

イモリの網膜再生とヒトの外傷性網膜疾患の接点を解明
～ナチュラルな体細胞リプログラミングを単一細胞レベルで証明～

研究成果のポイント

1. 成体イモリが、分化した網膜色素上皮(RPE)細胞*¹を自らユニークな状態の多能性細胞*²にリプログラミング*³し、これらの細胞から正常な構造の網膜(神経性網膜と RPE 自身)を再生することを明らかにしました。
2. 成体イモリの再生の要である体細胞リプログラミングを単一細胞レベルで解析することに初めて成功しました。また、この体細胞リプログラミングが、iPS 細胞のような分化万能性をもつ状態までのリプログラミング(初期化)ではないことを明らかにしました。
3. 成体イモリの網膜再生の初期過程が、胚や幼生期の再生現象とは異なり、成体ヒトの外傷性網膜疾患の初期過程と多くの点で共通していることを明らかにしました。
4. この研究は、イモリとヒトの再生能力の違いを明らかにする糸口になるばかりでなく、網膜疾患の治療のための新たな生物医学的アプローチの基盤を提供するものと期待できます。

国立大学法人筑波大学(以下「筑波大学」という)生命環境系千葉親文准教授と大学院生Md. Rafiqul Islam(生命環境科学研究科博士後期課程3年)は、筑波大学生命環境系丸尾文昭助教、中村研太研究員、および国立大学法人宇都宮大学大学院工学研究科外山史准教授らと共同で、独自に開発したアカハライモリの資源・技術・情報基盤を駆使することで、成体イモリにおける網膜再生の初期過程を高い分解能で解析することに成功しました。これにより、イモリにおけるナチュラルな体細胞リプログラミングを単一細胞レベルで実証するとともに、成体イモリの網膜再生過程がユニークで完璧なメカニズムに支えられていることを明らかにしました。

網膜外傷にともなうRPE細胞のリプログラミングは、網膜の疾患と再生の分野において活発に研究されているテーマです。本研究グループは、成体イモリのRPE細胞が、胚や幼生期のように直接的に網膜幹細胞や網膜前駆細胞にリプログラムされるのではなく、成熟した細胞の特徴を一部保持したまま、初期眼胞*⁴に特徴的な遺伝子を発現するユニークな状態の多能性細胞にリプログラムされることを明らかにしました。

研究グループはまた、RPE由来の多能性細胞が、その後二つの集団に分かれ、NRの原基層(pro-NR)とRPEの原基層(pro-RPE)を正しい極性で構築することで、構造的にも機能的にも完全な網膜を再生することを明らかにしました。さらに、イモリの網膜再生とヒトの外傷性網膜疾患(例、増殖性硝子体網膜症)には、網膜外傷後のRPE細胞の挙動や遺伝子発現において、多くの共通点があることを明らかにしました。これらの発見は、イモリとヒトの再生能力の違いを分子レベルで解明する糸口になるばかりでなく、iPS細胞由来のRPEを用いた新たな網膜再生技術や、外傷性網膜疾患の薬物治療による網膜自己再生誘導技術につながる事が期待されます。

本研究成果は、2014年8月13日付「*Scientific Reports*」で公開されました。

* 本研究は、科学研究費補助金(23124502; 221S0002; 24650229; 25870096; 21300150; 24240062; 26.04097)によって実施されました。

研究の背景

網膜色素上皮(RPE)は眼球内にある組織で、神経性網膜と脈絡膜血管層の間にあり、神経性網膜の生理機能(視覚情報の処理)を支える働きをしています。分化したRPE細胞は、正常な状態では細胞分裂をしていません。しかし、神経性網膜が外傷を被ると、上皮の性質を失い細胞分裂を始めるとともに、形質を変化させます。ヒトでは、RPE細胞のこうした変化は失明につながる疾患の兆候となります。一方、再生能力に富むイモリでは、同様の過程を経て網膜を再生します。そのため、ヒトの外傷性網膜疾患の治療と網膜再生を研究する上で、イモリの網膜再生系がよいモデルとなります。

