

論文の内容の要旨

論文題目 Role of HMG-transcription factor Sox2 in the mouse retinal development

(Sox2 転写因子のマウス網膜発生過程の役割解析)

氏名 林 雅萍

脊椎動物の中樞神経系は複雑な構造をもち、極めて多様な神経細胞集団から出来ている。このような多様な細胞集団が、発生期にどのようにして限られた神経前駆細胞集団から生み出されるかは、神経発生学において重要な研究課題である。これまでの研究から分かってきたことは、神経前駆細胞は増殖を繰り返すたびに分化する細胞腫を変えていき、決まった順序でさまざまな神経細胞種を生み出していくことである。各々の神経細胞種への運命決定を制御する分子機構として、数多くの転写因子が明らかになってきたが、これらの転写因子がどのようにして神経前駆細胞内で協同して働いているかについては、いまだ十分な理解は得られていない。

網膜は 6 種類の神経細胞と 1 種類のグリア細胞からなり、それらが結合して 3 層構造の神経組織を作っている。3 層のうちで外顆粒層には桿体視細胞と錐体視細胞が存在し、内顆粒層には双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞とミュラーグリア細胞が存在する。そして最も内側の神経節細胞層には、神経節細胞と一部のアマクリン細胞が存在する。これら 7 種類の細胞腫は、単一種類の網膜前駆細胞から決まった順序で分化する。この分化を制御する分子機構として、bHLH (basic-helix-loop-helix) 型、あるいはホメオボックス型の転写因子を中心に多くの転写因子の関与が報告されている。

本研究では、網膜前駆細胞の分化を制御する転写因子として Sox2 に着目して、マウス網膜の発生における Sox2 の作用を解析した。Sox2 は、SoxB1-HMB box 転写因子であり、マウス、ニワトリ、カエルなどさまざまな生物種を通じて、発生初期の神経組織で広く発現しており、網膜でも発現が報告されている。ヒトでは、眼の形成異常として無眼症や小眼症が知られているが、これらの疾患の 10% で Sox2 遺伝子の一座に変異を認めることから、Sox2 が網膜発生に

重要な役割を果たすと考えられているが、網膜発生における働きはいまだ十分に分かっていない。

中枢神経系では Sox2 は神経幹細胞／神経前駆細胞で発現し、前駆細胞が増殖を停止するとその発現は低下する。カエルやニワトリの初期胚を用いて、恒常的活性型の Sox2 を神経前駆細胞に強制発現させると、神経分化が阻害されて前駆細胞の状態に保たれるため、Sox2 は神経前駆細胞の未分化性の維持に関与していると考えられている。発生期網膜では、初期から網膜前駆細胞全体で発現を認めることが報告されている。カエル初期胚を用いて Sox2 の作用を阻害した実験では、眼が消失あるいはサイズが減少し、Sox2 を欠損したマウスでも同様の表現型を認めることが報告され、ヒトの無眼症、小眼症と共通する表現型を認める。これら個体レベルの解析は報告されているものの、網膜前駆細胞レベルで Sox2 がどのような分子機構によって、その発生を制御しているかについてはいまだ知見は限られている。そこで本研究では、マウス網膜における Sox2 の発現を詳細に解析し、胎児網膜体外培養系を用いて Sox2 の過剰発現と機能阻害実験を行うことで、Sox2 が網膜前駆細胞の増殖と分化に及ぼす影響を明らかにした。さらに、Sox2 による既知の転写因子の発現制御を解析することで、網膜前駆細胞において細胞の運命を決定する転写因子のネットワークについても研究を進めた。

まず、発生期網膜における Sox2 の発現を RT-PCR で調べたところ、胎生 16 日から成体に至るまで全ての時期で発現を認め、中でも生後 12 日以降で発現レベルの低下を認めた。免疫染色により Sox2 の発現部位を調べたところ、胎生 17 日から生後 1 日の発生初期には内顆粒層と前駆細胞層で発現していたが、前駆細胞が分化を終えた生後 5 日以降では神経節細胞層と内顆粒層に発現は限局した。まとめると、Sox2 は発生初期には網膜前駆細胞で発現し、分化に伴って神経節細胞層の神経節細胞と、内顆粒層に存在するアマクリン細胞とミュラーグリア細胞で発現を認めた。この結果は、Sox2 が前駆細胞から神経節細胞とアマクリン細胞、そしてミュラーグリア細胞への分化を制御している可能性を示している。

