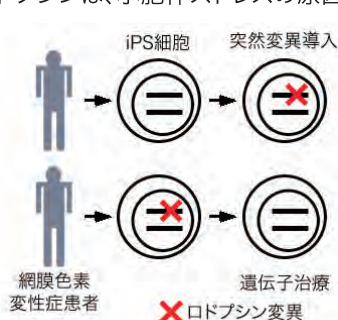


## iPS細胞を用いた網膜色素変性症における桿体細胞死機構の解析

我々のグループは、網膜の視細胞が徐々に脱落する疾患である網膜色素変性症の患者の皮膚細胞からiPS細胞を樹立した。この患者には、ロドプシン遺伝子に点突然変異が存在したため、この変異が疾患の原因であるかどうかを調べた。

まず健康者由来iPS細胞に対し、そのiPS細胞にロドプシン遺伝子変異を導入したもの、さらに患者由来iPS細胞に対し、そのロドプシン遺伝子変異を治療したものを作成した。これらの遺伝子改変は、ヘルパー依存型アデノウイルスを用いてそれぞれの遺伝子をノックインすることにより行った。これらのiPS細胞を視細胞に分化誘導して比較検討を行ったところ、視細胞の細胞死は、変異を導入したもので亢進しており、変異を治療したものでは抑制されていた。これは、変異ロドプシンが視細胞の変性の原因になっていることを示しているとともに、この患者にはロドプシン変異以外に視細胞変性の原因となる遺伝子変異は存在しないことを示している。

次に、このロドプシン変異による細胞死を抑制する薬剤のスクリーニングを行った。変異ロドプシンは、小胞体ストレスの原因になることにより細胞死を引き起こすことが報告されている。



そこで、東京大学の三浦博士のグループにより作成された、細胞で小胞体ストレスがおこると緑色蛍光タンパク質Venusが発現するコンストラクトを恒常発現型CAGプロモーター制御下で発現する組換えアデノウイルスを作成した。さらに、視細胞特異的に発現するNrl遺伝子のプロモーター制御下で赤色蛍光タンパク質DsRedも作成した。iPS細胞を視細胞に誘導し、様々な薬剤を加えたところに上記2種類のアデノウイルスを感染させ、フローサイトメーターで解析することにより、視細胞の小胞体ストレスによる細胞死を抑制する薬剤を簡便、高感度にスクリーニングする系を確立した。

遺伝的背景が同一であるiPS細胞の作成、および蛍光タンパク質を用いた薬剤スクリーニングの系は、他の神経変性疾患の解析にも応用できる技術である。これらを用いることにより、今後ますますiPS細胞を用いた神経変性機構の解析はすすむものと期待される。



吉田 哲

GCOE PD  
慶應義塾大学総合医科学  
研究センター 特任助教

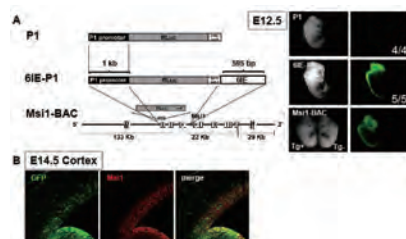
### 代表論文

Yoshida T., Shiraki N., Baba H., Goto M., Fujiwara S., Kume K., Kume S. Expression patterns of Epiplakin1 in pancreas, pancreatic cancer and regenerating pancreas. *Genes Cells*, 2008, 13(7):667-678.

## Musashi-1を制御する転写因子の同定と神経幹細胞維持機構の解析

Musashi1 (Msi1)タンパク質は、神経幹細胞のマーカーとして用いられるRNA結合タンパク質であり、ノックアウトマウスを用いた解析により、神経幹細胞の未分化性の維持や増殖に関わると考えられている。脳腫瘍においては、Msi1を抑制した移植腫瘍細胞群は有意に増殖が抑制され、移植個体の生存期間が顕著に延長することから、脳腫瘍を標的とした研究においても重要な遺伝子であることが明らかにされてきた。その分子メカニズムとして、Notchの活性化や細胞周期制御に関与することが報告されている。しかし、Msi1を制御するメカニズムについてはこれまでに報告が無かった。このため、Msi1の転写機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

我々はまず、神経幹細胞においてMsi1の転写を制御するゲノム領域の同定を行った。制御領域を同定するために、Msi1遺伝子領域を含む184 kbのBAC DNAを用いたMsi1レポーター遺伝子を作製し、Msi1コード領域、非コード領域を段階的に欠失させ、神経幹細胞において転写活性を評価したところ、イントロン-エクソン領域を欠損させたものにおいて転写活性が極めて減弱することが分かった。さらにクロマチン修飾(H3K4me1等)に着目し、神経幹細胞における転写活性化領域を予測した結果、第6イントロンに存在する高度に保存されたおよそ600bpのCpGアイランド(6IE)が、Msi1を制御するエンハンサー領域であることが示唆された。6IEを含むレポーター遺伝子を作製し、これを導入したトランスジェニックマウスにおいて発現解析を行ったところ、BACレポーター遺伝子の発現と同様に、胎生期から成体にかけて中枢神経系のMsi1陽性神経幹細胞と発現が一致したことから、Msi1制御領域は第6イントロンに存在すると結論した(図A, B, \*1)。



ChIP-seq解析のデータから、6IEにはSox2、Sox3、Sox21が結合し、Sox結合サイトの変異により転写活性が低下することから、Soxが重要であることが示唆されるが、Soxのみでは転写活性は上昇せず、転写協調し得る転写因子が必要であった。最近我々はこの転写因子を同定し、神経幹細胞への分化誘導能と、Msi1を介した未分化性維持に与える影響について解析を行っている。

GCOEのご援助は研究推進に多大な影響を与えてくれました。ここに感謝致します。



河瀬 聡

GCOE PD  
慶應義塾大学総合医科学  
研究センター 特任助教

### 代表論文

Identification of a Novel Intronic Enhancer Responsible for the Transcriptional Regulation of Musashi1 in Neural Stem/Progenitor Cells  
Satoshi Kawase, Takao Imai, Chikako Miyauchi-Hara, Kunio Yaguchi, Yoshinori Nishimoto, Shin-ichi Fukami, Atsushi Miyawaki, Shigeyoshi Itoharu, Hideyuki Okano *Molecular Brain*, 2011; 4:14