

論文の内容の要旨

論文題目 網膜細胞分化における機能的分子の解析

指導教員 山下直秀教授

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

内科学専攻

井上 真理子

<緒言>

高齢化社会を迎え、加齢に伴って進行する疾病に起因する中途失明は増加傾向にあり、眼の機能維持、再生は重要な社会的課題となっている。失明や視力低下を来す疾患には、視細胞の変性や消失が直接の原因であるものがあり、その治療法の一つとして視細胞移植が検討されてきた。しかし、移植する細胞の種類、供給源など明らかにすべき問題は多く、臨床への応用の道はまだまだ遠い。

脊椎動物の神経網膜は7種類の細胞が形成する3層構造から成る。外顆粒層に存在する2種類の視細胞、桿体と錐体は、視覚情報を最初に受容する極めて重要な細胞である。7種類の異なる細胞はすべて、共通の多能性網膜前駆細胞から、一連の順序に従って発生し、転写因子などの内因性要素と外因性シグナルがその制御に関与していると考えられているが、いまだ不明の点も多い。私は、視細胞の再生を最終目標として、視細胞の発生制御メカニズムの解明のため、2つのアプローチにより研究を行った。

1つ目は、視細胞特異的に発現する表面マーカーの同定を目的とした研究である。幹細胞あるいは細胞移植による再生の研究は、血液学が大きくリードしているが、この進展には細胞表面抗原による細胞の分化系列の決定と、それによる特定の血液細胞亜集団の単離、精製が可能であることが大きく寄与していると考えられる。それに対して、これまでに報告されてきた視細胞特異的な分子はすべて細胞内に局在するものであり、7種類の網膜細胞の中から視細胞のみを生きのまま選別することを困難にしていた。私の所属する研究グループでは、フローサイトメトリーを用いて発生期マウス網膜に発現するCD抗原の探索を行ってきたが、その中で、CD73は、出生前後に発現し始め、その後、発生経過に伴って発現細胞数が増加、成体では網膜細胞の90%以上に発現していた。これは、桿体の発生と、時期、数ともに類似したパターンであることから、CD73が桿体特異的に発現するとの仮説をたて解析を進めた。

2つ目は、錐体の分化に関与する核内受容体の同定を目的に行った研究である。私の所属する研究グループでは、発生期網膜における核内受容体の発現を免疫染色によって網羅的に解析してきた。その中で、Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors (COUP-TFs)では、相同性の高い2つのhomolog、COUP-TF I、COUP-TF IIが、それぞれ、胎生期網膜の腹側、背側に強く発現する傾向を認めた。これは錐体の感光色素であるSオプシン、Mオプシンの分布とそれぞれ類似していることから、COUP-TFsが錐体の分化、さらにはオプシンの発現に関与しているとの仮説をたてた。

<方法と材料>

生後1日目のマウス網膜細胞からCD73陽性細胞と陰性細胞とを分離・培養し、成熟した桿体に含まれる感光色素であるロドプシンに対する抗体を用いた蛍光免疫染色によって、CD73発現細胞の、桿体への分化を検討した。さらに、RT-PCRを用いて、発生過程の桿体におけるCD73の発現を、桿体の分化に寄与する既知の分子と比較した。発生期網膜におけるCD73の役割と、CD73の発現に対する転写因子の影響は、

マウス網膜体外器官培養系にレトロウイルスベクターを用いた強制発現にて解析した。アデノシンの作用は、その存在下で網膜を体外培養して検討した。

マウス網膜におけるCOUP-TFsの時間的空間的発現パターンは、蛍光免疫染色にて解析した。次に、その役割の解析のため、マウス網膜体外器官培養系にレトロウイルスベクターを用いてCOUP-TFsの強制発現を行った。COUP-TFsによる制御機構を解析するため、Y79 retinoblastoma細胞にCOUP-TFsを強制発現し、内因性のNrlの発現をRT-PCRで検討した。

<結果>

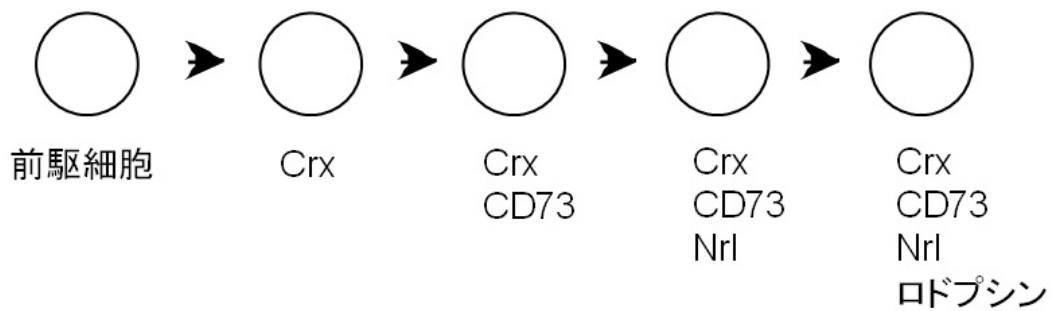
D) CD73に関する研究

生後1日目のCD73陽性細胞はロドプシンを発現していないが、9日目では大多数のCD73陽性細胞で発現を認めた。また、眼球切片の免疫染色では、CD73は桿体の発生部位に一致して、ロドプシンよりも早期から発現していた。さらに、生後1日目のマウス網膜から単離したCD73陽性細胞は、*in vitro*において、陰性細胞より早い時間経過で視細胞分化を遂げたため、CD73は視細胞とその前駆細胞を早期からマークすると予想された。

