

## 論文の内容の要旨

論文題名 : Analysis of the molecular mechanism to maintain the undifferentiated state of the retinal stem cells

網膜幹細胞未分化性維持の分子機構の解明

指導教員 : 渡辺 すみ子 客員教授

東京大学大学院医学系研究科

平成16年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

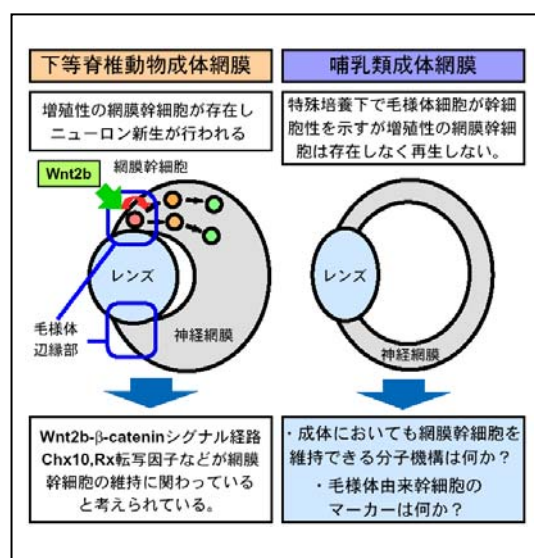
氏名 : 大内 靖夫

### <要旨>

#### 1. 背景

網膜幹細胞は魚類などの下等脊椎動物では成体においても網膜辺縁部に存在し生涯を通じて増殖し細胞を補充しつづけることが知られているが、哺乳類ではこのような細胞は存在せず、哺乳類成体においても幹細胞を維持しうる細胞内シグナル、転写制御といった分子基盤の解明は発生学、幹細胞学の観点から一つの重要課題とされている。一方近年、哺乳類成体毛様体組織の細胞が Neurosphere 法にて培養することにより、網膜幹細胞様の性質を示すことが Retrospective な解析から明らかになり網膜幹細胞の供給源として期待されているが、いまだマーカーも不明であり、細胞表面抗原を用いた Prospective な同定とその幹細胞性を示す細胞の起源の解明が待たれている。

本研究では以上の課題を明らかにするため、網膜幹細胞の未分化性に関する(1)細胞内シグナル、(2)転写制御、(3)細胞表面抗原に着目し研究を行った。

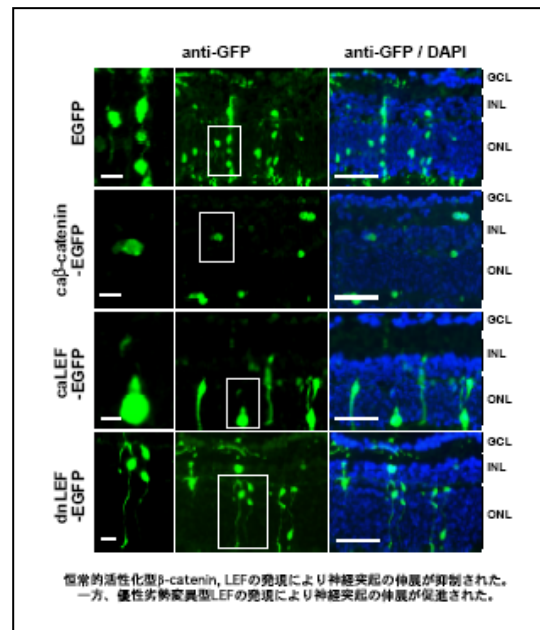


## 1. 細胞内シグナルの解析

### 網膜幹細胞、前駆細胞における Wnt シグナルの機能解析

近年、様々な幹細胞の未分化性維持因子として報告されている Wnt シグナル伝達経路に着目し哺乳類網膜前駆細胞における機能を明らかにすることを目的とし、マウス網膜体外培養系、Cre-LoxP システムを用いたトランスジェニックマウスの系を用いて Wnt シグナルを活性、不活性化し解析を行った。

