様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2023
課題番号：２０Ｋ１８３８０

研究課題名（和文）hiPS細胞シングルセル蛍光イメージングによる眼発生初期のRAX遺伝子の機能解明

研究課題名（英文）Elucidation of the function of RAX gene in early ocular development using single-cell fluorescence imaging of hiPS cells

研究代表者

小林　礼子（Kobayashi, Reiko）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：１０８５７８７４

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）：眼の分化初期に発現するRAX遺伝子が発現している細胞を蛍光レポーター遺伝子によって可視化させ、発生初期にどのような挙動を示しているのか、また、他の眼原基、特に網膜や水晶体などの各組織を形成する原基の分化がどのように促進されるのかを経時的に観察可能にする系を、遺伝子組み換えiPS細胞の樹立によって確立した。
この細胞を用いて2次元に眼の発生過程を模倣するSEAMを誘導し、分化誘導中のRAX発現細胞の挙動をタイムラプス蛍光顕微鏡によって継時的に観察した。さらに、免疫染色やFACSによってRAX以外にも眼の発生に必要な遺伝子群の発現パターンを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
眼発生過程では、眼胞の形成から眼球全体の組織形成が協同的に開始されるが、発生時期に重要であることがわかっているRAXの生理学的な機能の詳細は十分に解明されてない。そこでヒトiPS細胞から眼原基を模倣して分化誘導できるSEAM法を用いてRAX遺伝子を発現する細胞を追跡可能にできるミクロな観察系を構築し、それらの細胞が眼発生過程においてどのような役割を担うかをより詳細に明らかにできれば、初期網膜の発生過程やその周辺組織の発生メカニズムをさらに深く追求することができると考えられる。新たな眼科領域の再生医療分野への応用やRAX遺伝子の変異から発症する疾患の病態解明にもつながるものである。

研究成果の概要（英文）：We established the human iPS cell line that visualized RAX gene expression using a fluorescent reporter gene. The cell line made it possible to trace the cell lineage during early eye development by SEAM, which mimics two-dimensional eye development.
We observed the behavior of RAX-expressing cells during differentiation induction using time-lapse fluorescence microscopy. Furthermore, we analyzed the expression patterns of genes necessary for eye development in addition to RAX using immunostaining and FACS.

研究分野：眼科

キーワード：眼の発生

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

ヒトの眼では、胚発生の過程を経て、前部神経板から前脳が形成され、その一部が眼胞となり、表皮外胚葉が眼胞との接触により水晶体板を形成し、これにより水晶体や角膜が形成される。また眼胞は眼胚となり陥入構造を経ながら、網膜や毛様体を形成する。これら一連の眼の発生ネットワークは、各組織の原基間の誘導と協調により生じるが、そのメカニズムは未だに十分明らかとなっていない部分も多い。眼胞および眼杯形成は眼の発生過程において非常に重要なステップであり、その原基のマーカーの一つとして *RAX* 遺伝子が同定されている（Mathers *et al.*, Nature. 1997）。これまでの報告では、マウスでは発生初期から前部神経板で *RAX* 遺伝子の発現が認められ、前脳の発生とともに眼胞や初期網膜にも発現が見られるようになり、さらに発生が進むにつれて、海馬や下垂体後部にも発現が認められることが明らかになっている。*RAX* 遺伝子の変異または欠損により、無眼球症や前脳形成異常、頭蓋顔面異常、下垂体機能低下症などを生じる。また、*RAX* 遺伝子は他の複数の転写因子と協同的に網膜の光受容体の形成や成熟に重要な役割を担っていることが明らかとなってきている（Bailey *et al.*, Int. J. Dev. Biol. 2004, Muranishi *et al.*, J. Neurosci. 2011, Irie *et al.*, Mol. Cell. Biol. 2015, Brachet *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 2019）。しかし、ヒトの研究では、Sasai らのグループ が *RAX-GFP* レポーターES 細胞から立体網膜のみの発生過程の研究成果を報告したが（Eiraku *et al.*, Nature. 2011）、神経網膜の発生のみに焦点が当てられたため、他の眼の組織との関連性は明らかではない。 一方、申請者らの研究グループでは、ヒト iPS 細胞を用いて神経、網膜、水晶体、角膜組織などの 4 層から構成される眼の原基を同時に発生させる分化誘導系（SEAM 法；self-formed ectodermal autonomous multizone）によって、ヒト眼の発生過程を模倣することに世界で初めて成功した（Hayashi *et al,*, Nature 2016）。本分化誘導系は、*RAX* 遺伝子の発現と 2 層目の眼杯に由来する神経網膜原基の存在も明らかにした。さらに分化誘導系の解析によって、*RAX* 遺伝子が発現する 2 層目以外の神経外胚葉、表面外胚葉のみの分化誘導にも成功した（Shibata *et al,*. Cell Rep. 2018）。SEAM 法を用いれば、神経網膜の発生のみでなく、水晶体、角膜など眼の全ての原基の協調的な発生を明らかにすることができる状況にある。

