、3つの主要バリエントに共通する転写開始であることが示唆された。

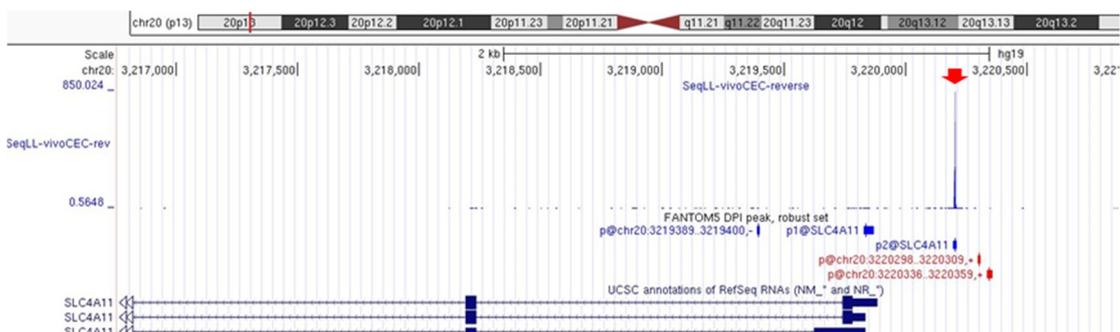


図5. *SLC4A11* 遺伝子の新規転写開始点

本研究から、*SLC4A11* 遺伝子の転写制御の観点から、制御因子の同定、転写開始点、選択的スプライシングバリエントの一端を明らかにできた。今後、さらに解析することによって、角膜内皮機能維持に必要な *SLC4A11* 分子の転写制御機構を制御可能かもしれない。さらに、これら

は角膜内皮疾患に対する創薬や再生医療に有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Koichi Baba, Susumu Hara, Reiko Kobayashi, Ai Honda, Aina Fukuyama, Motokazu Tsujikawa, Kohji Nishida
2. 発表標題 EFFICIENT GENERATION OF LENTOID BODIES FROM HUMAN IPS CELLS USING SEAM METHOD
3. 学会等名 ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Susumu Hara, Motokazu Tsujikawa, Kohji Nishida
2. 発表標題 IDENTIFICATION AND APPLICATION OF P75 NEUROTROPHIN RECEPTOR-EXPRESSING HUMAN TRABECULAR MESHWORK PROGENITOR CELLS
3. 学会等名 ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------