マウス胎生 17 日目、網膜体外培養系にレトロウイルスベクターを用いて前駆細胞特異的に Wnt シグナルに関する変異体を導入し細胞の形態、増殖、分化、網膜内での局在について解析した。その結果、後期網膜前駆細胞の解析系であるマウス網膜対外培養系における Wnt シグナルの活性化は網膜前駆細胞の増殖、細胞分化系譜に影響を与えず神経突起の伸長つまり細胞形態の成熟を阻害した。一方、Wnt シグナルの抑制は神経突起の伸展を促進した。また同様の結果は PC12 細胞を用いた NGF 依存性の神経突起の伸長モデルにおいても認められ、神経突起の伸展に必要とされる MAPK の活性化には影響を与えず神経突起の制御を行っていることが示唆された。

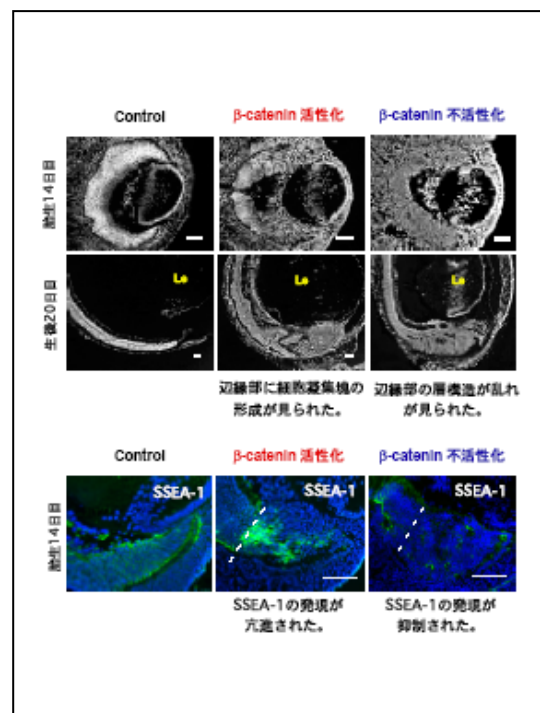


次により初期に存在する網膜前駆細胞における in vivo での役割を明らかにするため、Cre-LoxP システムを用い Wnt シグナル伝達経路の主要な構成分子であるβ-catenin を網膜前駆細胞特異的に活性化、不活性化し解析を行った。

その結果、初期網膜前駆細胞における Wnt シグナルの活性化、不活性化ではそれぞれ Wnt シグナルを活性、不活性化した辺縁部において細胞の凝集塊、層構造の乱れが見られた。

また辺縁部未熟網膜前駆細胞のマーカーである SSEA-1 の発現細胞がそれぞれ増幅、減少した。しかし、Wnt シグナルの活性化によりその後分化マーカーの発現が認められなくなるものの、前駆細胞の増殖は促進されなかった。また Wnt シグナルを不活性化した場合においても前駆細胞の増殖には大きな影響は認められなかった。

以上の結果から Wnt シグナル伝達経路はマウス網膜前駆、幹細胞において細胞増殖に影響を与えず細胞の形態的成熟、細胞運命の決定といった細胞分化過程を抑制していることが示唆された。

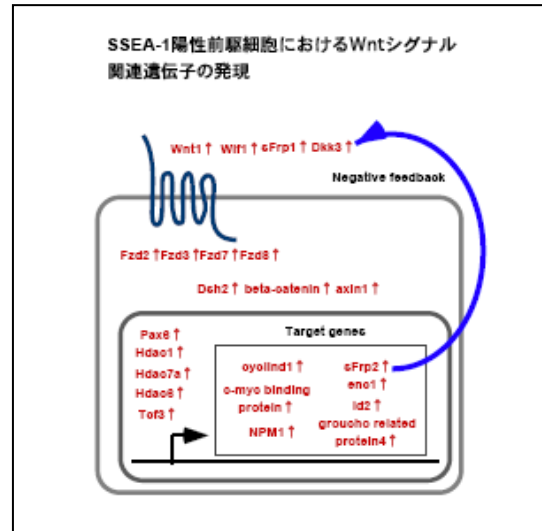


次に当教室で作成した DNA Microarray のデータベースを用いてこの Wnt シグナルによって制御

を受ける SSEA-1 陽性の辺縁部未熟網膜前駆細胞の遺伝子発現強度を解析し、SSEA-1 陽性細胞および Wnt シグナルの網膜前駆細胞における機能について考察を試みた。