成体アカハライモリ(*Cynops pyrrhogaster*)の眼球から実験的に神経性網膜をすべて取り除くと、RPE細胞は細胞どうしの結合を失うとともに、足場である基底膜から遊離し、細胞塊を形成するようになります。こうしたRPE細胞は術後5日から10日の間にDNA合成期(細胞周期S期)に到達し、14日にかけて神経性網膜の原基層(pro-NR)とRPEの原基層(pro-RPE)を形成します。pro-NRとpro-RPEはその後、約50日をかけて神経性網膜とRPE自身を再生します。

本研究グループはこれまでに、術後10日のほぼすべてのRPE細胞が、神経幹細胞マーカーであるMusash1を細胞質に発現することを明らかにしています。このことから、成体イモリのRPE細胞は、神経性網膜の外傷後10日以内に多能性を獲得すると考えられてきました(このRPE由来細胞はStem-like細胞と呼ばれてきました)。

研究内容と成果

本研究では、成体イモリのRPE細胞がどのような状態の多能性細胞に変化するのかを調査しました。研究グループは、「神経性網膜とRPEの両方を生み出せる細胞に変化するのではないか」という仮説を立てました。このような能力のある細胞としてはこれまでに、初期眼胞の神経上皮細胞、後期眼胞や眼盃の網膜幹細胞/網膜前駆細胞そのほか報告されています。研究グループは、これらの細胞に共通して発現する転写因子Pax6^{*5}(神経性網膜とRPEの分化運命の決定に重要な転写因子)に注目し、この因子が成体イモリのRPE由来Stem-like細胞にも発現するかどうかを調べました。

まず、イモリのPax6遺伝子を発現と機能の面から同定し、その進化的保存性を確認しました[この解析には、本研究グループが世界に先駆けて確立したイモリの高効率トランスジェニック技術(遺伝子機能解析技術の一つ)が初めて適用されました; *Nature Protocols* 5, 600-607 (2011)]。

次に、その発現を成体イモリのRPE由来Stem-like細胞について調べました。免疫組織化学法により解析した結果、Pax6は、予想に反して、術後10日のRPE細胞(97%が細胞周期S期に達している)ではほとんど検出されませんでした(約12%)。この結果は、成体イモリのRPE由来Stem-like細胞が、先に挙げた多能性細胞とは性質が異なることを示唆しています。

この結果を受け、研究グループは次に、より検出感度の高いPCR法を用いて、多能性細胞を標識する複数の遺伝子の発現動態を調べることにしました。ここでは、Pax6に加え、iPS細胞の作製に利用される多能性因子(Sox2、c-Myc、Klf4、Oct4、Nanog)、およびPax6と同様に神経性網膜とRPEの分化運命の決定に重要な転写因子の一つであるMitfを選択しました[この解析には、本研究グループが先導して構築を進めているアカハライモリ遺伝子データベースIMORI (<http://antler.is.utsunomiya-u.ac.jp/imori/>)が利用されました]。また、他の細胞の混入を防ぐため、単一細胞レベルのPCRに挑戦しました(詳しい説明は図1をご覧ください)。

その結果、RPE細胞がももとの形態的特徴や一部の遺伝子(例えば、RPE65)の発現を保ったまま-すなわち細胞分裂を完了する前に-、新たにSox2、c-Myc、Klf4、Mitf、Pax6遺伝子を発現することがわかりました。一方、Oct4やNanogの発現は検出されませんでした。これらの結果は、成体イモリのRPE細胞が神経性網膜の外傷後すみやかに多能性細胞にリプログラムされることを示唆しています。しかし、その細胞状態はユニークで、終分化状態

