

氏名	井波 航		
学位の種類	博 士 (理学)		
学位記番号	博 甲 第 7753 号		
学位授与年月日	平成 28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	Studies on the Expression of Pax6 during Reprogramming of Adult Newt Retinal Pigment Epithelium Cells (成体イモリ網膜色素上皮細胞のリプログラミング過程におけるPax6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	医学博士	中谷 敬
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

## 論 文 の 要 旨

眼内に存在する網膜色素上皮 (RPE) は、神経性網膜 (NR) と脈絡膜血管層との間にあり、NRの生存や視覚情報処理機能に欠かせない組織である。成熟したRPE細胞は、形態的にも機能的にも高度に特殊化しており、生理的な環境下では分裂していない。ところが、NRが外傷を被ると、RPE細胞は、上皮構造を失うとともに増殖し、形質を転換する。ヒトでは、このようなRPE細胞の変化は失明に繋がる疾患の兆候である。一方、有尾両生類のイモリでは、RPE細胞が同様の変化を経ることで網膜が再生する。そのため、イモリ網膜再生の研究は、RPEによる網膜疾患の治療や網膜再生に繋がる基礎的な情報を提供すると考えられる。イモリではこれまでに、眼球からNRを除去すると、RPE細胞が一部の形質を保持しつつ、いくつかの多能性因子 (Sox2, c-Myc, Klf4) とNR/RPE分化に関わる転写因子 (Pax6とMitf) を新たに発現し、ユニークな状態の多能性細胞 (RPESC) にリプログラムされることが明らかにされている。しかし、どのようなシグナルによって再生の開始やRPE細胞のリプログラミングが惹起されるかは明らかではない。

そこで本研究では、Pax6発現に関わるシグナル経路を調べることで、この問題にアプローチしようと試みた。

Pax6には豊富な種類の転写産物やタンパク質アイソフォームが存在し、細胞によって発現する種類や組み合わせが異なることが知られている。そこで、まずイモリの眼球組織に発現するPax6バリエントを網羅的に同定することを試みた。成体アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) 再生眼球のトランスクリプトームデータベースから、既知のクラス (Pax6 v1) のPax6バリエントに加え、3つの新規クラス (Pax6 v2, Pax6 v3, Pax6 v4) のバリエントを得た。この情報をもとに、眼球の各部位にどのクラスのPax6バリエントが発現しているか調査した。その結果、4クラスのPax6バリエント (合計12種類) が、それぞれの組織に異なるパターンで発現していることが分かった。しかし、本研究の焦点であるRPEに発現はなかった。

次にRPE細胞のリプログラム過程で発現するPax6バリエントを調査した。網膜除去後10日目の眼球からRPESCを単離し、それらに発現するPax6を調べた。その結果、Pax6 v1とPax6 v2に属するそれぞれ4つのスプライスバリエント（合計8種類）が発現していることが分かった。興味深いことに、この組み合わせは正常眼球中の網様体辺縁領域（CMZ）のそれと一致していた。CMZには網膜幹細胞／網膜前駆細胞が胚発生時から残存している。

最後に、*in vitro*の実験系をもちいて、Pax6発現に関わるシグナル経路を細胞周期進入との関連で調べた。*in vitro*で眼球の後極側半分からNRの除去手術を施し、10日後のRPE細胞におけるPax6の発現を調べた結果、*in vivo*と同様のパターンでPax6バリエントが発現することが分かった。また、培地に血清や栄養因子を添加しなくても27%のRPE細胞がPax6を発現することが分かった。Pax6陽性細胞の分布パターンから、この発現がRPE細胞の細胞周期再進入と独立である可能性が示唆された。そこで、RPE細胞の細胞周期再進入を阻害するMEK1/2阻害剤（U0126）の効果を調べた結果、予想通りPax6陽性細胞の出現率に影響はなかった。しかし、*in vivo*ではPax6発現と細胞周期再進入は同じ細胞で観察される（すなわち、共役している）。このことから、これらの独立した現象を橋渡しする仕組みが*vivo*に存在する可能性がある。そこで、様々な成長因子の働きを補助するヘパリンを添加してみた。すると、Pax6の発現率が有意に上昇すると共にその増加がU0126の添加によって抑制された。これらの結果は、細胞周期再進入と共役したMEK1/2依存的なPax6発現経路が、ヘパリンあるいはヘパリンと相互作用する何らかの因子により活性化する可能性を示している。言い換えると、*vivo*には、細胞周期再進入とPax6発現を共役させる何らかの因子が存在する可能性がある。

先行研究から、成体イモリRPE細胞の細胞周期再進入には少なくとも3つのシグナル経路が予測されている。すなわち、NR除去後30分以内に一過的に活性化するMEK1/2-ERK1/2シグナル、接触阻止からの解放によって活性化するシグナル、ヘパリン関連因子によるシグナルである。これらの経路に加えて、本研究ではPax6発現に関わる別の経路の存在を予測した。Pax6は、多能性因子と同様に、RPESC（細胞質分裂前）において転写されることから、NR除去後すぐに活性化されるシグナル経路によって制御される可能性がある。この経路が、多能性因子の発現と共通かどうかは不明だが、リプログラミングと関連があることは十分に考えられる。本研究ではさらに、細胞周期再進入とPax6発現を共役させる因子／シグナル経路の存在を予測した。総合すると、再生の開始やRPE細胞のリプログラミングは、複数の因子／シグナル経路が協調することで実現しているようである。今後、イモリの知見をヒトの網膜外傷性疾患の治療と網膜再生に活かすために、これら分子ネットワークの実体解明が是非とも必要である。

## 審 査 の 要 旨

神経性網膜の外傷に起因したRPE細胞のリプログラミングは、イモリの網膜再生とヒトの網膜外傷性疾患の初期過程に共通した現象であるため、それらの比較解析は網膜外傷性疾患の治療と網膜再生の研究に有用な情報を提供すると期待されている。しかし、いずれの動物でもこの現象のメカニズムは未解明である。本研究は、イモリにおいて果敢にこの問題に取り組み、重要な成果を上げた。RPESCに発現するPax6バリエントを網羅的に同定するとともに、同じ組み合わせのバリエントが*in vitro*の網膜外傷時でもRPE細胞に発現することを明らかにした。また、それらの発現が細胞周期再進入とは独立のシグナル経路によって制御される可能性を示すなど、網膜再生とRPE細胞のリプログラミング現象の理解に大きな貢献をした。今後、*in vitro*の実験系を利用したシグナル経路の解明とヒトとの比較解析に繋がると期待される。

平成28年2月2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。