

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02657

研究課題名(和文) シングルセルRNA-seq解析による網膜発生の分子機構の解明

研究課題名(英文) Study of molecular mechanisms of retinal development by single cell RNA-seq analysis

研究代表者

古川 貴久 (Furukawa, Takahisa)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：50260609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、中枢神経系の一部である網膜の発生と維持の遺伝子制御機構の解明やシナプス形成の分子機構、さらには網膜色素変性症などの発症機構の解析を行ってきた。我々が一細胞転写プロファイル解析を行って同定した網膜の発生や機能に関わる候補遺伝子群についてマウス網膜における機能解析を行った。候補遺伝子のノックアウトマウスやダブルノックアウトマウスを作製し、電気生理学的解析や組織学的な解析を行った。網膜グリア細胞の発達期に発現するRax遺伝子の細胞および時期特異的なノックアウトマウスの解析から、Rax遺伝子が網膜グリア細胞の炎症反応を抑制し、網膜の恒常性を維持していることを見出し、論文として報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、中枢神経系における発生と機能の分子メカニズムの理解の進歩に貢献するとともに、網膜変性症を含む失明にいたる網膜疾患の治療法開発の基盤となると期待される。

研究成果の概要(英文)：We have studied molecular mechanisms underlying retinal development, including neuronal and glial cells, synapse formation, and retinal degeneration. In the current study, we identified candidate genes involved in retinal development and function by scRNA-seq analysis. We analyzed their possible functions in the mouse retina. We generated knockout and double-knockout mice and performed electrophysiological analysis and histological analysis. We carried out inducible Muller glial cell-specific Rax knockout mice. We found that ax suppresses inflammation in Muller glial cells and regulates retinal homeostasis. We reported these results as a research journal paper.

研究分野：神経発生学

キーワード：網膜 神経細胞 グリア細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外界の光情報を検知する網膜は、後に間脳になる脳領域が胎生期に膨出して形成される中枢神経系の組織である。脳や網膜を含む中枢神経系が高次神経機能を発揮するためには、多様な神経細胞が正確な神経回路を形成し、光情報をはじめとする外部環境情報を適切に処理・統合することによってはじめて成立する。中枢神経系の構築と機能発現の分子メカニズムの理解と中枢神経系の異常に起因したヒト疾患の克服は、神経科学研究において重要なチャレンジの一つである。より具体的な問いとしては、神経細胞やグリア細胞(回路素子)がどのようなメカニズムで未分化前駆細胞から適切に分化し正しく位置するのか、神経細胞はどのようなメカニズムで正しい相手と特異的にシナプスを形成(選択的シナプス形成)し、精密な回路を構築するのか、形成された神経回路はどのようなメカニズムで高次神経機能を発揮できるのか、これらの過程の異常とヒト疾患の病態との関連の理解とヒト疾患をいかに克服できるか、である。申請者は、これらの問いに網膜を研究対象に選んでチャレンジしてきた。

網膜には、光センサー細胞である視細胞、介在ニューロンであるアマクリン細胞、水平細胞、二次ニューロンである双極細胞、そして脳への出力を担う神経節細胞の、大別して5種類の神経細胞が3層に分かれて存在するが、これらはミューラーグリア細胞も含めすべて共通の未分化前駆細胞から細胞周期を出て、細胞運命決定され分化成熟する。網膜は中枢神経系由来の神経組織であるが、脳における様々な機能単位となる神経核のように入力と出力が入り組んでおらず、情報が一方向のみに流れるシンプルな神経組織である。また明瞭な細胞形態と層構造を有し、生体レベルの実験も行いやすい。したがって網膜は、中枢神経系発生における重要な問題の基本的分子メカニズムや原理を解明し理解するのに役立つユニークな組織である。また網膜視細胞は、加齢黄斑変性や網膜色素変性症などの網膜変性疾患において障害され視覚障害を引き起こす。その治療のために再生医療や人工網膜などが期待されているが、患者達が望む細かいものが見えるレベルの視覚を再建するには未だ道のりは遠いのが現状であり、その実現には網膜の発生と回路機能のメカニズムの理解を深める基礎研究による下支えが重要である。

