

氏名(本籍)	す 洲 崎 かなこ (鹿児島県)		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	博 甲 第 4504 号		
学位授与年月日	平成 19 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 Transdifferentiation Mechanisms of Retinal Pigment Epithelium Cells of the Adult Newt, <i>Cynops pyrrhogaster</i> (成体イモリ網膜色素上皮細胞の分化転換機構に関する研究)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	山 岸 宏
副 査	筑波大学准教授	医学博士	中 谷 敬
副 査	筑波大学准教授	理学博士	吉 村 建二郎
副 査	筑波大学准教授	博士(理学)	千 葉 親 文

論 文 の 内 容 の 要 旨

有尾両生類のイモリは成体でも網膜を再生できる。成体イモリの網膜再生は成熟した網膜色素上皮 (RPE) 細胞の分化転換 (transdifferentiation/cell-type switch) を介しておこることが知られている。しかし、分化転換を誘導するメカニズムについては未だ明らかでない。一方、イモリを除く魚類から哺乳類までの脊椎動物では、胚や幼生期に限り、イモリとよく似た網膜再生の現象が観察され、胚性の RPE は線維芽細胞増殖因子 2 (FGF2) により神経網膜に分化転換できることが知られている。この分化転換の誘導メカニズムは詳しく調べられており、以下の経路が提唱されている：FGF2 は、RPE 細胞の細胞膜にある受容体 FGFR-2 を介して細胞内の MEK (MAPK/ERK kinase) 経路を活性化し、最終的に分化転換のマスター遺伝子である Pax6 発現をアップレギュレートすることにより神経網膜への分化転換を誘導する。興味深いことに、これらの動物では RPE は成熟に伴って分化転換能力を失う。これは Pax6 の発現がなくなることや FGFR-2 の発現が低下すること、あるいは細胞内のシグナル経路が変化することによると考えられている。ところが例外的にイモリは成体でも RPE の分化転換を介して網膜を再生する能力がある。そこで筆者は、成体イモリにおける網膜再生誘導メカニズムを明らかにする目的で、その基礎として、こうした胚や幼生期の誘導シグナル経路が成体イモリでも関わるかどうかを調べた。

まず、筆者はイモリ (*Cynops pyrrhogaster*) の FGF2 遺伝子と FGFR-2 遺伝子を単離した。次に、合成したイモリ FGF2 を用いて、成体イモリ RPE 細胞の FGF2 に対する反応を無血清単離培養系で調べた。その結果、驚いたことに、成体イモリ RPE 細胞は FGF2 を投与しなくても (すなわちコントロール条件で) 細胞周期 S 期に入ることや、Pax6 や全網膜ニューロンのマーカー分子 (NF200 と AT) を発現して神経性細胞に分化転換できることが分かった。しかし、ニューロン様の形態をした細胞や、網膜のニューロンタイプに特異的な分子の発現は観察されなかった。FGF2 を投与すると、RPE 細胞の脱分化と増殖が促進された。しかし、マーカー発現には大きく影響しなかった。細胞増殖や網膜ニューロン分化に関わるとされる血清や IGF1 をテストしたが、結果はほとんど変わらなかった。

これらの結果は、細胞の単離過程で RPE 細胞が網膜や脈絡膜組織に含まれる内因性の FGF2 に曝された

ためである可能性が考えられた。そこで次に筆者は、FGF 経路阻害剤の存在下で eye-cup 組織の培養を行った。コントロール条件で培養すると、eye-cup 中の RPE 細胞は 10 日目に六角形の形態を維持したまま AT を発現した。MEK 阻害剤 U0126 を投与すると、その細胞数は有意に減少し、FGF2 投与により有意に増加した。さらに詳細に調べると、U0126 が培養開始直後から AT 発現に対して抑制効果をもつものに対し、FGF2 の AT 発現促進効果は培養 5 日目以降に現れることが分かった。これらの結果は、成体イモリ RPE 細胞の神経性分化転換が網膜除去後すぐに FGF2 ではない何らかの因子によって誘導される可能性を示唆しており、MEK がそれを介することを示している。

続いて筆者は、FGF2 や FGFR-2、Pax6 が成体イモリの網膜再生過程で発現するのかどうか RT-PCR 法と免疫組織化学法で調べた。その結果、*FGF2* 遺伝子は眼球全体に発現していることが分かった。FGF2 タンパク質の発現は正常 RPE では観察されなかったが、術後 10 日の細胞分裂を始めた RPE 細胞で観察された。*FGFR-2* 遺伝子と Pax6 遺伝子は術後 0 日（神経性網膜除去直後）の RPE では発現しておらず、*FGF2* が増加する術後 10 日までに発現した。これらの結果は、胚や幼生期の分化転換に関わる FGF2/FGFR-2/Pax6 経路が成体イモリでは網膜除去後に新たに誘導されて発現することを示唆している。すなわち、成体イモリ RPE 細胞の分化転換の誘導には胚や幼生期とは異なるメカニズムを想定しなければならない。

さらに筆者は、培養下での RPE 細胞の神経性分化転換の現象を理解するために、網膜再生過程におけるマーカー分子の発現様式と比較した。その結果、網膜再生過程におけるマーカー発現の順序は、Pax6⁺（網膜幹細胞／網膜前駆細胞）→ Pax6⁺/NF200⁺/GFAP⁺（網膜前駆細胞）→ Pax6⁺/NF200⁺/AT⁺（神経節細胞あるいはアマクリン細胞）であった。一方、単離培養下では Pax6⁺ → Pax6⁺/NF200⁺/AT⁺ → Pax6⁺/NF200⁺/GFAP⁺ であった。すなわち、培養下では、網膜前駆細胞の状態をスキップし、早期に神経性細胞（神経節細胞あるいはアマクリン細胞）に分化転換した可能性が考えられる。これらの結果は、*in vivo* での正常な分化転換（すなわち網膜再生）の初期過程では、神経性細胞への分化転換を抑制するメカニズムが存在することを示唆している。

審 査 の 結 果 の 要 旨

筆者は本論文において、成体イモリの網膜再生誘導メカニズムの解明を試みた。本研究により、1) 成体イモリの RPE 細胞が MEK を介して神経性細胞に分化転換する能力があること、2) FGF2 はその誘導因子ではないものの細胞増殖や神経性分子の発現を促進すること、3) 胚や幼生期の分化転換に関わるとされる *FGFR-2* 遺伝子と Pax6 遺伝子が、他の脊椎動物と同様に、成体イモリの RPE 細胞には発現していないこと、4) FGF2 や FGFR-2、Pax6 は網膜除去後に誘導されて発現すること、5) 網膜再生過程では培養下と異なり神経性分子は再生網膜が 1 – 2 層になるまで発現しないことを示した。これらの結果は、成体イモリの網膜再生が胚や幼生期と同様に MEK を介して誘導されるにもかかわらず、その経路は胚や幼生期のものとは異なっていることを示唆しており、成体イモリ固有のメカニズムの存在を示す最初の証拠として高く評価される。さらに、胚や幼生期のシグナル経路が網膜傷害後に再構築されることや、*in vivo* では RPE 細胞の神経性分化転換を抑制するメカニズムが存在することを示唆する点で重要である。イモリのような網膜再生の能力は他の脊椎動物にはないことから、本研究結果は再生能力に関する様々な生物学的、医学的な問題の解明に大きく貢献すると期待される。

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。