その結果、SSEA-1 陽性細胞ではリガンドの発現強度はかなり低いものの、Wnt シグナルの受容体、Targets 遺伝子、Negative feedback 分子の発現が中心部前駆細胞に比べ増強していた。このことから SSEA-1 陽性の辺縁部未熟網膜前駆細胞は Wnt 受容細胞であり Wnt シグナルを受容すると同時に Negative feedback によりシグナルを遮断する辺縁部に短期間存在する未熟な前駆細胞分画であると推測できる。

また、Wnt シグナル伝達経路の Targets 遺伝子として癌関連遺伝子として知られる CyclinD1, c-myc, NPM1, Enc1, id2 といった遺伝子発現が上昇していた。中でも、NPM1, Enc1, id2 といった分子は、NPM1 欠損マウスは眼球が形成されないことが報告されているもののこれまで網膜において研究されていなく、癌細胞において細胞増殖促進、分化抑制といった様々な機能を持つことが報告されていることから、これらの分子が SSEA-1 陽性網膜前駆細胞の未熟性に何らかの関与している可能性が考えられる。

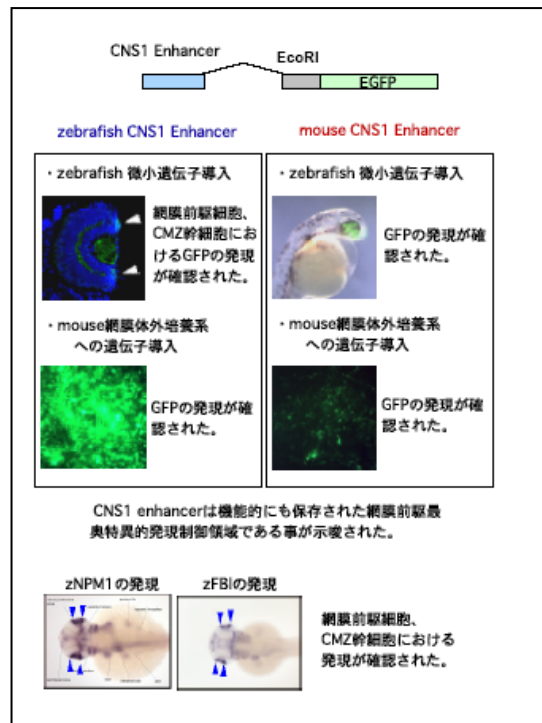


## 2. 転写制御の解析

**Chx10 遺伝子における進化的に保存された網膜前駆細胞特異的発現制御領域及びその上流因子の同定**

Chx10 および魚類における相同遺伝子 Vsx2 は進化的に保存された神経網膜前駆細胞を維持するのに重要な遺伝子であり、Chx10 および相同遺伝子の変異により小眼球になることが様々な種で報告されている。本研究では前駆細胞の未分化性の維持に関与する転写制御の一旦の解明を目的とし、この Chx10 遺伝子の進化的に保存された網膜前駆細胞特異的発現制御領域を同定すると同時に上流因子の探索を行った。

その結果、Chx10 遺伝子における進化的保存された網膜前駆細胞特異的遺伝子発現制御領域として CNS1 を Bioinformatics による解析にて推定し、ゼブラフィッシュ、マウスにおける GFP レポーター遺伝子の発現解析により同定した。さらにこの同定した領域における網膜前駆細胞での発現に必要なモチーフの解析をゼブラフィッシュを用いて行い、同定したモチーフに対するタンパク質の結合を EMSA 法にて確認した。続いてこのモチーフに対する結合タンパク質を同定するため、磁気ビーズを用いてこのモチーフに結合するタンパク質を精製しプロテオミクス解析にて解析を行った。その結果、上流因子の候補として NPM1、Fb1 を同定した。こ