を一部保ったままであることがわかりました。この結果は、イモリの体細胞リプログラミングを単一細胞レベルで証明した初めての報告です。

本研究により解明された成体イモリ網膜再生の初期過程を図2に示します。成体イモリのRPE細胞は、神経性網膜が外傷を被る(本研究では完全に除去しました)と、上皮の性質を失い細胞どうしが解離するとともに基底膜からも遊離するようになり、やがて塊を形成するようになります。こうした状態のRPE細胞は5日から10日で細胞周期S期に到達しますが、同時に*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4*、*Mitf*、*Pax6*遺伝子を発現し多能性を獲得すると考えられます(ただし、一部の終分化形質は保ったまま)。多能性を獲得したRPE細胞(RPE stem cell: RPESCと名づけました)は、10日から14日にかけて、2つの細胞集団に分かれ、一方は神経性網膜の原基層(pro-NR)を、他方はRPEの原基層(pro-RPE)を構築します。この過程で、pro-NRを構成する細胞では*Pax6*や*Sox2*の発現が高まり(免疫組織化学法により検出可能なレベルまで)、一方、pro-RPEを構成する細胞では*Pax6*や*Sox2*の発現が減少するように調節を受けます。こうした原基層の構築過程でそれぞれの細胞は増殖を始め、最終的に新たな神経性網膜とRPEを再生していきます。

一般にイモリを含む脊椎動物では、一生のうち、初期眼胞の神経上皮細胞のみが*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4*、*Mitf*、*Pax6*遺伝子を発現します。このことは、仮説の通り、成体イモリのRPE細胞が本質的に初期眼胞の神経上皮細胞(すなわち、神経性網膜とRPEの両方を生み出すことができる細胞)に相当する細胞に脱分化する可能性を示唆しています。しかし、終分化形質を保っていることや、免疫組織化学法による検出が困難な点で、初期眼胞の神経上皮細胞と同等ではなく、**再生に固有の細胞**であると言えます。

成体イモリの網膜再生系では、単一の上皮(すなわちRPE)から2つの上皮(すなわちpro-NRとpro-RPE)が正しい極性をもって形成されることがわかりました。この過程は機能的な網膜を再生するために必要なメカニズムであると考えられます。脊椎動物では一般に胚や幼生期に限って網膜再生現象(正確には未分化RPEの神経性網膜への運命転換)が観察されますが、ここではこのような過程は見られず、RPEはすべて極性を保ったまま神経上皮化してしまいます。そのため、再生した神経性網膜は極性が逆で、しかもRPEを失うため、機能しないばかりか最終的に変性してしまいます。このように、成体イモリの網膜再生は、脊椎動物一般に観察される胚や幼生期の網膜再生現象とは異なっており、より完璧なメカニズムに支えられていると言えます。

イモリの再生研究から得られた知見を医療に適用するには、イモリとヒトを直接比較する必要があります。そこで本研究では、成体イモリの網膜再生の初期過程がイモリ固有の現象か、それとも私たちヒトにも対応する現象が見られるのかを調査しました。ヒトでも、神経性網膜が外傷を被ると、RPE細胞は上皮の性質を失い遊走し増殖を始めます。しかし、これらの細胞は最終的に筋繊維芽細胞のような間葉細胞様の細胞に分化してしまいます。そのため、この変化は上皮間葉転換に分類されています。最近の研究から、RPE細胞は上皮間葉転換の過程で分化多能な段階(この細胞はRPESCと呼ばれています)を通過することが示唆されています。興味深いことに、ヒトRPESCはイモリと同様に*SOX2*、*C-MYC*、*KLF4*、*MITF*、*PAX6*を発現し*OCT4*や*NANOG*を発現しないことがわかっています(ただし*SOX2*の発現は無視できる程度)。これらのことから、イモリとヒトのRPE細胞は、神経性網膜の外傷後の挙動がよく似ており、しかもRPESCの遺伝子発現についても共通点があることが明らかになりました(図3)。

今後の展開

成体イモリ RPE 細胞のリプログラミング過程を単一細胞レベルで解析することが可能になったことから、今後、包括的な遺伝子発現解析(トランスクリプトーム解析)により、ナチュラルな脱分化/リプログラミングの詳細が明らかになると期待されます。また、イモリとヒトの接点が明らかになったことから、より包括的な比較解析のもと、イモリ型再生の概念を適用した新たな網膜疾患の治療技術の研究開発がはじまると期待されます。例えば、移植用の材料として、iPS 由来の RPE シートから神経性網膜や全網膜を作製する技術の開発や、外傷性網膜疾患を治療すると同時に網膜自己再生を誘導する新薬の開発などが期待されます。

