

氏 名 (本籍)	かね こ じゅん 金 子 潤 (群馬県)
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 5717 号
学位授与年月日	平成 23 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	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	<b>Studies on the Expression and Function of Musashi-1 in the Adult Vertebrate Retina</b> (成体脊椎動物の網膜における Musashi-1 の発現と機能に関する研究)

主	査	筑波大学准教授	博士 (理学)	千 葉 親 文
副	査	筑波大学教授	理学博士	沼 田 治
副	査	筑波大学教授	理学博士	古久保-徳永 克男
副	査	筑波大学准教授	医学博士	中 谷 敬

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

有尾両生類のイモリは、成体でも、網膜色素上皮 (RPE) から網膜を完全に再生できる。アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を用いたこれまでの研究から、RPE 細胞は神経性網膜が外傷を被るとすぐにリプログラムし、網膜幹細胞と同等の能力を獲得し、これにより新たな神経性網膜と RPE 自身を生み出すと考えられている。もしこの仮説が正しいとすれば、RPE 細胞は神経性網膜の外傷に伴い幹細胞に特徴的なマーカー分子を発現するはずである。そこで筆者は、この仮説を検証すべく、幹細胞に特異的に発現し、幹細胞の維持に関わるとされる RNA 結合タンパク質 Musashi-1 (Msi1) に着目した。

論文の前半では、アカハライモリ *Msi1* 遺伝子と RNA スプライスバリエーションの同定、および正常網膜と再生網膜における発現様式の解析をおこなった。まず、PCR により胚と網膜から *Msi1* 遺伝子の全長と考えられる cDNA クローン (*Msi1a*, 1881bp) と 3 つの RNA スプライスバリエーション (*Msi1b*, 1836bp; *Msi1c*, 1824bp; *Msi1d*, 1779bp) を単離した。次に、正常眼球における *Msi1* 発現について調べた。PCR とウエスタンブロットの結果、神経性網膜に *Msi1b*/*Msi1c* と *Msi1d* が発現していることが分かった。*in situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織化学の結果、*Msi1* は網膜の虹彩側辺縁部 (CMZ) に存在する網膜幹細胞／網膜前駆細胞に加え、分化した視細胞や RPE 細胞にも発現することが分かった。続いて、網膜再生過程における *Msi1* 発現について調べた。まず RNA バリエーションの発現様式を PCR で解析した。その結果、*Msi1a* は RPE 細胞が分裂を始める術後 10 日から発現が高まり、1-2 層の再生網膜が現れる 19 日で最大に達し、ニューロン分化が始まる 23 日から減少することが分かった。一方、*Msi1d* は術後 10 日から徐々に増加し、網膜がほぼ再生する術後 45 日に最大に達した。これらの結果は、再生初期の網膜 (RPE 由来の網膜幹細胞／網膜前駆細胞を含む) と再生した網膜や正常網膜 (視細胞を含む) では発現するアイソフォームが異なる可能性を示唆している。そこで、術後 19 日の再生網膜を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、予想通り、発現するアイソフォームが正常網膜 (視細胞) とは異なり、*Msi1a* と *Msi1b*/*Msi1c* であることが分かった。次に、免疫組織化学による局在解析を行った。その結果、術後 0 日 (神経性網膜除去直後) では、*Msi1*

は RPE 細胞の核に発現が観察された。術後 10 日になると、RPE 細胞の核だけでなく細胞質にも Msi1 の発現が観察されるようになった。幹細胞に発現する Msi1 は細胞質で働くことが知られていることから、この局在の変化は、Msi1 が RPE 細胞の幹細胞化に働いている可能性を示唆している。また、この時期に発現する主なアイソフォームが *Msi1a* であることから、Msi1 遺伝子の転写後調節の変化が RPE 細胞の幹細胞化に関わる重要なメカニズムの一つであると考えられる。神経性網膜と RPE のパターン化が始まる術後 14 日では、神経性網膜の原基（網膜前駆細胞層）では発現が維持・増加したのに対し、RPE 前駆細胞層側では減少した。その後、Msi1 の発現は RPE 細胞や視細胞では再分化にともなって増加したが、それ以外の細胞では発現が減少した。これらの結果は、Msi1 の発現が網膜再生の様々なイベントで複雑に制御されることを示唆しており、Msi1 が網膜再生にとって重要な分子であると同時に、これまで考えられてきた以上に多様な機能をもつ分子であることを示唆している。