２．研究の目的

本研究課題では、眼の発生初期における *RAX* 遺伝子の役割を、各眼原基発生との関わりから明らかにすることを目的とした。そのために、ヒト iPS 細胞を用いた眼の発生初期を再現できる SEAM 法を基盤技術とし、今回新たに発生の系譜解析が可能なシングルセル蛍光イメージング法による解析法を確立することとした。

３．研究の方法

RAX 遺伝子を発現している細胞を蛍光レポーター遺伝子によって可視化させ、発生初期にどのような挙動を示しているのか、また、他の眼原基、特に網膜や水晶体などの各組織を形成する原基の分化がどのように促進されるのかを経時的に観察し、新たな細胞系譜を明らかにするために *RAX* 遺伝子発現に伴って蛍光蛋白質を恒常的に追跡できるヒト iPS 細胞株の樹立を行った。この細胞を用いて SEAM を誘導し、分化誘導中の *RAX* 発現細胞の挙動をタイムラプス蛍光顕微鏡によって継時的に観察した。さらに、FACS によって *RAX* 発現細胞と *RAX* 非発現細胞を分離して、それぞれの細胞群における眼の発生に必要な遺伝子群の発現パターンを定量 PCR によって解析した。

４．研究成果

RAX 遺伝子発現に伴って蛍光蛋白質を恒常的に追跡できるヒト iPS 細胞株を作製するために CRISPR/Cas システムを用いて、ヒト iPS 細胞の *RAX* 遺伝子発現下でレポーター遺伝子 tdTomato の発現を誘導できる RAX-tdTomato 細胞を樹立した。本細胞株を用いて SEAM での詳細なシングルセルレベルでの発現時期を検討するために、タイムラプス蛍光顕微鏡によって SEAM 形成を経時的に観察し、*RAX* 発現細胞の局在を解析した。その結果、RAX は iPS 細胞が未分化な状態ではコロニーの中央で発現していたが、分化誘導を開始して眼原基への分化が進むにつれて SEAM の 2 層目の内側に局在することが明らかとなった（図 1）。RAX は初期網膜に発現することが知られており、SEAM の 2 層目も将来網膜へ分化する領域であることがわかっているが、今回観察できた RAX の局在においては、これらの知見と一致した発現分布を取っていることがわかった。また、RAX 発現細胞と関連する眼発生に関わるマーカーとの関連を調べるために、RAX 遺伝子発現細胞と近接した細胞集団に着目し、眼の発生に関わるマーカー蛋白質に対し免疫染色を行い、RAX の局在と比較した。この結果として、眼表面、神経・網膜、水晶体のマーカーとなる蛋白質を発現する細胞と RAX 蛋白質を発現する細胞の局在の一致あるいは相違を図 2 に示した。さらに、RAX の発現量によって、各種マーカー遺伝子の発現がどのように異なるのかを調べるために、分化誘導の各時期で FACS によって tdTomato の強陽性、弱陽性、陰性細胞集団に分離して、各細胞群におけるマーカー蛋白質の遺伝子発現の継時変化を解析した。その結果、これらの遺伝子は

