

研究課題別評価

1 研究課題名: 網膜光受容体細胞の運命決定機構と再生

2 研究者氏名: 古川 貴久

3 研究の狙い:

網膜視細胞(光受容体細胞)は哺乳類において唯一の光センサーであり、昔より生理学的、生化学的、解剖学的、および臨床眼科学的に盛んに研究されてきた。しかし驚くべきことに、その分化発生機構は全くといっていい程不明であった。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。失明あるいは重篤な視力障害もたらず網膜変性症の原因解明と治療は待ち望まれている。また網膜色素変性症のみならず糖尿病性網膜症、黄斑部変性症などの多くの網膜疾患で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極めて重要である。網膜視細胞の運命決定機構の解明を目指して2つのプロジェクトの展開を目指した。

[Crx の発現制御機構の解明]

Crx は分化しつつある網膜視細胞特異的にもっとも早い時期から発現する特異的のマーカで、Crx の発現を開始する機構を明らかにすることが、網膜視細胞の分子機構を明らかにする最短経路であると考えられる。

[錐体の発生分化にかかわる遺伝子の単離]

脊椎動物の網膜視細胞は杆体と錐体の2種類から構成される。杆体は薄暗い所での視覚を担当し、錐体は昼間視と色覚を担当する。ヒトの視覚の主役は錐体であり、先進国において大きな失明原因のひとつとなっている黄斑部変性症などで主に障害されるのはこの錐体である。その重要性にもかかわらず、錐体の数が光受容体細胞数全体の約5%と少なく、また錐体の発生は網膜形成直後の早い時期におこることから、その発生分化のメカニズムはほとんど解明されてこなかった。錐体の発生分化に重要な役割を果たす遺伝子の単離を試みた。

4 研究成果:

我々は以前より網膜視細胞の発生機構を明らかにすべく研究してきた。以前の研究において、我々は網膜視細胞と松果体に特異的に発現する転写因子 *Crx* を単離し、いくつかの網膜変性疾患の原因遺伝子であることを明らかにした。その後、ノックアウトマウスの解析により、*Crx* が視細胞における光受容反応および松果体におけるメラトニン合成に重要であることを示した。しかしながら、*Crx* のホモ接合ノックアウトマウスにおいても視細胞の初期発生がみられることから、*Crx* と機能的に重複する遺伝子の存在が示唆されていた。そこで今回、*Crx*と同じ*Otx*ファミリーに属し、網膜における発現が報告されている *Otx2* に注目した。*Otx2* はショウジョウバエの遺伝子 *orthodenticle* の哺乳類におけるホモログとしてクローニングされ、前脳、中脳、松果体、神経網膜、網膜色素上皮といった組織における発現が報告されている。我々は今回の研究において、視細胞が網膜幹細胞から分化する際の最初の鍵を握る遺伝子が *Otx2*であることを明らかにした。

まず、*in situ* hybridization により *Otx2*の時間的、空間的発現パターンを *Crx*と比較した。*Otx2*の神経網膜における発現は *Crx*よりもやや先行して発生過程の視細胞にみられ、胎生期網膜では *Crx*の発現パターンに類似していたが、生後網膜では視細胞での発現がほとんどみられなくなった。次に、*Otx2*の網膜視細胞発生における役割を調べるために、コンディショナルノックアウトマ

ウスを解析した。*Otx2* のホモ接合ノックアウトマウスは胎生致死であるので、*Crx* プロモーターの制御下に網膜視細胞および松果体において特異的に *Otx2* の発現が消失するようなコンディショナルノックアウトマウスを作成した。*Otx2* コンディショナルノックアウトマウスでは、網膜視細胞の発生はみられず、網膜神経細胞の一種であるアマクリン細胞が著明に増加していた。これは、本来であれば網膜視細胞に分化すべき細胞が、*Otx2* の機能消失により、アマクリン細胞へと細胞運命を転換したことによると考えられる。また、松果体は完全に欠損していた。*Otx2* コンディショナルノックアウトマウスの網膜における各種転写因子の発現を調べたところ、*Crx* の発現が著しく低下していた。また、レトロウイルスベクターを用いてラットの網膜未分化前駆細胞に *Otx2* を強制発現させるとアマクリン細胞、双極細胞、ミュラー細胞への分化が抑制され、視細胞への分化が促進されることが明らかになった。さらに、*Crx* のプロモーター領域を用いてルシフェラーゼアッセイを行い、*Otx2* が *Crx* プロモーター上の OTX 結合部位を介して *Crx* の発現を制御することを示唆するデータが得られた。これらの結果から、*Otx2* は網膜視細胞の運命決定に必要なかつ十分であり、また *Crx* の上流遺伝子として働くことが示された。

今回の研究で、*Otx2* が網膜視細胞および松果体の初期発生を制御する最上流に位置する遺伝子であることが明らかになった。今後、網膜幹細胞や神経幹細胞に *Otx2* を導入することにより、視細胞への分化誘導が可能になることが期待される。今回の研究は、現在の医学では治療の方法がない難治性網膜疾患の治療につながる研究であると考えられる。

5 自己評価:

