

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 高 祖 秀 登

本研究は、網膜再生の基礎研究として、網膜幹細胞／前駆細胞の同定を試み、また未分化性を維持する分子機構を探索した研究であり、下記の結果を得ている。

1. 表面抗原の網羅的な発現解析から、SSEA-1 と c-kit が発生期網膜前駆細胞で発現することを示した。さらに免疫染色と in situ hybridization により、SSEA-1 は発生初期に、c-kit は発生後期に発現することを示した。空間的には SSEA-1 は網膜周辺部に、c-kit は網膜中心部に発現することを示した。これらより、SSEA-1 と c-kit が時間的、空間的に異なる網膜前駆細胞集団を標識することを明らかにした。
2. セルソーターを用いて SSEA-1 陽性細胞と c-kit 陽性細胞を単離し、in vitro の再凝集培養系を用いて、これらの細胞が増殖能と神経細胞への分化能を有することを示し、発生期網膜から未分化前駆細胞を単離できることを示した。
3. SSEA-1 と c-kit を組み合わせて、SSEA-1、c-kit 共陽性細胞と SSEA-1 陰性 c-kit 陽性細胞を単離し、増殖能と分化能を比較することで、SSEA-1、c-kit 共陽性細胞の方が未分化な性質を持つことを示した。
4. SSEA-1 陽性細胞と陰性細胞の発現遺伝子を RT-PCR により比較し、Wnt シグナル関連分子の発現レベルに差があることを示した。さらに、 β カテニンあるいは Lef1 の変異体を網膜前駆細胞に遺伝子導入して Wnt シグナルを活

性化すると、SSEA-1 陽性細胞の割合が増えることを示した。

5. **c-kit** 陽性細胞と陰性細胞の発現遺伝子を RT-PCR により比較し、Notch シグナル関連分子の発現レベルに差があることを示した。さらに、Notch の変異体を遺伝子導入して Notch シグナルを活性化すると、**c-kit** 陽性細胞の割合が増え、一方 Numb を遺伝子導入して Notch シグナルを阻害すると **c-kit** 陽性細胞の割合が減少することを示した。
6. 網膜前駆細胞に **c-kit** を強制発現させて SCF を投与し、**c-kit** シグナルを恒常的に活性化すると、前駆細胞は未分化なまま増殖を続け、最終的にグリア細胞へ分化することを示した。さらに、この作用は MAPK シグナル伝達経路を介することを示した。

以上、本論文は SSEA-1 と **c-kit** を用いて、発生期網膜から初めて未分化前駆細胞の単離を報告した。そして、これらの前駆細胞の維持に Wnt、Notch、**c-kit**-MAPK シグナルが関与することを明らかにした。特に、これまで未知に等しかった網膜前駆細胞の分化系譜に関して、SSEA-1 と **c-kit** を用いて未分化性が異なる前駆細胞集団の存在を示したことは、網膜発生過程の解明に重要な貢献をなすと考えられる。また臨床医学的観点からも、網膜前駆細胞に発現する表面抗原を同定したことは、網膜再生医療の実現に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。