

イモリの網膜は再生するのにヒトの網膜はなぜ再生しないのか
～網膜再生を可能にする重要な手がかりを発見～

研究成果のポイント

1. 成体イモリの網膜再生には転写因子 Pax6 が必須であることを明らかにしました。
2. 網膜の再生をできなくしたイモリはヒトの増殖性硝子体網膜症と同じ症状を示すことを発見しました。
3. イモリの卓越した網膜再生能力がヒトの増殖性硝子体網膜症と共通のメカニズムから進化したことを示唆する発見です。
4. 網膜再生治療法開発につながる大きな成果です。

国立大学法人筑波大学生命環境系 千葉親文准教授とMartin Miguel Casco-Robles外国人特別研究員(現:Keiser University)は、同 丸尾文昭助教、および宇都宮大学大学院工学研究科 外山史准教授らと共同で、アカハライモリの遺伝子改変技術を駆使して、転写因子Pax6¹⁾が成体イモリの網膜再生に必須であることを明らかにしました。

さらに、Pax6の発現を抑制する実験において、網膜の再生をできなくしたイモリがヒトの増殖性硝子体網膜症²⁾と同じの症状を示すことを発見しました。

これらの発見は、イモリの卓越した網膜再生能力はヒトの増殖性硝子体網膜症と共通のメカニズムから進化したことを示唆しています。すなわち、イモリの祖先も、成体ではヒトと同様に網膜再生能力をもたず、増殖性硝子体網膜症のような外傷性の疾患にかかっていたと考えられます。イモリの進化の過程で、疾患を再生に転じる重要な役割を担ったのはPax6だったと考えられます。Pax6はヒトの増殖性硝子体網膜症でも発現することから、イモリとヒトにおけるPax6の働き方や役割の違いを調べることで、ヒトでも網膜再生を可能にさせる因子の発見につながることを期待できます。

* 本研究の成果は、英国時間の2016年9月19日(日本時間同日18時)付で英国オンライン科学誌「*Scientific Reports*」に公開されます。

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

研究の背景

イモリ(有尾両生類イモリ科Salamandridaeの一群)は、ヒトを含む他の脊椎動物とは対照的に、成体でも網膜色素上皮(RPE)細胞から完全な網膜を再生することができます。脊椎動物の成体の成熟したRPE細胞は、一般に眼球内の生理的な環境下では細胞分裂をしていません。これはイモリでも同じです。しかし、イモリでは、手術によって眼球から神経性網膜をすべて取り除くと、RPE細胞はただちに上皮の特徴を失い、隣接する細胞や足場である基底膜から遊離して、硝子体腔内に多能性細胞(RPE幹細胞)の塊を形成します。RPE細胞は、神経性網膜が傷つくと、すぐさまRPE幹細胞にリプログラムされるのです(Islam et al., 2014)。最終的にRPE幹細胞は新たな神経性網膜とRPEを再生します。

網膜再生を可能にするこのように精巧なメカニズムは、イモリだけでどのようにして進化したのでしょうか？ これは未だ謎のままです。本研究チームの最近の研究は、RPE細胞の網膜外傷後の行動が、成体イモリの網膜再生とヒトの増殖性硝子体網膜症との間でよく似ていることを示しています(Islam et al., 2014; Chiba, 2014)。ヒトの増殖性硝子体網膜症は、網膜剥離などが原因で生じます。神経性網膜が傷つくと、RPE細胞が(イモリのように)上皮の特徴を失い、遊走能と分裂能を獲得します。しかし、これらの細胞は、イモリとは異なり、最終的に筋線維芽細胞に形質転換します。この筋線維芽細胞は、神経性網膜の傷口を覆う収縮性の被膜(増殖膜)の主成分になります。増殖膜は発達にともない収縮し、付着した神経性網膜を引き寄せることで網膜剥離を進行させます。そのため、増殖膜は手術で取り除かなければ失明の原因になります。こうしたヒトの増殖性硝子体網膜症におけるRPE細胞の形質転換過程においても、RPE細胞は、イモリのように多能性をもつ段階を経ることが示唆されています(Salero et al., 2012)。ヒトの多能性RPE細胞もRPE幹細胞と名付けられており、イモリのRPE幹細胞に対応する細胞と見なされます。

イモリにおいては、進化の過程で、増殖性硝子体網膜症のような外傷性疾患の初期過程に何かが起こり、RPE幹細胞の運命が網膜再生の方向に転じたのかもしれませんが。この仮説が正しいとすれば、イモリの網膜再生を初期段階で妨害すれば、増殖性硝子体網膜症の症状が現れるはずで。そこで今回、この仮説を検証することにしました。

