

論文の内容の要旨

論文題目 c-kit and SSEA1 define temporally and spatially distinct progenitor subsets in
developing mouse retina

和訳 マウス発生期網膜からの未分化前駆細胞の単離と解析

指導教員 渡邊 すみ子 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

高祖 秀登

網膜は中枢神経の一部であり、一度傷害を受けると機能回復は困難である。そのため、再生医療が待ち望まれている。近年、成体マウスの網膜周辺部を機械的に単離して培養すると、増殖して網膜細胞に分化することが報告された。同様の現象がヒトでも報告され、哺乳類成体の網膜に幹細胞が残っている可能性が示された。この幹細胞を操作できれば、再生医療の実現に近づくことが期待できるが、いまだこれらの細胞の性質は明らかではない。その理由の一つとして、網膜幹細胞／前駆細胞に特異的な表面抗原が分かっていないことが挙げられ、実際、網膜細胞集団を分画して **Prospective** に幹細胞を同定した研究の報告はない。

本研究では、網膜前駆細胞の解析が進んでいる発生期網膜に着目して、網膜前駆細胞に発現する表面抗原を同定し、各々の細胞集団の増殖と分化を比較検討することで、未分化網膜前駆細胞集団を同定することを目的とした。さらに、それらの細胞集団の発生を制御するシグナル伝達経路を解析することで、網膜前駆細胞の未分化性を維持する分子機構についても解析を進めた。

網膜は 6 種類の神経細胞と 1 種類のグリア細胞からなる。発生期には、単一種の網膜前駆細胞からこれらの細胞が、決まった順序で分化する。この順序は、細胞外の環境に依存しないため、網膜前駆細胞はその性質を時間とともに変えると考えられてきた。しかし、異なる時期の網膜前駆細胞に特異的なマーカーが限られていることもあって、網膜前駆細胞自身の変化については十分に解析が行われていないのが現状である。そこで、時期特異的な前駆細胞を単離して比較検討することで、網膜前駆細胞の分化系譜を明らかにしようと考えた。

異なる時期の前駆細胞に特異的なマーカーとして、転写因子や細胞周期制御因子などが候補となるが、これらは細胞内分子のために細胞分画には適さない。表面抗原は、セルソーターを用いることで特定の細胞集団の単離を可能とし、各々の集団を比較することで未分化細胞集団の prospective な同定が可能である。CD 抗原は、血液細胞の分画と解析に広く用いられているが、発生期網膜における発現の知見は限られている。そこで、まず発生期の網膜細胞を用いて 130 種類以上の CD 抗原の発現を解析した。その結果、20 種類以上の表面抗原が発生期網膜細胞で発現していることが分かり、中でも SSEA-1 と c-kit が、以下で示すように網膜前駆細胞の新規表面抗原であることが明らかになった。

SSEA-1 は、Lewis X 糖鎖抗原であり、ES 細胞や神経幹細胞で発現が報告されている。成体網膜では、一部の分化細胞で発現が報告されているが、発生期網膜における報告はない。c-kit は、受容体型チロシンキナーゼであり、リガンドとして SCF (stem cell factor) が知られている。変異マウスの解析から、c-kit シグナルが造血細胞、生殖細胞、色素細胞の発生に関与することが報告されている。成体網膜では、c-kit が一部の分化細胞で発現していることが報告されているが、発生期網膜での発現と機能に関しては報告がない。

発生期網膜では、SSEA-1 は初期（胎生 14 日前後）に広い範囲で発現を認めた。しかし発生後期（胎生 17 日ー生後 1 日）には、その発現は網膜周辺部に限局した。一方 c-kit

は、初期には発現レベルが低いのが、発生後期に発現レベルが上がり、中心部から周辺部へ向かって網膜全体で広く発現していた。網膜前駆細胞の大部分は増殖しており、マーカーとして Ki67 を発現している。SSEA-1 や c-kit を Ki67 と二重染色すると、Ki67 陽性細胞は SSEA-1、c-kit を発現していた。次に、網膜細胞を SSEA-1 と c-kit、Ki67 で三重染色したところ、Ki67 陽性細胞は発生につれて、SSEA-1 と c-kit の発現を変化させていくことが分かった。以上より、SSEA-1、c-kit が網膜前駆細胞で発現しており、さらに網膜前駆細胞に SSEA-1(+)c-kit(-)、SSEA-1(+)c-kit(+)、SSEA-1(-)c-kit(+)という異なる集団が存在することが明らかになった。