2. 研究の目的

本研究においては、これらの問題の解明を目指して、網膜の発生に関わる因子を、発生期マウス網膜を用いた一細胞 RNA-seq 解析によって、発生過程の遺伝子発現プロファイルを一細胞レベルの解像度で可視化することによって同定し、それらの機能とその作用メカニズムを生体レベルで明らかにし、中枢神経系の発生の分子メカニズムや網膜視覚回路の機能発現の理解に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

マウス網膜を氷冷 D-PBS にて摘出し、液体窒素で凍結させた。ジギトニンの含まれている溶解バッファーを用いて細胞核を単離、精製した。10,000 細胞核になるように濃度を調整し、10X Chromium によって一細胞核 RNA-seq 解析を行った。取得したデータは R 言語 Seurat および関連解析ツールを用いて前処理をし、UMAP の作成および既知細胞マーカーの発現パターンにより細胞型アノテーションを行った。

レトロウイルスを用いた細胞系譜解析については、アルカリホスファターゼあるいは GFP および目的の遺伝子を IRES の後に組み込んだプラスミドをウイルス産生用 HEK293 細胞に

トランスフェクションして、細胞上清を超遠心して濃縮し作製した。生後0日のマウス網膜下に濃縮ウイルス液インジェクションし、14日-1ヶ月後に網膜を採取し観察した。

また、ミユラーグリア細胞特異的にCre活性を誘導できるRlbp1-CreERT2トランスジェニックマウスを作製し、これを用いて生後のミユラーグリア細胞特異的にRaxを欠損させたコンディショナルKOマウス(Rax iCKOマウス)の網膜に対して、ストレス条件下の組織学的解析および、FACSソーティングしたミユラーグリア細胞のRNA-seq解析による発現変動遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

私たちは本研究において、網膜の細胞運命決定と成熟に関わる因子を、発生期マウス網膜を用いた一細胞RNA-seq解析によって、発生過程の遺伝子発現プロファイルを一細胞レベルの解像度で可視化することによって同定し、それらの機能とその作用メカニズムを生体レベルで明らかにし、中枢神経系の発生の分子メカニズムや網膜視覚回路の機能発現の理解に貢献することを目指した。私たちが、生後マウス網膜の一細胞RNA-seq解析(図1)によって同定した複数の候補遺伝子の中から、網膜未分化前駆細胞から視細胞前駆細胞へと分化するに従って特異的に発現が増加する機能未知な蛋白質をコードする遺伝子群を同定した。レトロウイルスベクター(LIA)を用いて、当該転写因子群の遺伝子発現による細胞系譜解析を行い、網膜の細胞分化に影響を与えるか検証した。マウス網膜を用いたシングルセルRNA-seq解析とレトロウイルスを用いた機能解析から、アマクリン細胞に分化する過程に特異的に発現する遺伝子として網膜における機能未知のbHLH型転写因子を同定した。レトロウイルスを用いた網膜未分化前駆細胞における当該転写因子の発現により、アマクリン細胞の分化が有意に促進されることを見出した。当該遺伝子のノックアウト(KO)マウスを作製し、組織学的解析や網膜電図解析などを行ってアマクリン細胞の発生を検証したところ、野生型コントロール網膜と比較して有意な差が観察されなかった。このbHLH型転写因子と類似したbHLH型転写因子をコードする遺伝子がマウスゲノムに存在していることから機能補償している可能性が考えられたため、これら2つの遺伝子のダブルKOマウス網膜の表現型を検証する必要が生じた。もう一方のbHLH遺伝子のコンベンショナルKOマウスは新生児致死になることが知られていることから、網膜特異的なCKOマウスを作製する必要が生じた。私たちは、ゲノム編集技術を用いて2つのloxP配列を遺伝子に挿入したマウス系統を作製し、発生期網膜に特異的にCreを発現するDkk3-Creマウス(Sato *et al.*, Genesis, 2007, 45: 502)と掛け合わせて、網膜特異的ダブルCKOマウスの作製を進めている。さらに網膜未分化前駆細胞から視細胞前駆細胞へと分化するに従って発現する機能未知のBTBドメイン蛋白質のKOマウスを作製し、機能解析を行っている。

網膜神経細胞と同じく共通未分化前駆細胞から発生してくるミユラーグリア細胞は、網膜の生理機能や構造の維持を含め多彩な役割を有すると考えられており、網膜疾患における役割も注目されている。さらに近年、損傷した網膜において、ミユラーグリア細胞が網膜幹細胞化しうるポテンシャルについても報告されている。生後マウス網膜のシングルセル RNA-seq 解析のプロファイルから、発生期以降のマウス網膜のミユラーグリア細胞に Rax が発現していることを見