研究内容と成果

成熟した RPE 細胞とそこから生じるすべての細胞を標的として、これらの細胞の遺伝子機能を制御できる遺伝子改変(トランスジェニック)イモリを初めて作出しました。そして、RPE 幹細胞における Pax6 の発現を抑制(発現をノック・ダウン)することによって、網膜再生の正常な進行を妨害することに成功しました。Pax6 は、多能性の指標となる他の因子とともに、イモリの RPE 幹細胞に新規に発現する転写因子です。

転写因子 Pax6 の発現をノック・ダウンすると、RPE 細胞は正常時と同じように上皮の特徴を失い、遊走能や増殖能を獲得しました。しかし、網膜を再生することはなく、最終的に筋線維芽細胞に分化することがわかりました。このことは、イモリの RPE 細胞が、ヒトの増殖性硝子体網膜症と同様に、上皮間葉転換を被ったことを示しています。さらに、網様体辺縁領域(CMZ)から再成長した神経性網膜(CMZ-NR)に付着してできた構造体の細胞組成が、増殖膜の細胞組成と同様であることもわかりました。このように、網膜再生の進行を初期段階で妨害すると、予想した通り、ヒトの増殖性硝子体網膜症と同様の症状がイモリに現れました。このことから、おそらくイモリは進化の過程で、網膜の外傷に応じて起動する上皮間葉転換プログラムに何らかの変更(修飾)を加えたことで、RPE 幹細胞の運命を増殖性硝子体網膜症から網膜再生の方向に転じたと考えられます。Pax6は疑いなくこのプロセスにおいて欠かせない役者です。

ここで留意すべきは、ヒトの RPE 幹細胞も Pax6 を発現することが示唆されていることです(Salero et al., 2012)。ヒトでも Pax6 が RPE 細胞の上皮間葉転換に伴って発現するのです。つまり、イモリの進化過程で起こったのは、Pax6 のスイッチが入る(発現する)ことそのものではなく、この分子が上皮間葉転換を抑制し、網膜再生に向けて適切に働くための「場」の変化であったこととなります。成体イモリの RPE 幹細胞における Pax6 の働き方や役割について、ヒトRPE幹細胞との比較を通じてより深く理解することは、イモリの進化において起こった変化を明らかにするのみならず、人の RPE 細胞がもつ網膜再生の潜在能力を解発するために必要です。

今後の展開

今後、成体イモリの RPE 幹細胞における Pax6 の働き方や役割を明らかにするために、正常な RPE 幹細胞と Pax6 をノック・ダウンした RPE 幹細胞の遺伝子発現を網羅的に比較解析し、Pax6 存在下で制御される分子ネットワークの特徴を明らかにしたいと考えています。それと同時に、マウス増殖性硝子体網膜症モデルを利用して、成体マウスの RPE 幹細胞の遺伝子発現様式を特徴づけます。これらの解析結果を比較すれば、ヒトの網膜再生のスイッ

子を入れる因子の候補が得られるはずであり、技術的にも可能な段階にあります。この研究により得られる知見は、RPE 細胞の上皮間葉転換を抑制すると同時に網膜再生を惹起する革新的な網膜再生治療法の開発につながる事が期待されます。