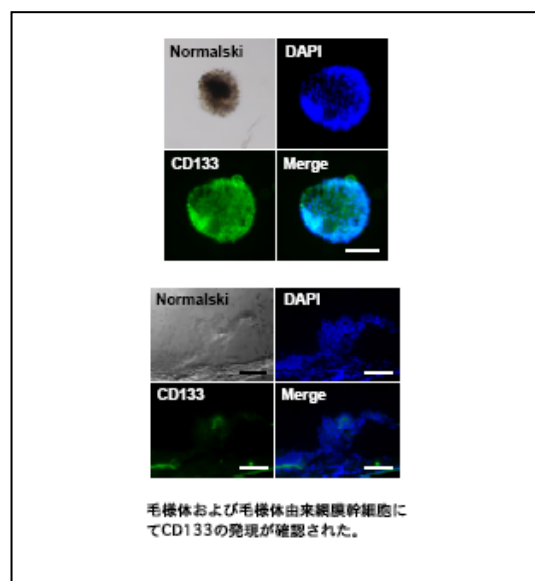


これらのゼブラフィッシュにおける相同遺伝子の発現を解析した結果、発生初期においてはユビキタスに発現するものの、その後、網膜前駆細胞、網膜辺縁部の網膜幹細胞にて強く発現することが見られた。また NPM1 遺伝子欠損マウスは眼球が形成されないこと、Fb1 遺伝子欠損マウスは発生初期における細胞増殖が抑制され致死になることが報告され細胞増殖に重要な機能を持っていることから、これらの分子の網膜前駆細胞の維持への関与が示唆された。

### 3. 細胞表面抗原の解析

#### 細胞表面抗原を用いた毛様体由来網膜幹細胞の同定

近年、哺乳類成体における網膜幹細胞の供給源として注目がされている毛様体における毛様体由来網膜幹細胞の Prospective な同定を目指し、成体マウス毛様体及び、Neurosphere 法にて増幅した毛様体由来網膜幹細胞の凝集塊に共通して発現する細胞表面抗原として CD133 に着目した。FACS および免疫染色などの解析からこの CD133 陽性細胞は成体マウス毛様体の先端部に存在する若干の色素顆粒をもった希少な細胞集団であることがわかった。このことから CD133 陽性細胞は毛様体色素上皮細胞の一部の細胞であり、この細胞表面が毛様体由来網膜幹細胞の起源の解明につながることを期待できる。



### 4. 総括

以上の結果により、哺乳類網膜幹細胞の未分化性の維持において Wnt シグナルの活性化は細胞増殖の促進には寄与せず、網膜幹細胞、前駆細胞の細胞の形態的成熟、細胞運命の決定といった分化過程において抑制的働いていることが示唆され、NPM1, id2, Enc1 といった癌の悪性化に関連する Wnt シグナルターゲット遺伝子の発現を介していることが考えられる。

また、網膜幹細胞の未分化性維持において幹細胞の増殖に重要な機能をすることが知られている Chx10 遺伝子の網膜幹細胞、前駆細胞特異的な転写制御は、魚類、哺乳類間で保存された CNS1 エンハンサーによって制御されており、NPM1、Fb1 といった分子がこの領域結合タンパク質として同定された。これらの分子が網膜幹細胞における Chx10 遺伝子の転写制御に寄与している可能性が示唆された。

一方、網膜幹細胞の未分化性の維持において、成体毛様体組織から Neurosphere 法にて作成される毛様体由来網膜幹細胞は細胞表面抗原として CD133 を発現しており、毛様体においては毛様体色素上皮の一部の細胞において CD133 の発現が認められたことから、網膜幹細胞が成体毛様体組織で維持されているのではなく、一部の上皮細胞が transdifferentiation することで幹細胞性を獲得する可能性が考えられる。