

氏名（本籍）	Md. Rafiqul Islam （ バングラディッシュ ）		
学位の種類	博 士（ 理学 ）		
学位記番号	博 甲 第 7159 号		
学位授与年月日	平成26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	Study on the Expression of Marker Genes for Multipotent Cells in the Retinal Pigment Epithelium Cells during Retinal Regeneration in the Adult Newt (成体イモリの網膜再生過程における網膜色素上皮細胞の多能性細胞マーカー遺伝子の発現に関する研究)		
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	古久保・徳永克男
副査	筑波大学教授	医学博士	中谷 敬
副査	筑波大学准教授（連携大学院）	博士(理学)	栗崎 晃

## 論 文 の 要 旨

成体イモリの眼球から実験的に神経性網膜をすべて取り除くと、網膜色素上皮（RPE）細胞が増殖し、最終的に新たな神経性網膜とRPE自身を再生する。先行研究から、イモリRPE細胞は術後10日以内に多能性を獲得すると考えられてきた（このRPE由来細胞はStem-like細胞と呼ばれてきた）。しかし、RPE細胞がどのような状態の多能性細胞になるのかは明らかでない。また、これらの細胞から如何にして2つの組織（神経性網膜とRPE）が形成されるかも明らかでない。そこで本研究では、これらの点を中心に調査することにより、網膜再生の初期過程をより詳細に理解することを目的とした。

まず、成体イモリのRPE細胞が神経性網膜とRPEの両方を生み出せる細胞に変化するのではないかという仮説を立て、このような能力のある細胞に共通して発現する転写因子Pax6が、成体イモリのRPE由来Stem-like細胞にも発現するかどうかを調べた。最初に、トランスジェニック技術を利用した遺伝子ノックダウン法、および免疫組織化学法により、イモリのPax6遺伝子を発現と機能の面から同定し、その進化的保存性を確認した。次に、網膜再生過程におけるPax6発現を免疫組織化学法で調べた。その結果、Pax6は、予想に反して、術後10日のRPE細胞（97%が細胞周期S期に達している）ではほとんど検出されなかった（約12%）。Pax6抗体に対して陽性反応を示す細胞（Pax6+細胞）の割合はその後増加し、術後14日には、Pax6+細胞が神経性網膜の原基層（pro-NR）を、Pax6-細胞と少数のPax6+細胞がRPEの原基層（pro-RPE）を構築した（細胞の増殖は、この時期から、両方の原基層で観察されるようになった）。術後19日になると、pro-NRのPax6抗体に対する陽性反応は高まったが、pro-RPEでは検出されなくなった。その後の神経性網膜の再生過程におけるPax6の発現様式は、胚発生過程におけるそれとよく一致していた。

次に、より検出感度の高いPCR法を用いて、多能性細胞を標識する複数の遺伝子のRPE細胞における発現を調べた。ここでは、Pax6に加え、iPS細胞の作製に利用される多能性因子（Sox2、c-Myc、Klf4、Oct4、

Nanog)、およびPax6と同様に神経性網膜とRPEの分化運命の決定に重要な転写因子の一つであるMitfを選択した。また、他の細胞の混入を防ぐため、単一細胞レベルのPCRに挑戦した。その結果、RPE細胞がもとの形態的特徴や一部の遺伝子(例えば、*RPE65*)の発現を保ったまま、新たに*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4*、*Mitf*、*Pax6*遺伝子を発現することが分かった。一方、*Oct4*や*Nanog*の発現は検出されなかった。次に、この結果を検証するため、*Sox2*の発現を免疫組織化学法で調べた。その結果、*Sox2*抗体に対する陽性反応のパターンがPax6抗体に対するそれと同様であることが分かった。

これらの結果から、成体イモリのRPE細胞は、神経性網膜を失うと10日までに細胞周期S期に到達するとともに、*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4*、*Mitf*、*Pax6*遺伝子を発現し、多能性細胞にリプログラムされると考えられる。これらの細胞(RPE stem cell: RPESCと名づけた)は、10日から14日にかけて、2つの細胞集団に分かれ、一方はpro-NRを、他方はpro-RPEを構築する。この過程で、pro-NRを構成する細胞ではPax6や*Sox2*の発現が増加し、一方、pro-RPEを構成する細胞ではPax6や*Sox2*の発現が減少するような調節を受けると考えられる。原基層の構築過程でそれぞれの細胞は増殖を始め、最終的に新たな神経性網膜とRPEを再生する。

一般にイモリを含む脊椎動物では、一生のうち、初期眼胞の神経上皮細胞のみが*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4*、*Mitf*、*Pax6*遺伝子を発現する。このことは、成体イモリのRPE細胞が本質的に初期眼胞の神経上皮細胞(すなわち、神経性網膜とRPEの両方を生み出せる細胞)に相当する細胞に脱分化する可能性を示唆している。しかし、終分化形質を保っていることや、Pax6や*Sox2*の免疫組織化学法による検出が困難な点で同等ではない。興味深いことに、網膜外傷後に着目すると、同様の遺伝子発現は成体ヒトのRPE細胞でもみられる。しかし、ヒトのRPE細胞は最終的に筋繊維芽細胞に形質転換し、失明の原因になる。

本研究により、成体イモリRPE細胞のリプログラミング過程を単一細胞レベルで解析することが可能になったことから、今後、包括的な遺伝子発現解析により、ナチュラルなリプログラミングの詳細が明らかになると期待される。また、ヒトとの比較を通じて、再生能力差の原因に迫ることができるかもしれない。

## 審 査 の 要 旨

本論文は、成体イモリのRPE細胞が網膜の外傷後にユニークな状態の多能性細胞にリプログラムされることを示した研究であり、この研究を通じてイモリ網膜再生の初期過程を詳細に明らかにしたものである。前半では、Pax6に着目し、その同定および発生・再生過程における発現様式の解析を行った。後半では、多能性細胞を標識する複数の遺伝子の発現について、主としてsingle-cell qPCRによる解析を行い、RPE細胞のリプログラミングを単一細胞レベルで示した。本研究で確立した手法や得られた知見は、いずれも重要で、今後の研究に大いに貢献するものである。特に、RPESCの遺伝子発現を単一細胞レベルで解析する技術は、今後のリプログラミング研究に技術的基盤を与えるものである。また、ヒトの外傷性網膜疾患との共通性を明らかにした点も重要で、応用研究への展開も期待できる。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26年9月30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)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。