次に、Sox2 の過剰発現と機能阻害実験を行うことで、Sox2 が網膜前駆細胞の分化に及ぼす影響を調べた。外来遺伝子を網膜前駆細胞に導入するために、発生期網膜の体外培養系へのレ

トロウイルス感染を用いた。この培養系では、網膜前駆細胞は生体に近い増殖と分化を示すことが報告されている。レトロウイルスは増殖細胞に感染するために、網膜前駆細胞に外来遺伝子を導入することが可能で、IRES-EGFP カセットを用いることで遺伝子導入細胞は EGFP を共発現するため、その分化系譜を解析することができる。まず、胎生 17 日の胎児網膜から体外培養系を作成して、コントロールのレトロウイルス、あるいは Sox2 を過剰発現するレトロウイルスを添加した。まず感染 3 日後に、前駆細胞の増殖に対する影響を調べたところ、コントロールと Sox2 過剰発現の間で有意な差は認めなかった。次に、感染後 2 週間培養して、分化に対する影響を調べた。コントロールのウイルスでは、感染細胞の大部分は外顆粒層に位置し、視細胞に分化したことが確認された。一方、Sox2 過剰発現の場合、感染細胞の大部分は内顆粒層に存在していた。免疫染色を行って細胞種を同定したところ、これらの細胞は、神経節細胞とアマクリン細胞のマーカーである Hu や Pax6 を発現していた。感染細胞の中で Hu 陽性細胞の割合は、コントロールウイルスでは 5%であったのが、Sox2 過剰発現によって 70%に増加した。また Pax6 陽性細胞は、コントロールでは 6%であったのが、Sox2 過剰発現によって 65%に増加した。以上の結果から、網膜前駆細胞に Sox2 を過剰発現させると、視細胞への分化を抑制して、神経節細胞とアマクリン細胞への分化を促進することが明らかになった。

次に、RNA 干渉を利用して、網膜前駆細胞で Sox2 の機能阻害実験を行った。過剰発現の場合と同様に、発生期網膜の体外培養系を用いて、コントロール、あるいは Sox2 に対する shRNA と EGFP を共発現するレトロウイルスを加えた。コントロール、または Sox2 を機能阻害した場合のいずれでも、感染細胞の大部分は外顆粒層に存在し、視細胞へ分化したことが確認されたが、Pax6 陽性細胞を比較したところ、Sox2 機能阻害の場合に有意に Pax6 陽性細胞が減少することが確認された。以上、過剰発現と機能阻害実験の結果から、Sox2 は網膜発生において、神経節細胞とアマクリン細胞への分化を制御していることが明らかになった。

網膜前駆細胞からアマクリン細胞への分化を制御する転写因子として、NeuroD、Pax6、Six3 などが知られており、実際これらを前駆細胞に過剰発現させることでアマクリン細胞への分化が促進することが報告されている。本研究により、Sox2 がアマクリン細胞への分化を制御する

ことが示されたため、次に Sox2 とこれらの転写因子との関係を解析した。Sox2 が Pax6 の発現を制御している可能性を検討するために、Pax6 のプロモーター領域を単離して、この領域によってルシフェラーゼの発現が制御される遺伝子配列を作成した。この配列を含むベクターを単独で、あるいは Sox2 と共に Y79 培養細胞に遺伝子導入して、ルシフェラーゼ活性を測定した。コントロールと比較して Sox2 を発現させた場合には、ルシフェラーゼ活性が増加することを認め、このことから Sox2 が Pax6 に対して転写アクチベーターとして作用していると考えられた。実際、Pax6 のプロモーター領域を解析したところ、Sox2 結合配列を 1 箇所にも認めた。この結果から、網膜前駆細胞において Sox2 は Pax6 の発現を促進することによって、アマクリン細胞への分化を制御していると考えられた。

以上、本研究では網膜前駆細胞の分化に対する Sox2 の役割を解析し、Sox2 が前駆細胞から神経節細胞とアマクリン細胞への分化を制御していることを明らかにした。また、Sox2 は Pax6 の発現を促進することで、アマクリン細胞への分化を制御する作用が示唆された。