これまでに眼の発生過程で知られている遺伝子カスケードと比較的一致した発現パターンを示しているものが多いことがわかった（図 3）。これらの研究を通して、SEAM モデルにおいては眼の発生過程を 2 次元で詳細に模倣できていることが確認できた。今後はこの系を用いてさらに解析を進めていくことで、眼の発生初期における RAX の時間的・空間的発現や眼発生に関わる他の遺伝子との相互作用について検討を行っていく。

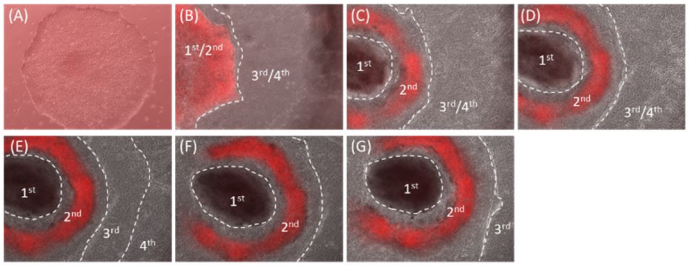

図1. RAX-tdTomato iPS細胞のSEAM形成時におけるRAX発現細胞の局在変化
(A)培養10日目の未分化な状態、分化誘導開始後7日目(B) 、14日目(C)、18日目(D)、21日目(E)、23日目(F)、28日目(G)におけるRAX陽性細胞の局在。赤：tdTomato

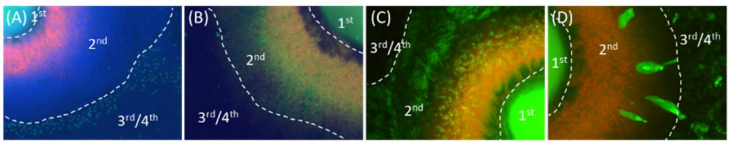

図2. RAX-tdTomato iPS細胞のSEAM形成時におけるマーカー遺伝子の発現
分化誘導4週目で免疫染色を行った。(A)p63（緑）とPAX6（青）、(B)CHOX10（緑）、(C)tubblin3（緑）、(D)α-Crystallin（緑）。赤は全てtdTomatoによるRAXの発現部位を示している。

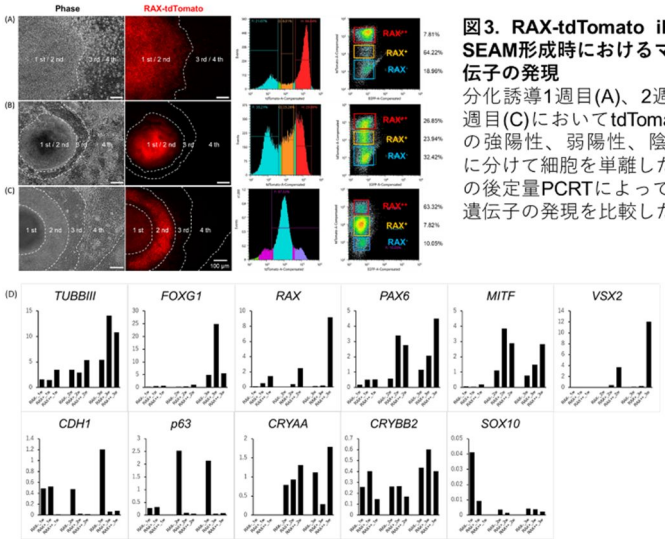

図3. RAX-tdTomato iPS細胞のSEAM形成時におけるマーカー遺伝子の発現
分化誘導1週目(A)、2週目(B)、3週目(C)においてtdTomatoの発現の強陽性、弱陽性、陰性の分画に分けて細胞を単離した。 (D)その後定量PCRTによってマーカー遺伝子の発現を比較した。

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