

氏名(本籍)	なかむらけんた (東京都)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第4173号		
学位授与年月日	平成18年11月30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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on the Notch Signaling in the Retinal Regeneration of Adult Newt, <i>Cynops pyrrhogaster</i> (成体イモリ (<i>Cynops pyrrhogaster</i>) の網膜再生における Notch シグナリングに関する研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	山岸 宏
副査	筑波大学助教授	医学博士	中谷 敬
副査	筑波大学助教授	理学博士	古久保 一
副査	筑波大学助教授	理学博士	徳永 克男
副査	筑波大学助教授	理学博士	吉村 建二郎
副査	筑波大学助教授	博士(理学)	千葉 親文

論文の内容の要旨

網膜は眼球内に存在する中枢神経組織であり、その傷害は生活に大きな影響を与える。近年の幹細胞生物学や再生医学研究により、眼球内には培養や移植により網膜細胞に分化転換する能力のある様々な細胞が存在することが示されており、中でも色素上皮 (PE) 細胞は細胞治療のための細胞ソースとして有望視されている。しかし、残念ながら現在でも患者の眼の中で PE 細胞を起源として網膜組織を再生させる医療戦略は存在しない。一方、イモリは生涯に渡り網膜色素上皮 (RPE) 細胞の分化転換過程を通じて網膜を完全再生することができる。このため、成体イモリの網膜再生系は *in vivo* での PE 分化転換モデルとして位置づけられ、そのメカニズムの解明は生物学や医学・医療に有用な情報を提供すると考えられる。

イモリは眼球から人為的に網膜神経組織を取り除いても完全な網膜を再生することができる。イモリの網膜再生研究は 100 年以上もの歴史があるが、技術的な困難さからその細胞・分子メカニズムは未だ明らかにされていない。著者らは先行研究において、成体アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) の網膜再生過程を *in situ* ハイブリダイゼーション、免疫組織化学、PCR、ウエスタンブロットなどの手法で解析し、9 ステージに分離することに成功した。さらに著者は、本論文において、細胞分化や組織形成に関わるとされる Notch シグナル系が網膜再生 (すなわち RPE 細胞の網膜神経組織への分化転換) において必須のメカニズムであることを示した。

まず、イモリ胚から Notch-1 受容体の遺伝子をクローニングし、その網膜再生過程における発現様式を *in situ* ハイブリダイゼーション法で解析した。その結果、*Notch-1* は RPE 細胞を起源とする 1-2 層の再生網膜 (St. E-3) に初めて発現することが分かった。再生網膜が 3-4 層 (St. I-1) になると、発現は組織全体に一樣に観察されるようになり、その後、細胞が分化するに伴って未分化な細胞に限られるようになった。こうした発現様式は網膜発生過程におけるそれとよく似ていた。

次に, DAPTによるNotchシグナリングの阻害実験を行った。まず, 胚をDAPT存在下で培養した。すると, 発生網膜中の神経前駆細胞が消失する一方で, ニューロンが過剰に生み出された。この結果は, 他の動物モデルにおけるNotch阻害実験の結果とよく一致した。次に, 再生網膜中のNotchシグナルを阻害するために, DAPTを成体イモリの腹腔内に注入したり, DAPTを含む綿の小球を眼球の前房内に移植した。その結果, 1-4層の再生網膜(St. E-3からI-1)中に多数のニューロンが出現することが分かった。このことはDAPT投与によってニューロン分化が促進されたことを示す。さらに, イミュノプロットによりDAPTが再生網膜中のNotch-1シグナルを阻害し得ることを示した。これらの結果から, Notch-1経路を含むNotchシグナルが再生網膜中の神経前駆細胞の維持に関わることが示唆される。

さらに, PCR解析により, Notchの細胞内エフェクターである*Hes-1*の発現量が*Notch-1*発現に関連して最大に達することや, Notchリガンドである*Delta-1*やプロニューラル因子であるneurogenin1の発現量がニューロン分化に伴って増加することを明らかにした。このことから, Notchシグナル系がニューロン分化に関連して稼動していることが示唆される。また, *Delta-1*, *Hes-1*, *Ngn-1*が成熟したRPE細胞に発現していることを示した。これらの遺伝子は網膜除去後すぐにup-regulateされる可能性がある。このことから, Notchシグナルあるいはこれらの分子が分化転換の初期過程においても重要な機能を担っている可能性がある。

審査の結果の要旨

本研究は, 成体イモリの網膜再生系を脊椎動物におけるPE細胞の*in vivo*分化転換モデルとして位置づけ, 網膜再生(すなわちPE細胞の網膜神経組織への分化転換)にNotchシグナルが必須である証拠を初めて提供した。また, Notchシグナル系はこれまで神経系の発生過程以外にも免疫系細胞の分化や小腸上皮のリニューアルなどに働くことが知られるが, 本研究は分化転換過程にも働くことを示した点で重要である。イモリの網膜再生のメカニズムは技術的困難さから明らかにされてこなかった。本研究の基盤となった先行研究において, 著者はイモリの網膜組織に適した*in situ*ハイブリダイゼーションやPCRなどの手法を確立し, 解析することで網膜再生過程を9ステージに分離することに多大な貢献をした。さらに, 本研究においてNotchシグナルが網膜再生に必須のメカニズムの1つであることを示した功績は大きい。また, 機能解析のために行われた腹腔内投与や阻害剤を含む綿小球の眼球前房内移植は, これまでにない著者オリジナルの発想に基づく方法であり, しかも今後の遺伝子機能解析に応用されうると期待されることから高く評価できる。この手法により著者は正常な網膜再生を乱すことに成功したが, これは網膜再生研究史上初めての報告である。さらに, 成熟したRPE細胞にneurogenic geneやproneural geneが発現しているという報告はこれまでになく, しかも, 分化転換の初期過程で制御される可能性がある。この事実は, Notchシグナルあるいはこれらの遺伝子の分化転換における重要性を暗示しており, 今後さらなる研究に展開するものと期待できる。本研究は, 脊椎動物の網膜再生メカニズムに関する知見を格段に進め, 再生生物学や今後の再生医学・医療研究の進展に貢献した点で高く評価できる。

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。