

# 網膜視細胞の発生機構—再生への期待—

## —網膜光受容体細胞の運命決定機構と再生—



古川 貴久

大阪バイオサイエンス研究所 部長

### 1. 私が知りたかったこと

網膜視細胞は錐体・桿体の2種類の細胞からなり、眼球の後方に位置し、哺乳類において唯一の光センサーとして働く(図1)。網膜色素変性症や近年先進国で著しい増加を示している老人性黄斑変性症、糖尿病性網膜症等の疾患で網膜視細胞が傷害されると、著しい視力障害を来す。これらの疾患に対しては、その進行を遅らせる以外に根本的な治療法がないのが現状である。網膜視細胞は、その解剖学および臨床的重要性から多くの研究がなされてきたが、発生メカニズムについてはまだ十分に解明されていなかった。また、松果体については、体内リズムとの関連について多くの研究がなされてきたが、その発生メカニズムは不明であった。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いる。

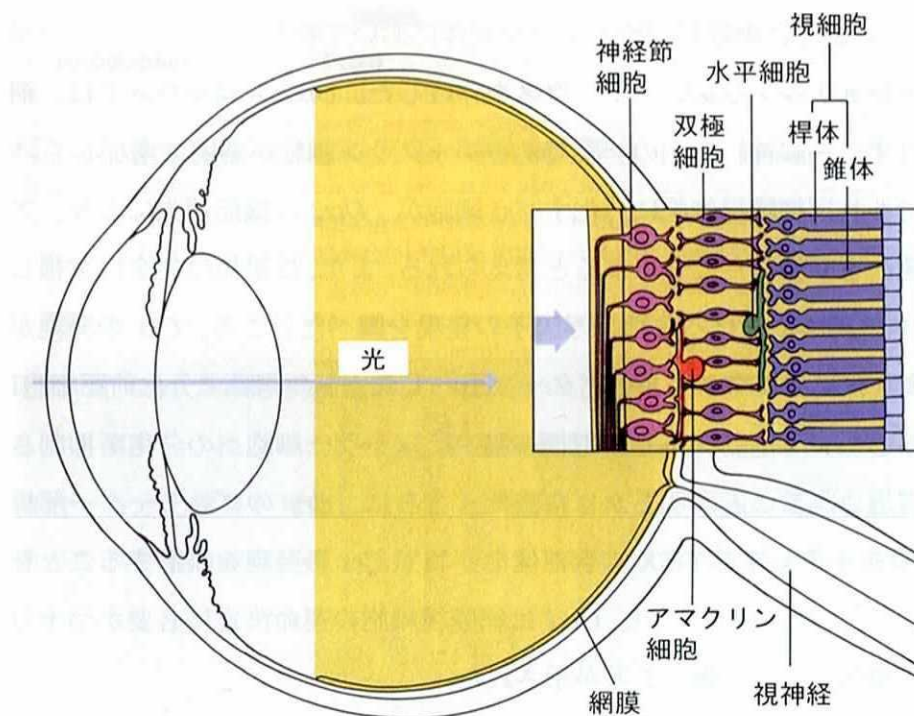


図1. 眼球の構造 視細胞は網膜の外層側に位置する。

## 2. 研究の狙い

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<sup>1)</sup>、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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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<sup>3)</sup>。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* 遺伝子の網膜視細胞発生における役割を生体レベルで解析した。

## 3. 結果

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<sup>5)</sup>。

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<sup>4)</sup>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* 変異マウスでは、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(図 2)。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* 変異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、レトロウィ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* のプロモーター解析を行い、*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。

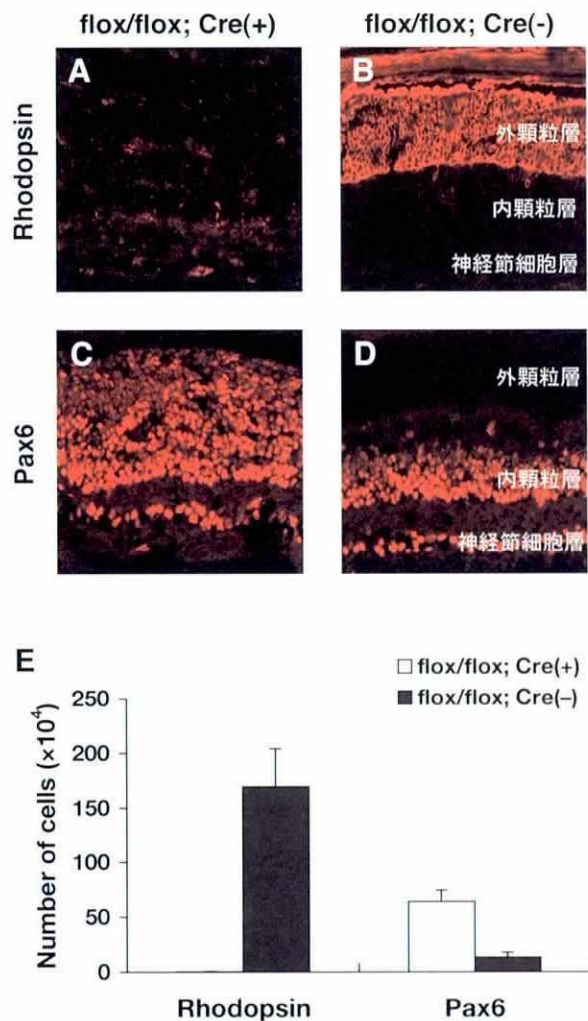


図2. *Otx2*コンディショナルノックアウトマウスの網膜免疫染色像

A-D: *Otx2* コンディショナルノックアウトマウス(A, C)では、コントロールマウス(B, D)と比較してロドプシン陽性細胞(視細胞)がほとんどみられず、Pax6 陽性細胞(アマクリン細胞)が著明に増加している。

E: トリプシンで網膜細胞を分散し、免疫染色にて細胞数を定量した。*Otx2* コンディショナルノックアウトマウスでは、ロドプシン陽性細胞が消失したために見かけ上 Pax6 陽性細胞が増加しているのではなく、実際の細胞数も増加している。これは、細胞運命の転換を意味する。

#### 4. 考 察

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。

## 参考文献

- 1) Furukawa T, et al: Cell (1997) 91: 531-541
- 2) Furukawa T, et al: Nat Genet (1999) 23: 466-470
- 3) Simeone A, et al: Nature (1992) 358: 687-690
- 4) Nishida A, et al: Nat Neurosci (2003) 6: 1255-1263
- 5) Furukawa A, et al: J Neurosci (2002) 22: 1640-1647