イモリを用いた上記の研究により、幹細胞に特異的な分子と考えられてきた Msi1 が、RPE 細胞の幹細胞化過程に働くだけでなく、終分化した体細胞にも発現することが分かった。それでは、終分化した体細胞に発現する Msi1 は、イモリの体細胞の高い分化転換能と関連があるのだろうか、それとも核に局在することから幹細胞とは関わりのない別の生理機能があるのだろうか。この点を明らかにするために、論文の後半では、さらに成体マウス網膜における Msi1 発現について調べた。成体マウス（8 週齢）の正常眼球を用いて免疫組織化学解析を行った結果、イモリと同様に、視細胞と RPE 細胞（核）に Msi1 発現が観察された。これらの結果は、終分化した体細胞（RPE 細胞と視細胞）における Msi1 発現が、再生能力の高さとは関係がなく、進化的に保存されていることを示唆している。そこで、終分化体細胞に発現する Msi1 の機能について、*Msi1* ノックアウトマウスを用いて調べた。その結果、ノックアウトマウスの網膜では、桿体視細胞外節の変性や、視細胞におけるアポトーシスの増加が観察された。さらに RPE 細胞の微絨毛における RPE65 タンパク質（視物質のリサイクルに必須の分子）の減少が観察された。これらの結果は、Msi1 が網膜の正常な生理機能や視細胞の生存に必須の分子であることを示唆している。また、この表現型は遺伝性の網膜疾患である網膜色素変性症の症状に類似しており、Msi1 が網膜色素変性症の原因遺伝子となり得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過程における RPE 細胞の多能性獲得メカニズムを探る目的で、幹細胞特異的な分子と考えられている RNA 結合タンパク質 Msi1 に注目し、その発現様式について解析した。しかし、予想に反し、筆者は網膜幹細胞や網膜前駆細胞だけでなく終分化した体細胞（視細胞と RPE 細胞）にも Msi1 が発現することを見出した。RPE 細胞は網膜再生のもととなる細胞であるため、こうした細胞に発現する Msi1 を理解しなければ再生における役割については評価できない。そこで筆者は、網膜幹細胞／網膜前駆細胞と終分化体細胞に発現するアイソフォームの解析、網膜再生過程におけるそれぞれの発現動態の解析、マウスも含めた脊椎動物との発現様式の比較、さらにはノックアウトマウスによる機能解析も丹念に行い、以下の結論を導いた。1) Msi1 は、網膜幹細胞や網膜前駆細胞に発現するだけでなく、終分化した視細胞と RPE 細胞にも発現する。2) この発現様式は脊椎動物において広く保存されている。このことから、終分化 RPE 細胞に発現する Msi1 が必ずしも再生能力と関係があるとは言えない。3) RPE 細胞に発現する Msi1 は、微絨毛における RPE65 分子の正常な分布に関わることで視細胞の生理機能維持に重要な役割を担っており、その機能不全は間接的に視細胞変性につながる。4) イモリの網膜再生過程において、RPE 細胞の核に局限していた Msi1 は細胞質に移動する。このことは、Msi1 の生理機能がスイッチし、RPE 細胞が幹細胞化に向かって進み出したことを示唆している。このとき、発現する主要なアイソフォームが

Msild から Msila にスイッチすることから、Msila が幹細胞化に重要な役割を担うと考えられる。また、この転写後調節が RPE 細胞の多能性獲得過程にとって重要なイベントの一つであると言える。このように筆者はこれら一連の実験により Msil が脊椎動物の視覚とその再生に欠かせない多機能な分子であるということを示した。これらの発見は新規性が高く Msil の常識を覆したと言える。今後は、*Msi1* の転写後調節のメカニズムと Msila アイソフォームの mRNA リガンドを同定することにより、イモリ網膜再生に必要な RPE 細胞の多能性獲得メカニズムの詳細に迫ることができると期待できる。

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。