

氏 名(本 籍)	酒 井 秀 人 (埼 玉 県)
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1,465 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
審 査 研 究 科	生 物 科 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	Transdifferentiation of Newt Retinal Pigment Epithelial Cells into Neurons in Culture : Development of Voltage-Gated Ion Channels. (イモリ網膜色素上皮細胞の培養下における神経細胞への分化転換：電位依存性イオンチャ ネルの発達)
主 査	筑波大学教授 理学博士 齋 藤 建 彦
副 査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌
副 査	筑波大学併任教授 理学博士 山 田 雅 弘
副 査	筑波大学助教授 医学博士 中 谷 敬

論 文 の 要 旨

ヒトを含めた多くの脊椎動物の脳神経系は、その胚発生の時期を除いて一度障害を受けるともはや再生が困難であると信じられている。ところが有尾両生類のイモリでは、網膜神経組織に障害を受けても、残った網膜色素上皮細胞が色素を捨てて脱分化・増殖し、網膜を構成する種々の神経細胞を再生し、最終的には神経細胞どうしのシナプスが形成され、網膜神経組織が再構築されることが知られている。脳神経回路の一部が失われた場合、他種の細胞で補填するということは個体の生命維持にとってきわめて有利な現象である。

これまでのイモリ網膜神経組織の再生の研究は、主として生体内での再生過程を発生生物学的そして形態学的方法を用い解析してきた。本研究では網膜再生の起源となる色素上皮細胞を単離培養し、単離色素上皮細胞が生体外で形態的にも機能的にも神経細胞に分化転換することができるかどうかを明らかにすることを目的としている。

成熟したイモリの眼球から色素上皮層を剝離し、蛋白質分解酵素で処理することによって細胞を単離した。単離色素上皮細胞は、予め種々の細胞外基質でコートしておいた培養皿に蒔き、種々の培養液の存在下で培養した。培養条件の検定には、細胞の基質への接着性、分裂頻度、生存率、細胞形態の変化などを指標とした。その結果、市販の L-15 培養液をもとに調整した液にウシ胎児血清を 5 % 添加し、基質に植物レクチンのコンカナバリン A をコートした培養皿において、細胞は色素顆粒を捨て、活発に分裂・増殖し、長期間生存した。

培養条件下で色素上皮細胞が神経細胞へ分化転換したかどうかは、細胞の形態的特徴のみならず、ホールセル・パッチクランプ法という最新の方法を用いて生理学的に解析した。この解析法は、細胞表面にガラス電極を当てて、細胞膜上に発現している神経細胞に特異的な機能分子（イオンチャネル蛋白）を、チャネルを流れるイオン電流を指標にして測定するものである。

筆者は、培養過程の色素上皮細胞をホールセル・パッチクランプ法によって解析した結果、培養 1 週間ほどで神経細胞に特異的な電位依存性の Na^+ 、 Ca^{2+} 、そして K^+ チャネルが発現してくることを明らかにした。さらに、1 ケ月以上培養した細胞の中には神経細胞様の形態を示す細胞が観察された。これらの細胞は電気刺激によって活動電位を発生し、それを構成するイオンチャネルの種類とそれらの性質は網膜神経節細胞のものと同一であっ

た。これらの結果から、著者はイモリ網膜の色素上皮細胞は生体外に取り出して培養した条件下でも、形態的、機能的に神経細胞に分化転換することができると結論した。

審 査 の 要 旨

近年、障害を受けた脳神経組織を修復・再生させようとする試みが世界各国で始まっている。脊椎動物の網膜は発生学的には脳の一部であり、その再生研究は脳の再生を研究するためのモデル実験系として大変優れている。本研究は、再生可能なイモリの網膜を用いて、以下に示す二つの重要な点を明らかにしたことで高く評価できる。その一つは、網膜再生の起源となる色素上皮細胞を単離し、その培養条件を確立したことで、もう一つは色素上皮細胞を培養条件下で活動電位発生型の神経細胞へ機能分化させることに成功したことである。色素上皮細胞を神経細胞へ分化転換させる培養条件が確立したことによって、今後、網膜を構成する他種の神経細胞への分化転換に関わる環境因子の探索も容易になり、網膜神経組織の再生機構の細胞・分子レベルでの本格的な解明が可能になる。さらに、再生可能な網膜神経組織の研究は、これまで再生不可能と言われている、より高次の脳神経組織の再生研究への基礎資料を提供することができるという点で、その展開が大いに期待される。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。