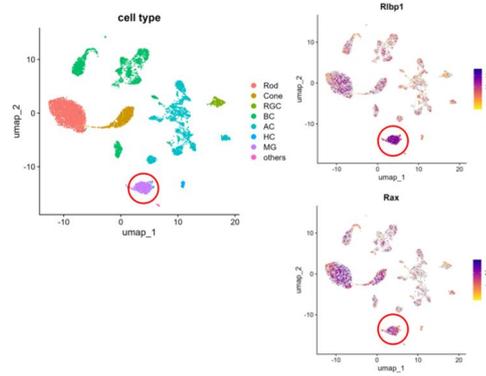


図1. マウス網膜の一細胞 RNA-seq 解析の U-MAP プロット Cell type:網膜の各細胞タイプ。Rod: 桿体視細胞、Cone:錐体視細胞、RGC:神経節細胞、BC:双極細胞、AC:アマクリン細胞、HC:水平細胞、MG:ミユラーグリア細胞。Rlbp1:ミユラーグリア細胞のマーカー遺伝子。赤丸:ミユラーグリア細胞。

出した(図1)。しかしながら、ミューラーグリア細胞における *Rax* の機能はよく分かっていなかった。私たちは、ミューラーグリア特異的に CreERT2 の発現を誘導できる Rlbp1-CreERT2 マウスを作製し、生後にミューラーグリア細胞特異的に *Rax* を欠損させた網膜の解析を行った。Cre の活性を Cre 依存性 TFP 発現マウスでモニターできるようにかけ合わせを行った。まず私たちは、Rlbp1-CreERT2 マウスの出生後4日にタモキシフェン注射し、1か月齢で網膜を回収し免疫染色を行って解析したところ、*Rax* CKO マウスではグリオシスの増加が観察された(図2)。一方、1ヶ月齢の成熟期にタモキシフェンを注射し、2か月齢で回収したマウスでは、グリオシスは観察されなかった。この結果から、*Rax* は

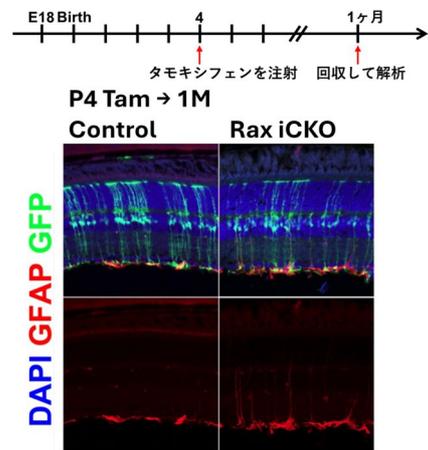


図2. 生後4日目にて *Rax* iCKO マウスにタモキシフェンを注射し、1か月齢で回収した網膜の免疫染色像。GFP: ミューラーグリア細胞マーカー、DAPI: 細胞核染色。

発生後期のミューラーグリア細胞において重要な機能を有しているが、成熟したミューラーグリア細胞においては必須でないことが示唆された。そこで私たちは、ミューラーグリア細胞における *Rax* CKO に伴う遺伝子の変動を見るため、Cre 依存性に TFP を発現したミューラーグリア細胞のみ FACS ソーティングで濃縮して RNA-seq 解析を行った。TFP 陽性のミューラーグリア細胞は平均約 16,000 個ソーティングされた。RNA-seq 解析の結果を基に遺伝子発現変動解析を行ったところ、候補となった遺伝子群の中で、*Socs3* 遺伝子の発現が

低下していることを見出した(図3)。そこで、*Rax* が *Socs3* を直接的に制御しているかどうか検証するために、NIH3T3 細胞を用いてルシフェラーゼを行った(図4)。レポーターに使用した *Socs3* プロモーターは *Socs3* の上流 2.4kb のプロモーターをレポーターとして用いた。*Rax* の結合配列が 2 か所存在する。レポータープラスミドとしては、*Socs3* プロモーター、プロモーター上に存在する *Rax* の結合配列を変異させた *Socs3*-mut2 プロモーターの 2 種類を使用した。NIH3T3 細胞にレポータープラスミドとして上記の 2 種類を、発現プラスミドとして *Rax* を同時に導入することでルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、変異が入っていない *Socs3* プロモーターにおいては、*Rax* の導入によりルシフェラーゼ活性の上昇が認められたのに対して、*Rax* 結合配列が変異した *Socs3* プロモーターにおいては、*Rax* を導入してもルシフェラーゼ活性は上昇しなかった。この結果から、*Rax* が直接的に *Socs3* を転写制御していることが示唆された。

