

審査の結果の要旨

氏名 大内 靖夫

本研究は網膜幹細胞の未分化性維持の分子機構の解明を目的とし、網膜幹細胞の未分化性に関する(1)細胞内シグナル(網膜幹細胞、前駆細胞における Wnt シグナルの機能解析)、(2)転写制御(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)、(3)細胞表面抗原(細胞表面抗原を用いた毛様体由来網膜幹細胞の同定)に着目し研究を試みたものであり、下記の結果を得ている。

(1)細胞内シグナル(網膜幹細胞、前駆細胞における Wnt シグナルの機能解析)

(i)胎生 17 日目マウス網膜体外培養系を用いた後期網膜前駆細胞における機能解析

1. 胎生 17 日目マウス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遺伝子導入し $\beta$ -catenin の下流シグナルの活性化、抑制実験を行い、細胞形態、増殖、分化系譜について解析を行った結果、 $\beta$ -catenin の下流シグナルの活性化、不活性化により細胞の増殖、分化系譜には変化は見られないものの活性化により神経突起の伸長が阻害された。
2. 神経突起伸長モデル系とし PC12 細胞に Wnt シグナルに関する変異体を遺伝子導入し $\beta$ -catenin の下流シグナルの活性化、抑制した状態における NGF 依存性の神経突起の伸長を解析した結果、 $\beta$ -catenin の下流シグナルの活性化、不活性化により神経突起の伸長がそれぞれ有意に阻害、促進された。
3. PC12 細胞における神経突起の伸長には MAPK シグナル伝達経路の活性化が必要であることから、PC12 細胞において MAPK の活性化により発現が上昇することが知られている cfos、elk-1 遺伝子のプロモーターの活性を一過性のルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いて解析を行った。その結果、恒常的活性化型 Mek の遺伝子導入によるこれらのレポーター遺伝子の活性化に対し、恒常的活性化型 Lef の遺伝子導入は影響を与えなかった。
4. 一部の神経細胞において神経突起の伸展には MAPK シグナル伝達経路の活性化が必要なことが報告されていることから、網膜発生過程における MAPK の活性化およびその機能解析を MEK 阻害剤、MAPK シグナル伝達経路の変異体を用いて行ったが細胞の増殖、分化系譜、神経突起の伸長に影響を及ぼさなかった。

(ii) Cre-LoxP システムを用いた網膜幹細胞、初期前駆細胞における機能解析

5. 初期に存在する網膜幹細胞、初期前駆細胞における *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  $\beta$ -catenin を Pax6  $\alpha$ -Cre マウスを用い網膜前駆細胞特異的に活性化、不活性化し網膜の形態について解析を行った。その結果、初期網膜前駆細胞における  $\beta$ -catenin の活性化、不活性化ではそれぞれ  $\beta$ -catenin 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。
6.  $\beta$ -catenin の活性化、不活性化マウス網膜における各種網膜細胞のマーカー、細胞増殖について解析を行った。その結果、辺縁部未熟網膜前駆細胞のマーカーである SSEA-1 の発現が  $\beta$ -catenin の活性化、不活性化によりそれぞれ増幅、減少した。一方、 $\beta$ -catenin の活性化により各種網膜細胞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  $\beta$ -catenin 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。

(iii) DNA Microarray を用いた SSEA-1 陽性の辺縁部未熟網膜前駆細胞における Wnt シグナル関連遺伝子の遺伝子発現強度の解析

7. DNA Microarray を用い SSEA-1 陽性の辺縁部未熟網膜前駆細胞、c-kit 陽性中心部網膜前駆細胞における Wnt シグナル関連遺伝子の遺伝子発現強度の解析を解析し SSEA-1 陽性細胞において有意な発現の変化が認められる遺伝子を解析した。その結果、SSEA-1 陽性の辺縁部未熟網膜前駆細胞において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 シグナルの Targets 遺伝子として癌関連遺伝子としてよく知られている CyclinD1, c-myc, NPM1, Enc1, id2 といった遺伝子の発現が上昇していた。

(2) 転写制御 (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)

8. 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 CNS1 を Bioinformatics を用いたゲノムの保存性解析にて推定し、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機能解析により同定した。またゼブラフィッシュを用いた CNS1 領域における網膜前駆細胞特異的な発現に必要なモチーフを解析から MotifII、MotifIII を同定した。
9. 同定した MotifII、MotifIII の DNA 断片に対するタンパク質の結合を EMSA 法にて確認した結果、複数のタンパク質の結合が認められた。また、このモチーフ結合タンパク質を磁気ビーズにて精製し SDS-PAGE にて解析した結果、複数のタンパク質の結合が認められ、MALDI-TOF/TOF-MASS にて解析した結果 NPM1、Fb1 などのタンパク質を同定した。

1 0. 同定した NPM1、Fb1 遺伝子のゼブラフィッシュにおける相同遺伝子の発現をデータベースを用いて解析した結果、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限局した発現することが見られた。一方、マウス網膜発生過程における発現を RT-PCR にて解析した結果、どちらの遺伝子も発生と共に発現が減弱し、NPM 1 に関しては成体網膜においても発現が認められうることがわかった。また NPM1 の発現を免疫染色にて解析した結果、発生初期の網膜前駆細胞において核内に限局した発現を示し、発生と共にその核内に限局した発現が辺縁部に限局してくることが認められた。

(3) 細胞表面抗原（細胞表面抗原を用いた毛様体由来網膜幹細胞の同定）

1 1. 成体マウス毛様体組織を Dispase I, Trypsin にて乖離し Flow cytometry を用いて CD133, CD138, SSEA-1 の発現解析を行った結果、CD133, SSEA-1 陽性細胞の存在が認められた。一方、成体マウス毛様体から Neurosphere 法にて作成した毛様体由来網膜幹細胞の凝集塊においては CD133 の発現が認められた。

1 2. CD133 のマウス網膜発生段階での発現を解析した結果、胎生 1 4 日目においてにて apical 側の前駆細胞において発現が認められ、生後 2 0 日目においては視細胞の外節部分において発現が認められた。一方、毛様体においては発生段階では顕著な発現は見られず、生後 2 0 日目において若干の細胞で陽性細胞が確認された。

1 3. 成体マウス毛様体における発現を解析した結果、毛様体先端部の内部においてその発現が認められた。一方、毛様体組織を乖離し染色を行った結果、CD133 陽性細胞は若干の色素顆粒をもった細胞で認められた。透過型電子顕微鏡にてこの毛様体先端部の微細形態を確認した結果、特に神経前駆細胞様の細胞は確認されず、色素顆粒の少ない毛様体色素上皮細胞が存在していた。

以上、本論文は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た3つのアプローチの解析から、未分化性維持に寄与する細胞内シグナルとして哺乳類網膜幹細胞、前駆細胞における Wnt シグナルの活性化は細胞の増殖には寄与せず、細胞の形態的成熟、細胞運命の決定といった分化過程に抑制的に働いていることを明らかにした。

また、未分化性に関与する転写制御解析として Chx10 遺伝子の進化的に保存された網膜幹細胞、前駆細胞特異的発現制御領域発現制御領域を同定し、その上流因子の候補として NPM1, Fb1 を同定した。一方、毛様体由来網膜幹細胞の細胞表面抗原の解析から CD133 を同定し、毛様体色素上皮細胞の一部が transdifferentiation により幹細胞性を獲得する可能性があることを明らかにした。

本研究はこれまで未知に等しかった、網膜幹細胞の未分化性維持における Wnt シグナルの機能、Chx10 遺伝子の転写制御、また毛様体由来網膜幹細胞の起源の解明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。