次に、SSEA-1 と c-kit を指標として、異なる網膜前駆細胞集団を単離して増殖と分化を比較した。単離細胞を標識するために GFP トランスジェニックマウスを用い、また増殖と分化を評価するために、*in vitro* でも前駆細胞が生体内に近い挙動をすることが報告されている再凝集培養系を利用した。まず、SSEA-1 陽性細胞と陰性細胞を分画したところ、SSEA-1 陽性細胞の方が高い増殖能と分化の遅れを示し、SSEA-1 が未分化性の指標であることが示唆された。次に、c-kit 陽性細胞と陰性細胞を分画したところ、増殖細胞は c-kit 陽性分画に濃縮されることが分かった。さらに、c-kit 陽性分画を c-kit(+)SSEA-1(+)の共陽性分画と c-kit(+)SSEA-1(-)の単一陽性分画に分けたところ、共陽性細胞の方が高い増殖力を示して、さらに視細胞とグリア細胞に分化し、未分化であることが分かった。以上の結果から、SSEA-1 と c-kit の発現レベルが異なる前駆細胞は、異なる増殖能と分化能を有することが明らかになり、特に SSEA-1 陽性の周辺部前駆細胞は、内因性に未分化な性質を持っていることが示された。

次に、網膜周辺部の SSEA-1 陽性細胞と、中心部の c-kit 陽性細胞がどのような分子機構によって維持されているかを解析した。SSEA-1 陽性、陰性細胞分画と、c-kit 陽性、陰性細胞分画から各々 cDNA を合成して、網膜前駆細胞の増殖、分化を制御することが

知られている転写因子とシグナル伝達経路（FGF、EGF、Shh、Notch、Wnt）の遺伝子発現を比較した。その結果、c-kit 陽性分画では、前駆細胞に特異的な遺伝子が高発現しているのに対して、c-kit 陰性分画では、視細胞の分化に関与する遺伝子が高発現していた。さらに、Notch は両方で発現しているのに対して、標的遺伝子 Hes1、Hes5 は c-kit 陽性分画のみで発現していた。そこで、次に Notch シグナルと c-kit の発現の関係を調べた。発生期網膜を単離して、フィルター上で体外培養すると、前駆細胞は生体に近い挙動で増殖と分化をすることが報告されている。この体外培養系にレトロウイルスを加えることで、増殖細胞（前駆細胞）に外来遺伝子を強制発現させることができる。この系を用いて Notch シグナル伝達分子を導入して、Notch シグナルを活性化したところ、遺伝子導入細胞は c-kit を高レベルで発現することが分かった。このことから、Notch シグナルが c-kit 陽性細胞を正に制御していることが示された。

次に、SSEA-1 陽性細胞と陰性細胞分画の遺伝子発現を比較したところ、大部分の遺伝子は両方で発現していたが、Wnt シグナル関連分子の発現レベルに違いを認めた。そこで、Wnt シグナル伝達分子を導入して、Wnt シグナルを活性化したところ、SSEA-1 陽性細胞の割合が増加した。このことから、SSEA-1 陽性細胞は Wnt シグナルによって正に制御されていることが示された。Notch シグナルと c-kit、Wnt シグナルと SSEA-1 という関係は互いに特異的であり、以上より異なる領域の前駆細胞は、異なるシグナル伝達経路によって制御されていることが示唆された。

最後に、c-kit シグナルが網膜前駆細胞の分化に及ぼす影響を解析した。網膜前駆細胞が増殖を止めると c-kit の発現は急速に低下する。そこで、レトロウイルスを用いて、前駆細胞で恒常的に c-kit を発現させて、SCF により c-kit シグナルを恒常的に活性化したときの影響を解析した。コントロールでは SCF の添加は増殖に影響を与えなかったが、c-kit を恒常的に発現する細胞では増殖が促進した。増殖細胞は、未分化細胞のマーカーNestin を発現していた。次に分化を調べたところ、コントロールでも SCF の添加は

軽度にグリア細胞への分化を促進したが、c-kit を恒常的に発現した細胞では、視細胞への分化が抑制され、グリア細胞への分化が高度に促進された。これらより、恒常的な c-kit シグナルは、網膜前駆細胞を未分化状態に保って増殖を促進し、最終的にグリア細胞へと分化させることが分かった。c-kit は、SCF と結合すると細胞内チロシン残基を自己リン酸化して PI3K と MAPK シグナルを活性化することが知られている。そこで、各々の活性が抑制される c-kit 変異体を用いて解析したところ、c-kit の作用には MAPK (MEK-ERK) シグナル伝達経路が主な役割を果たすことが分かった。実際に、MEK 阻害剤を用いることで、c-kit の作用が抑制されることが確認された。

以上、本研究では、網膜前駆細胞の新規表面抗原として SSEA-1 と c-kit を同定し、これらが時間的・空間的に異なる前駆細胞を標識することを明らかにした。さらに in vitro の実験から、網膜前駆細胞の未分化性が SSEA-1(+)c-kit(-) -> SSEA-1(+)c-kit(+) -> SSEA-1(-)c-kit(+) の順で規定されることが示唆された。これらの SSEA-1 陽性細胞と c-kit 陽性細胞は、各々 Wnt シグナルと Notch シグナルによって制御されていた。また、c-kit シグナルを恒常的に活性化することで、MAPK シグナルを介して、前駆細胞の未分化性を維持する作用が示唆された。