我々は網膜視細胞特異的なノックアウトマウスの系を開発した。この系を用いて、網膜視細胞の運命決定の鍵となる遺伝子が *Otx2* であること、さらに *Otx2* は網膜幹細胞を視細胞に誘導できるマスター遺伝子としての機能を持つことを明らかにした。以前の一連の *Crx* 関係の仕事と合わせ、視細胞の分化の経路の主要な部分は解明できたのではないかと思う。実際、2004年12月のハーバード大学医学部での招待講演の講演者紹介で、「Takahisa のここ数年の努力によって、以前はほとんど分かっていなかった網膜視細胞の発生の主要な点はだいたい解明されたと言って過言ではないだろう」とのコメントを頂いた。現在は、マスター遺伝子の *Otx2* の発現がどのような機序で視細胞において活性化されるのかを解明すべく、研究を継続している。この点が解明できれば、視細胞の運命決定と分化を最終的に解明できるだけでなく、ニューロンの分化一般の理解に大きくつながるのではないかと期待している。また、我々が論文に報告し特許も申請している、*Otx2* の視細胞分化誘導能をもとにした応用が既に報告されはじめている。例えば、毛様体に存在するヒトの網膜幹細胞を *Otx2* によって視細胞へ効率よく誘導できた結果が報告された。今後の網膜疾患の *Otx2* を用いた移植再生治療の発展を期待したい。

一方、錐体細胞の分化の解明に関しては大きな進展を得ることはできなかった。マーキングされた少数の錐体を生体の網膜から FACS ソーティングにより単離し、桿体との遺伝子発現を比較解析するという手法であったが、少数の細胞からの材料を用いた解析は、テクニカルに予想以上にチャレンジングであった。現在は担当の研究員を交代し、研究を継続している。是非、少数の細胞からの遺伝子比較解析の技術を確立して、他の様々な系の解析にも応用したいと考えている。

また、我々は網膜視細胞特異的なノックアウトマウスの系を活かして、様々な重要な遺伝子の機能の生体レベルでの解析も行っている。ニューロンは明確な細胞極性を持っており、その極性形成のメカニズムの解明は神経科学の重要なテーマのひとつである。最近、我々は、網膜視細胞特異的なノックアウトマウスの系を用いて視細胞という極性をもったニューロンのメカニズムの一端を生体レベルで明らかにした(論文投稿中)。この研究をはじめとして、新しい網膜特異的遺伝子の同定と解析など、いくつかの研究の結果がまとめ、PRESTO の成果として投稿中である。これは、グループメンバーがいたからこそ成し遂げられた事であると確信しており、ポスドク参加型のプロジェクトであることの大きな利点だと感謝したい。3年間という期間は短かったが、そこでの「成果」だけでなく、得られた「種」をもとにさらに研究を進展させていくつもりである。

6 研究総括の見解:

本研究領域を対象としている研究者は多い。その中であって着実に成果をあげてきていることを評価する。細胞の運命決定と分化メカニズムの解明という基本課題の解決にどのように焦点をしばって迫っていくか。視細胞系という特徴ある実験系に取り組んでいるだけに、今後を期待する。

7 主な論文等:

1. Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I., Furukawa, T.
Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development.
Nature Neuroscience, 6: 1255-1263
2. Morrow, E.M., Furukawa, T., Raviola, E., Cepko, C.L.
Synaptogenesis and outer segment formation are perturbed in the neural retina.
BMC Neuroscience, in press (2005)
3. Koike, C., Nishida, A., Akimoto, K., Ohno, S., Furukawa, T.
aPKC is for polarity formation in retinal photoreceptor cells and total retinal lamination *in vivo*. (submitted)
4. Terada, K., Kitayama, A., Kanamoto, T., Ueno, N., Furukawa, T.
Nucleosome regulator HMGB3 controls retinal proliferation as a novel downstream target of *Xenopus rax/XRx1*. (submitted)
5. Inoue, T., Terada, K., Furukawa, A., Tamaki, Y., Araie, M., Furukawa, T.
Cloning and characterization of mr-s, a novel SAM-domain protein, predominantly expressed photoreceptor cells. (submitted)
6. Kanamoto, T., Terada, K., Yoshikawa, H., Furukawa, T.
Cloning and expression pattern of *lhx3*, a novel chick homeobox gene. (submitted)
7. Nishida, A., Furukawa, A., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I., Furukawa, T.
Redundant roles of *Otx2* and *Crx* homeobox genes in retinal photoreceptor and bipolar cell development. (submitted)

総説

1. 古川晶子、古川貴久(2003)
「網膜視細胞の発生、維持を制御する転写因子 *Crx*」
「眼科診療プラクティス」(文光堂)Vol.6
2. 井上達也、西田明弘、古川貴久(2004)
「網膜視細胞の分化機構」
「蛋白質 核酸 酵素」(共立出版)Vol.49 1413-1420
3. 西田明弘、古川貴久(2004)
「網膜視細胞の運命を決定する遺伝子は *Otx2* であった」(2004)
「細胞工学」(秀潤社)Vol.23 204-205
4. 古川晶子、古川貴久(2004)
「網膜の再生医学-遺伝子治療、移植・再生治療、人工網膜について」
「ケミカル・エンジニアリング」(化学工業社)Vol.49 453-456

特許

発明の名称: *Otx2* 遺伝子を用いた網膜視細胞の再生と新生
発明者: 古川貴久

出願番号: 特願 2003-026353

出願日: 平成 15 年 2 月 3 日

出願国: 日本

招待講演

海外

- 1 . Harvard Medical School, Massachusetts Eye and Ear Infirmary (平成 16 年 12 月)
- 2 . Gordon Research Conference (Pineal Cell Biology) (平成 16 年 8 月)
- 3 . Max-Planck Institute at Berlin (平成 16 年 8 月)

国内 9 件

学会発表

海外 4 件

国内 9 件