

| | | | |
|---------|---|---------|-------|
| 氏名 | 安室 博文 | | |
| 学位の種類 | 博 士 (理 学) | | |
| 学位記番号 | 博 甲 第 8 5 5 5 号 | | |
| 学位授与年月日 | 平成 3 0 年 3 月 2 3 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 Trigger Mechanism of Retinal Regeneration in the Adult Newt (成体イモリにおける網膜再生の開始メカニズムの研究) | | |
| 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 | 博士 (理学) | 中田 和人 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 博士 (理学) | 和田 洋 |
| 副査 | 筑波大学准教授 | 理学博士 | 坂本 和一 |

論 文 の 要 旨

イモリの驚異的な再生能力は古くから知られているが、再生がどのようなメカニズムによって始まるのかは全く明らかにされていない。本論文で著者はこの問いに答えるべく、イモリの網膜再生系に着目し、研究を行った。

眼球内に存在する網膜は、神経性網膜と網膜色素上皮 (RPE) から構成される。神経性網膜は、光を受容し視覚の基礎となる信号を脳へと送る役割を担い、RPEは網膜の生理的な働きを補助している。イモリでは神経性網膜を除去しても、RPE細胞から完全な網膜を再生することができる。網膜再生を開始するメカニズムについては、主としてRPE細胞がDNA合成期に進むこと (細胞周期進入) を指標として研究が進められてきた。先行する*in vitro*解析から、神経性網膜の除去直後に起こるMEK-ERKシグナルの増強が、5日から10日にかけて起こるRPE細胞の細胞周期進入に関わることが示唆されていた。また、RPE細胞どうしの接着が細胞周期進入に抑制的な役割を果たしており、接着が弱まることでRPE細胞の細胞周期進入に重要であることも示唆されていた。しかしながら、次の3点については疑問が残ったままであった。すなわち、(1) 神経性網膜の除去以外の操作 (眼球の切開や水晶体の除去など) がMEK-ERKシグナルの増強に関与していないか、(2) 細胞間接着が弱まることでどのようにして細胞周期進入が促進されるのか、(3) これら2つの要素の関係性はどうなっているのか、である。本論文の中で著者は、これらの疑問について*in vitro*の解析系を用いて検証し、RPE細胞の細胞周期進入、およびイモリの再生開始メカニズムについて考察した。

著者はまず、網膜除去がMEK-ERKシグナルの増強を引き起こす刺激かどうか調べた。MEK-ERKシグナルの増強が眼球の切開部やそこから漏出する因子によって刺激されているのであれば、その変化は切開部付近に偏って起こるはずである。そこで、リン酸化ERKの核移行を指標として、MEK-ERKシグナルの活性化状態を調べた。その結果、リン酸化ERKの核移行は神経性網膜の除去後30分から60の間に生じ、その変化に領域的な偏りがないことを見出した。これにより著者は、MEK-ERKシグナルの増強が、切開部に起因するものではないことを示した。次に著者は、水晶体を含む角膜側の半球が抑制的な働きをしており、これらを取り除かれたことでMEK-ERKシグナルが増強された可能性を検討した。もしこれが正しいなら、神経性網膜を除去しなくてもリン酸化ERKの核移行が観察されるはずである。しかし、神経性網膜を除去しない状態では、たとえ角膜側の半球を取り除かれたとしても、リン酸化ERKの核移行

は起こらなかった。これらの結果を踏まえ著者は、神経性網膜の除去自体がMEK-ERKシグナルを増強すると結論づけた。

次に著者は、細胞間接着が弱まることで刺激されるシグナル経路について調べた。イモリのRPE細胞にはカルシウム依存性の細胞接着因子であるN-cadherinが発現している。そのため、RPEをカルシウムキレーターであるEGTAで処理すれば細胞間接着を弱めることができる。そこで著者はまず、RPE細胞を細胞周期に進入させるEGTAの処理条件を決定した。次にこの実験系を利用して、細胞間接着の低下によって活性化するシグナル経路の探索を行った。Cadherin結合の低下は、 β -cateninシグナルを駆動することが知られている。そこで著者は、 β -cateninシグナルに着目した。まず、細胞間接着の低下が β -cateninの核移行を促進することを明らかにした。次に、同一条件下で β -cateninシグナルの阻害剤を投与すると、RPE細胞の細胞周期進入率が有意に低下することを明らかにした。さらに、生体内の網膜再生過程において、 β -cateninの核移行がRPE細胞の細胞間接着が弱まる時期（術後3日）に対応して観察されることを示した。これらの結果を踏まえ著者は、細胞間接着が弱まると β -cateninシグナルが活性化し、RPE細胞の細胞周期進入が促進されると結論づけた。

さらに著者は、MEK-ERKシグナルと β -cateninシグナルとの関係性について調べた。MEK-ERKシグナルの増強は術後30分から60分、 β -cateninシグナルの活性化は術後3日とタイミングに差があった。そこで、MEK-ERKシグナルの阻害条件下で β -cateninの細胞内局在を調べた。その結果、 β -cateninの核移行が有意に低下することが判った。この結果から著者は、これら2つの要素が独立ではなく、直列的な関係にあり、 β -cateninシグナルが活性化するためには、MEK-ERKシグナルが前もって活性化していることが必要であると結論づけた。

本論文により著者は、神経性網膜の除去によって刺激されるMEK-ERKシグナルと、細胞間接着の低下によって刺激される β -cateninシグナルという、直列的に並んだ2つの要素が、RPE細胞の細胞周期進入を制御していることを明らかにした。先行する研究により、RPE細胞がDNA合成期から分裂期へと移行するためには、FGF2や血清中の因子などの外因性の因子が必要となることが分かっている。加えて、RPE細胞が分化多能性を獲得する過程には、細胞周期進入とは独立の経路が存在することが予測されている。著者は、これらの知見と本研究の結果を統合することにより、イモリの網膜再生の開始が多段階的に制御されているという仮説を提唱した。

イモリでは、肢など他の組織の再生系でも、細胞の外傷応答やその後起こる組織構造の崩壊、間葉系細胞への形質転換など、網膜再生系と類似したイベントが報告されている。しかしながら、これらの再生系においては、本論文のような高い時間分解能での解析は進んでおらず、再生開始のメカニズムは未だ不明である。本論文で得られた知見から、他の再生系においても、多段階的な制御機構が関与している可能性が考えられる。ただし、網膜再生系においても、MEK-ERKシグナルがどのようにして β -cateninシグナルの活性化に関わるかや、RPE細胞が分化多能性を獲得するまでの分子経路などは不明である。そのため著者は、イモリの再生開始メカニズムをより深く理解するために、今後これらのメカニズムを中心に研究を進める必要があると考察した。

審 査 の 要 旨

著者は、網膜再生を惹起する主要なシグナル系を明らかにするとともに、再生の開始が多段階で厳密に制御されているとする仮説（多段階式惹起モデル）を初めて提唱し、これまで未知であった成体イモリの再生開始メカニズムの理解に大きく貢献した。イモリにおいては、組織・器官が生理的な状態を維持している条件下では、潜在する高い病理的再生（外傷などによって始まる再生）の能力は制限されなければならない。著者が提唱したモデルは、こうした生理状態の維持にも関わる重要なメカニズムである。今後、様々な組織の再生系において検証・評価されることで、複合組織の自律的再生の基本原理の理解に貢献するものと期待される。

平成30年1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。