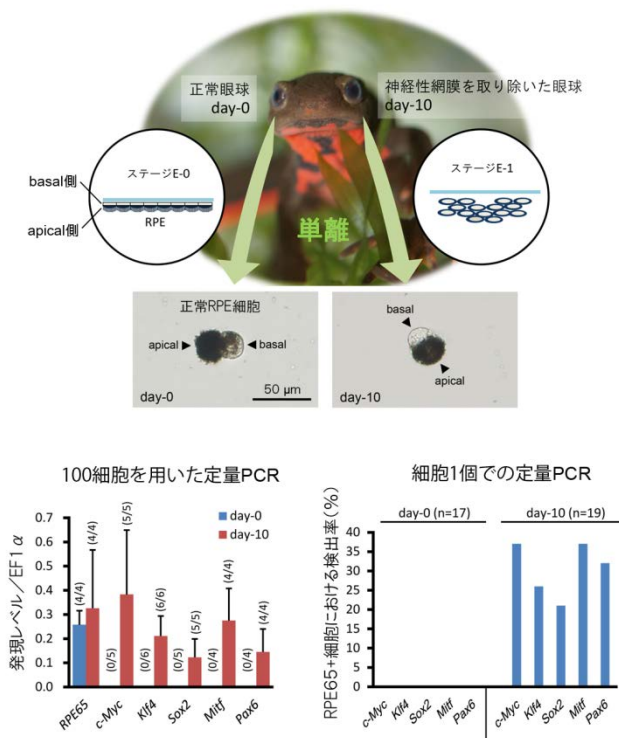


図1. 成体イモリ RPE 細胞のリプログラミング。麻酔した成体イモリの左眼球から神経性網膜を外科的に取り除き、10日間飼育しました。その後、右眼球（正常眼球；day-0）と左眼球（day-10）から RPE 細胞を単離しました。正常な RPE 細胞は、基底膜に接着している側（basal）に核をふくむ色素のない細胞体を持ち、神経性網膜と接する側（apical）にメラニン色素を含む微絨毛をもつという形態的特徴があります。この特徴をもとに RPE 細胞を同定し採取しました。day-10 には再生の進み具合が異なる RPE 細胞が含まれることが予想されましたので、細胞のステージをそろえるため、もともとの形態を未だ示す RPE 細胞（出遅れた RPE 細胞）のフラクションのみを採取しました。これらの細胞を 100 個集めて、あるいは 1 個だけで定量 PCR を行いました（グラフ）。細胞 1 個の解析では、マーカー遺伝子である *RPE65* を、細胞の同定とサンプルの品質評価にもちいました。これらの解析の結果、成体イモリの RPE 細胞が形態的特徴や *RPE65* 遺伝子の発現を失うことなく、多能性因子 (*c-Myc*, *Klf4*, *Sox2*) や *Mitf*, *Pax6* を新たに発現することが明らかになりました。

