

氏名(本籍)	みずのあき <b>水野 亜季</b> (静岡県)				
学位の種類	博士(理学)				
学位記番号	博甲第6486号				
学位授与年月日	平成25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>Expression and Activity of MEK-ERK Signaling Molecules during Retinal Regeneration of Adult Newt</b> (成体イモリの網膜再生過程における MEK-ERK シグナル分子の発現と活性)				
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	学術博士	橋本哲男		
副査	筑波大学准教授(連携大学院)	博士(理学)	栗崎晃		
副査	筑波大学准教授	医学博士	中谷敬		

### 論文の内容の要旨

視覚情報は眼球内の神経性網膜によって抽出され、脳に伝えられる。網膜色素上皮(RPE)はこの神経性網膜の生理機能に不可欠な役割を担っている。イモリは、神経性網膜に外傷を受けても、残ったRPE細胞をもとにして新たな神経性網膜とRPE自身からなる完全な網膜を再生することができる。この再生の仕組みが明らかになれば、ヒトの網膜外傷性疾患の治療と再生への手がかりが得られるのではないかと考えられる。

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードは、細胞の生存や増殖、分化などに関わる重要な細胞内シグナル経路である。Extracellular signal-regulated kinase (ERK) は MAPK ファミリーの一つで、MAPK/ERK kinase (MEK) によって活性化される。この MEK-ERK 経路が網膜の生理機能や再生においてどのような役割を果たしているかは不明である。

そこで本研究では、まず、MEK-ERK 分子がイモリの正常網膜や再生中の網膜組織に発現するかどうか調査した。正常眼球においては、神経性網膜の内網状層 off-layer、RPE 細胞層、毛様体辺縁領域 (ciliary marginal zone : CMZ) に MEK と ERK およびそれらのリン酸化タンパク質が存在することが示唆された。

網膜再生過程では、RPE 細胞が基底膜から離れ、細胞分裂を開始する術後 5-10 日の間に MEK と ERK、およびそれらのリン酸化タンパク質に対する抗体反応の増加が観察された。術後 14-19 日にかけて二つの細胞層(網膜前駆細胞層と RPE 前駆細胞層と考えられる)が現れると、網膜前駆細胞層と比べ、RPE 前駆細胞層におけるすべてのタンパク質に対する抗体反応が低下した。これらの結果は、MEK-ERK シグナルが RPE 細胞の増殖や再生網膜組織のパターン化に関連して制御されることを示唆している。

術後 23-28 日にかけて、再生網膜中でニューロン分化とシナプス層の形成が進んでも、MEK と ERK およびそれらのリン酸化タンパク質に対する抗体反応の共局在は観察されなかった。術後 45 日になり神経性網膜がほぼ完全に再生すると内網状層 off-layer に発現が観察できるようになった。このパターンは正常な神経性網膜と一致した。このことから、成熟した内網状層 off-layer において、MEK-ERK シグナルが何らかの機能を担っている可能性がある。

続いて、これらの系における MEK-ERK シグナルの役割を明らかにするため、本研究では特に、網膜再生の初期にしばって実験を行った。RPE 細胞における MEK-ERK シグナルと網膜再生との関連を調べる目的で、神経性網膜の除去手術後 5-10 日に始まる RPE 細胞の分裂開始 (S 期進入) に着目し、MEK-ERK シグナル阻害の効果を、薬理操作が可能な組織培養系を用いて調査した。その結果、MEK-ERK シグナルの阻害が、RPE 細胞の分裂開始率を有意に抑制することが分かった。また、ウエスタンブロット解析の結果、MEK-ERK シグナルの活性が培養開始の時点ですでに高まっていることが示唆された。そこで、生体内においても、網膜除去後すぐにシグナルの活性が見られるのかどうか再調査したところ、RPE 細胞におけるシグナルの活性が網膜除去後 1 時間以内に一過的に増加することが明らかになった。この早期の活性が、RPE 細胞の細胞分裂開始に影響するかどうか調べるために、培養組織の調整段階から 1 時間だけ MEK-ERK シグナルを阻害したところ、RPE 細胞の分裂開始率が有意に抑制されることが分かった。これらの結果は、最初期の MEK-ERK シグナルの増加が RPE 細胞の細胞分裂開始に重要なイベントである可能性を示している。

### 審査の結果の要旨

本論文は、MEK-ERK シグナルがイモリの網膜の生理機能や再生に関わるかどうかを研究したものである。前半では、このシグナルが網膜の視覚情報処理、および RPE 細胞の増殖や再生組織のパターン化に関わる可能性を示した。後半では、網膜の外傷直後に一時的に増加する MEK-ERK シグナルが RPE 細胞の分裂開始に関わることを示し、未だ明らかでない網膜再生の開始メカニズムの解明に手がかりを与える重要な発見をした。本研究で得られた知見は、いずれも洞察に富み、今後の機能解明に大いに貢献するものである。とくに、トランスジェニック技術を用いた *in vivo* の研究の発展に繋がるものとして期待がもたれる。したがって本研究が再生生理学の分野に与える影響は大きく、本論文の重要性は高いと言える。

平成 25 年 2 月 12 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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。