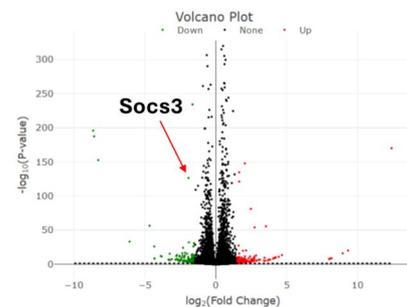


図3. ミューラーグリア細胞における *Rax* 欠損により発現変動する遺伝子のボルケイノプロット。

これらの結果から、*Rax* は、発達期マウス網膜における *Socs3* の発現活性化を通じてミューラーグリア細胞の炎症を抑制し、網膜の恒常性を維持していることが明らかになった(Yoshimoto *et al.*, *J Biol Chem.* 2023, 299:105461)。

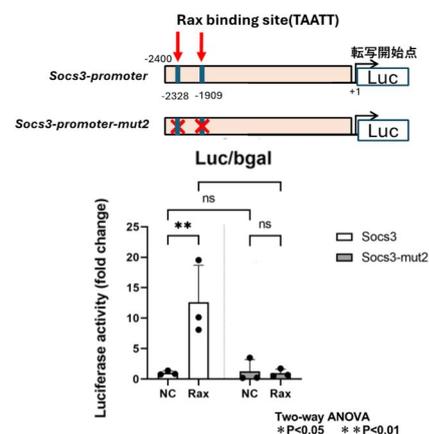


図4. *Socs3* 遺伝子プロモーター (*Socs3*-promoter) の *Rax* による転写活性のルシフェラーゼアッセイ。

また私たちは、網膜に高発現し中枢神経系特異的な発現を示すマイクロ RNA の miR-124a の多重 KO マウスや多重 KO ES 細胞の神経細胞分化システムを用いてバイオインフォマティック解析を行い、miR-124a の機能メカニズムの一端を明らかにした(Chaya, Maeda *et al.*, *J Biol Chem.* 2022,298:102293)。