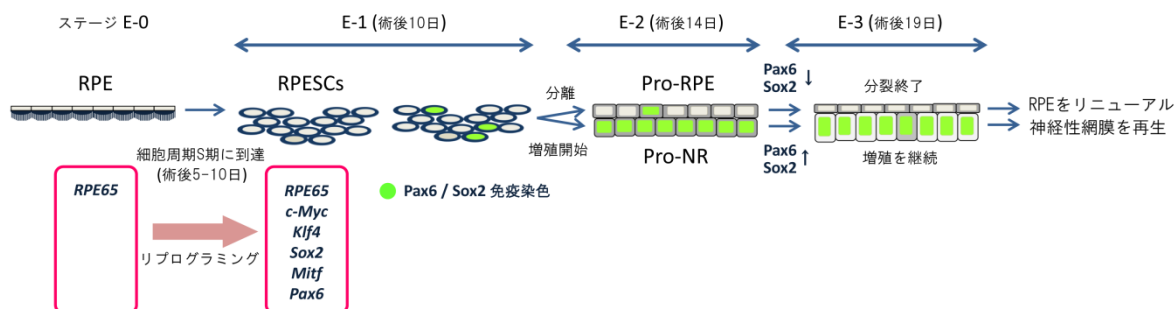


図2. 成体イモリ網膜再生の初期過程

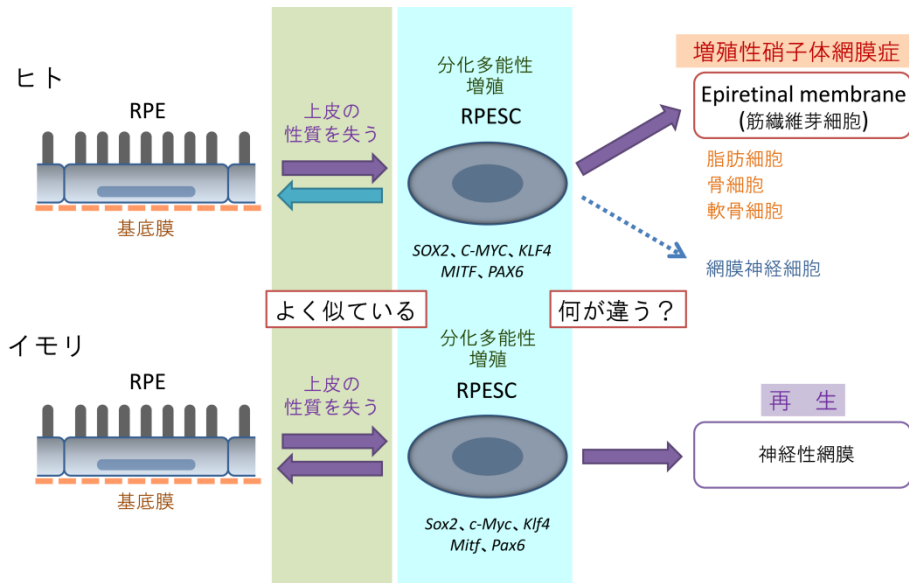


図 3. ヒトとイモリの接点。神経性網膜の外傷後に RPE 細胞が見せる挙動や遺伝子発現は、イモリとヒトでよく似ています。しかし、ヒトはイモリのように網膜を再生することはなく、筋繊維芽細胞など間葉細胞様の細胞に転換してしまいます。

用語解説

*1 網膜色素上皮(RPE) 網膜の最外層を構成するのが網膜色素上皮層で、光を感じる部位(網膜視部)への栄養補給や老廃物の消化を担っている。そのため、網膜色素上皮の機能が低下すると視覚を担う機能も低下する。iPS 細胞を用いた網膜再生医療では、ヒト iPS 細胞由来の網膜色素上皮細胞が用いられる。

*2 多能性細胞 さまざまな細胞に分化する能力を有する細胞。胚性幹細胞(ES 細胞)や iPS 細胞は多能性細胞である。

*3 リプログラミング 分化能が限定された体細胞が、さまざまな細胞に分化する能力を再び獲得する過程。この過程では、特定の遺伝子情報を読み出すように固定化された核の状態がダイナミックに変化する。iPS 細胞は、分化した体細胞を胚性幹細胞(ES 細胞)のように分化万能な状態までリプログラム(初期化)した細胞である。

*4 初期眼胞 胚の頭部に現れる眼の原基の組織で、神経性網膜(NR)と RPE の両方に分化する能力がある。

*5 転写因子 Pax6(パックス・シックス) 転写因子は遺伝子のスイッチをオンまたはオフにしたり、遺伝子の発現量を増減させたりするタンパク質。Pax6 は眼の発生や脳の発生において働く重要な因子。転写因子 Pax6 を生成する遺伝子を Pax6 遺伝子と呼ぶ。遺伝子名の場合には一般にイタリックで表記される。

掲載論文

- 【題名】 The newt reprograms mature RPE cells into a unique multipotent state for retinal regeneration
(イモリは網膜再生のために成熟した網膜色素上皮細胞をユニークな分化多能状態にリプログラムする)
- 【著者名】 Md. Rafiqul Islam, Kenta Nakamura, Martin Miguel Casco-Robles, Ailidana Kunahong, Wataru Inami,
Fubito Toyama, Fumiaki Maruo & Chikafumi Chiba
- 【掲載誌】 Scientific Reports 4, doi:10.1038/srep06043

問合わせ先

千葉 親文(ちば ちかふみ)
筑波大学 生命環境系 准教授