参考図

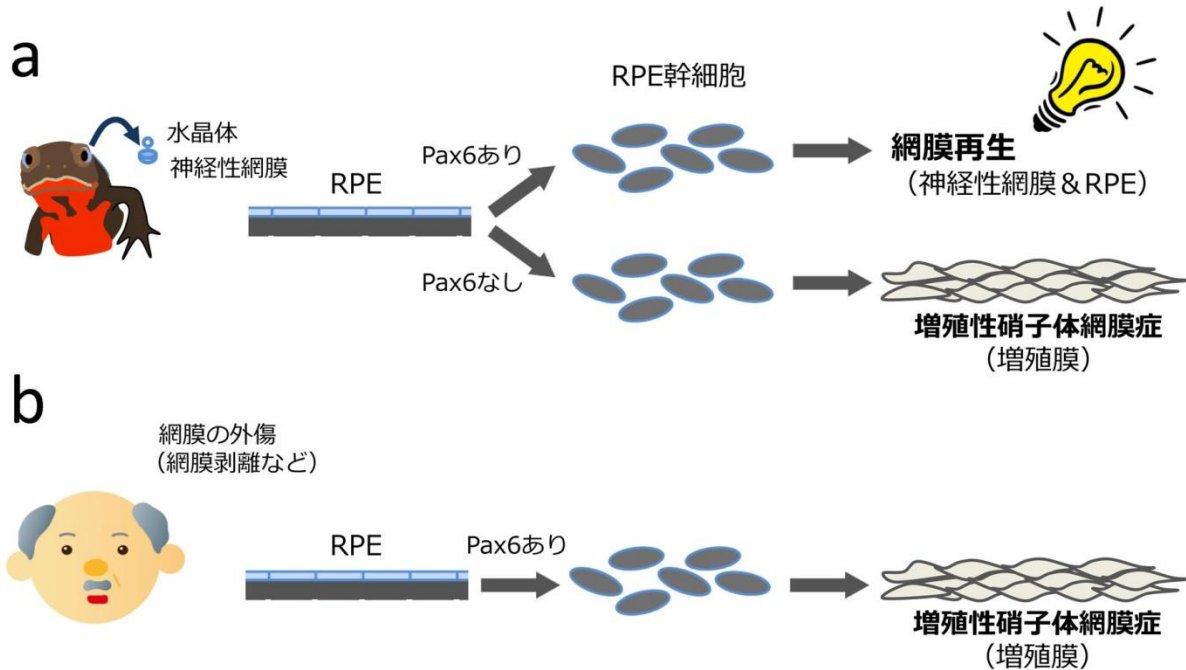


図. 神経性網膜が傷ついたときの網膜色素上皮(RPE)の変化. (a)イモリの場合. おとなのイモリの眼から実験的に神経性網膜を水晶体ごとすべて取り除くと、神経性網膜の裏側にあるシート状のRPEが、個々の細胞にばらばらに分かれ、多能性をもった細胞(RPE幹細胞)に変化します。そしてRPE幹細胞の集団が二つに分離し、一方は神経性網膜を、他方はRPE自身を再生し、最終的にイモリは視覚を回復します。RPE細胞がRPE幹細胞に変化する際に、Pax6という転写因子を実験的に働けなくすると、RPE細胞は網膜を再生することができなくなり、かわりに筋線維芽細胞に分化して、やがて増殖膜をつくります。これは、人の増殖性硝子体網膜症と同じ症状です。(b)ヒトの場合. 神経性網膜が網膜剥離などで傷つくと、RPEがイモリと同様に個々の細胞に分かれRPE幹細胞に変化しますが、神経性網膜の傷口に移動し、そこを塞ぐように増殖膜をつくります。増殖膜は発達すると収縮し、神経性網膜を引っ張り込むことでさらに網膜剥離を進行させます。そのため、増殖膜は早期に取り除かなければ失明の原因となります。これが人の増殖性硝子体網膜症です。興味深いことに、ヒトのRPE幹細胞もPax6を発現することが知られています。ヒトもPax6を発現するのに、ヒトのRPE幹細胞はどうして網膜を再生しないのでしょうか？ おそらく、Pax6の働き方や役割がイモリと違うからだと考えられます。

用語解説

注1) Pax6: 眼や脳の発生に深く関わるタンパク質で、細胞の核のDNAに結合して様々な遺伝子の転写(mRNA合成)を調節します。

注2) 増殖性硝子体網膜症: 神経性網膜が網膜剥離などで傷つくと、網膜色素上皮(RPE)が個々の細胞に分かれ、幹細胞に変化して神経性網膜の傷口に移動し、そこを塞ぐように増殖膜をつくります。発達した増殖膜が収縮することで神経性網膜が引っ張り込まれ、硝子体と網膜との剥離がさらに進行する病態を言います。手術によって増殖膜を早期に取り除かなければ失明の原因となります。

参考文献

1. Islam, M.R. et al. The newt reprograms mature RPE cells into a unique multipotent state for retinal regeneration. *Sci. Rep.* **4**, 6043 (2014).
2. Chiba, C. The retinal pigment epithelium: An important player of retinal disorders and regeneration. *Exp. Eye Res.* **123**, 107–114 (2014).
3. Salero, E. et al., Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives. *Cell Stem Cell* **10**, 88–95 (2012).

掲載論文

【題名】 Turning the fate of reprogramming cells from retinal disorder to regeneration by Pax6 in newts.
(イモリにおいて、リプログラム細胞の運命を Pax6 によって網膜の疾患から再生に転ずること)

【著者名】 Martin Miguel Casco-Robles, Md Rafiqul Islam, Wataru Inami, Hibiki Vincent Tanaka, Ailidana Kunahong, Hirofumi Yasumuro, Shiori Hanzawa, Roman Martin Casco-Robles, Fubito Toyama, Fumiaki Maruo and Chikafumi Chiba

【掲載誌】 Scientific Reports
DOI: 10.1038/srep33761

問い合わせ先

氏名 千葉 親文(ちば ちかふみ)
筑波大学 生命環境系 准教授