以上述べた私たちの研究によって、網膜における発生や機能メカニズムの一端が明らかとなった。この成果は、網膜疾患の発症機構の解明や進行の抑制ならびに治療法の確立につながる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tsutsumi Ryotaro, Chaya Taro, Tsujii Toshinori, Furukawa Takahisa	4. 巻 298
2. 論文標題 The carboxyl-terminal region of SDCCAG8 comprises a functional module essential for cilia formation as well as organ development and homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101686 ~ 101686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101686	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Chaya Taro, Maeda Yamato, Sugimura Ryo, Okuzaki Daisuke, Watanabe Satoshi, Varner Leah R., Motoooka Daisuke, Gyoten Daichi, Yamamoto Haruka, Kato Hidemasa, Furukawa Takahisa	4. 巻 298
2. 論文標題 Multiple knockout mouse and embryonic stem cell models reveal the role of miR-124a in neuronal maturation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102293 ~ 102293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sugita Yuko, Furukawa Takahisa	4. 巻 501
2. 論文標題 Effect of Green Tea and Tea Catechin on the Visual Motion Processing for Optokinetic Responses in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 42 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2022.08.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsutsumi Ryotaro, Chaya Taro, Tsujii Toshinori, Furukawa Takahisa	4. 巻 298
2. 論文標題 The carboxyl-terminal region of SDCCAG8 comprises a functional module essential for cilia formation as well as organ development and homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101686 ~ 101686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101686	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Whittaker D.E., Oleari R, Gregory L.C., Le Q.P., Williams H.J., Torpiano J.G., Formosa N, Cachia M.J., Field D, Lettieri A, Ocaka L.A., Paganoni A.J.J., Rajabali S.H., Riegman K.L.H., De M.L.B., Chaya T, Robinson I.C.A.F., Furukawa T, Cariboni A, Basson M.A, Dattani M.T.	4. 巻 131
2. 論文標題 A recessive PRDM13 mutation results in congenital hypogonadotropic hypogonadism and cerebellar hypoplasia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e141587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI141587	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Gyoten Daichi, Ueno Shinji, Okado Satoshi, Chaya Taro, Yasuda Shunsuke, Morimoto Takeshi, Kondo Mineo, Kimura Kazuhiro, Hayashi Takaaki, Leroy Bart P., Woo Se Joon, Mukai Ryo, Joo Kwangsic, Furukawa Takahisa	4. 巻 212
2. 論文標題 Broad locations of antigenic regions for anti-TRPM1 autoantibodies in paraneoplastic retinopathy with retinal ON bipolar cell dysfunction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 108770 ~ 108770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2021.108770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chaya Taro, Ishikane Hiroshi, Varner Leah R, Sugita Yuko, Maeda Yamato, Tsutsumi Ryotaro, Motoooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Furukawa Takahisa	4. 巻 31
2. 論文標題 Deficiency of the neurodevelopmental disorder-associated gene Cyfip2 alters the retinal ganglion cell properties and visual acuity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 535 ~ 547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Pensieri Pasquale, Mantilleri Annabelle, Plassard Damien, Furukawa Takahisa, Moya Kenneth L., Prochiantz Alain, Lamonerie Thomas	4. 巻 8
2. 論文標題 Photoreceptor cKO of OTX2 Enhances OTX2 Intercellular Transfer in the Retina and Causes Photophobia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 ENEURO.0229-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0229-21.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chaya Taro, Furukawa Takahisa	4. 巻 169
2. 論文標題 Post-translational modification enzymes as key regulators of ciliary protein trafficking	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 633 ~ 642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kubo Shun, Yamamoto Haruka, Kajimura Naoko, Omori Yoshihiro, Maeda Yamato, Chaya Taro, Furukawa Takahisa	4. 巻 11
2. 論文標題 Functional analysis of Samd11, a retinal photoreceptor PRC1 component, in establishing rod photoreceptor identity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83781-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 古川貴久
2. 発表標題 タンパク質輸送から見た繊毛病のメカニズムの解析
3. 学会等名 第41回 日本糖質学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮之原由己, Tu Hung-Ya, 古川貴久
2. 発表標題 RNA-seq解析による網膜神経細胞の発生を制御する分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Leah Varner, 茶屋太郎, 前田和, 堤峻太郎, 古川貴久
2. 発表標題 Functional analysis of the deubiquitylating enzyme Otud7b in the retina
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉本拓矢, 茶屋太郎, 木村和博, 古川貴久
2. 発表標題 ホメオタンパク質 Rax のミュラーグリア細胞における生体機能の解析
3. 学会等名 第15回RRM
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koki Kobayashi, Taro Chaya, Yamato Maeda, Takahisa Furukawa
2. 発表標題 Functional analysis of the Transducin subunit-binding protein Unc119 in the retina
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉田祐子, 古川貴久
2. 発表標題 The effect of green tea and tea catechin on the optokinetic responses in
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuko Sugita
2. 発表標題 The effect of catechin contained in green tea on temporal characteristic of optokinetic responses in mice
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会/第1回 CJK 国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林康暉, 茶屋太郎, 前田和, 古川貴久
2. 発表標題 網膜におけるトランスデュースン結合タンパク質UNC119の機能解析
3. 学会等名 第67回 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮之原由己, Hung-Ya Tu, 古川貴久
2. 発表標題 シングルセルRNA-seq法によるマウス網膜細胞運命決定機構の解析
3. 学会等名 第67回 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堤峻太郎, 茶屋太郎, 古川貴久
2. 発表標題 ゲノム編集を用いた新しい織毛病モデルマウスの作出とその分子病態メカニズムの解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮之原由己, Hung-Ya Tu, 古川貴久
2. 発表標題 シングルセルRNA-seq解析による網膜神経細胞の発生を制御する分子メカニズムの探索
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林康暉, 茶屋太郎, 前田和, 古川貴久
2. 発表標題 トランスデューシン サブユニット結合タンパク質Unc119の網膜における機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学蛋白質研究所分子発生学研究室 業績集 http://www.protein.osaka-u.ac.jp/furukawa_lab/achievements.html

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
---------	---------