そこで、次に、分化過程の桿体におけるCD73発現時期の解析のため、桿体分化における重要な転写因子であるCrx、Nrlと、CD73の発現時期を比較した。CD73はCrxよりも遅く、Nrlよりも早期に発現してくることがわかり、また、Crxを強制発現すると、CD73陽性細胞が増加した。以上より、桿体へと分化する細胞のなかで、CD73はCrxの下流に位置することが示唆された。

次に、視細胞分化におけるCD73の機能を検討した。CD73はecto-5'-nucleotidaseとも呼ばれ、細胞外AMPをアデノシンに変換する酵素である。発生期網膜細胞でアデノシン受容体の遺伝子発現を認めたことから、アデノシンが網膜に作用すると考えた。胎生期マウス網膜体外培養系にCD73を強制発現しても層構造や各細胞の数に変化は認めなかったが、アデノシンを添加して培養すると、1週間

前後でロドプシン陽性細胞の有意な増加を認めた。しかしながら、さらに培養を継続すると差を認めなくなったことから、アデノシンは細胞の運命変化を伴わずに桿体の成熟のスピードを促進させたことが示唆された。



<視細胞分化における CD73 の発現>

II) COUP-TFs に関する研究

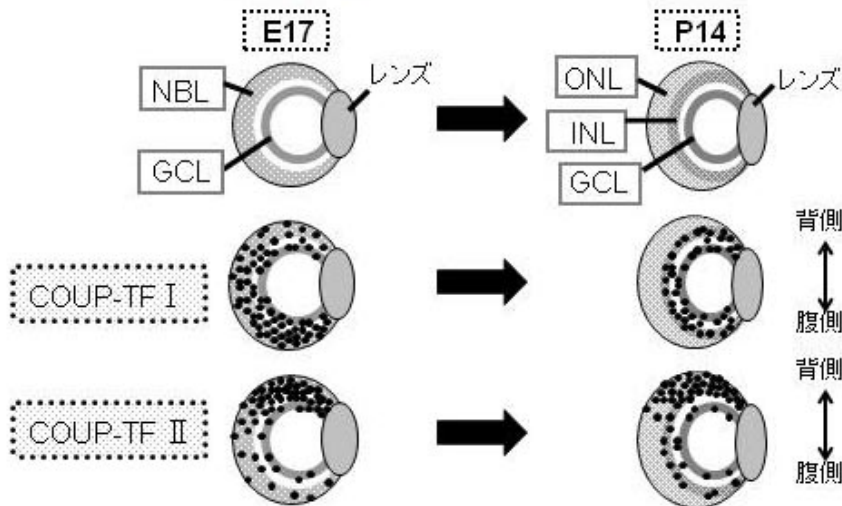
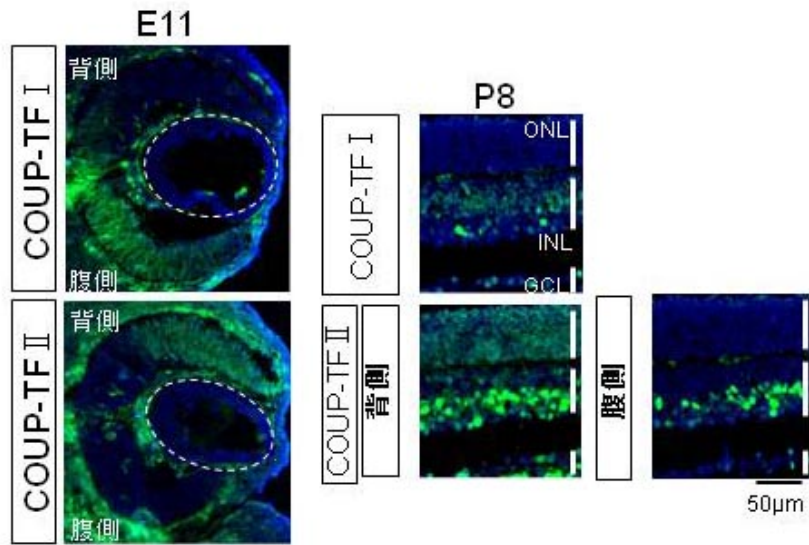
マウス網膜におけるCOUP-TF Iの発現は、胎生期には網膜全体に広く認められたが腹側に強い傾向を示し、出生後には内顆粒層と神経節細胞層への集積を認めた。COUP-TF IIは胎生期から成体まで背側網膜で広く発現、腹側では内顆粒層と神経節細胞層の一部の細胞でのみ強く発現していた。細胞特異的なマーカーとの共染色から、COUP-TF I、IIともに、腹側、背側に関わらず、アマクリン細胞での強い発現を認めた。

網膜体外器官培養系にCOUP-TF I、IIをそれぞれ強制発現させたところ、アマクリン細胞と錐体の増加、双極細胞とミュラーグリア、桿体の減少を認めた。特に、COUP-TF IIの強制発現では、増加した錐体の大部分がMオプシン陽性であった。網膜各層ごとの細胞分布や、細胞増殖、細胞死には影響を認めず、COUP-TFsの強制発現は、内顆粒層細胞をアマクリン細胞に、外顆粒層細胞を錐体に、運命転換したことが示唆された。その機序として、他の細胞への分化に必須な遺伝子をCOUP-TFsが

抑制した可能性を考えた。

アマクリン細胞の増加に関しては、アマクリン細胞以外の細胞の発生に必須であることが示されているPax6に着目し、COUP-TFsがその機能を抑制してアマクリン以外の内顆粒層細胞への分化を妨げたとの仮説をたてた。COUP-TF IもしくはIIとともにPax6を強制発現させたところ、アマクリン細胞はコントロールよりも増加傾向にあったが、その増加はCOUP-TFs単独の強制発現よりも有意に小さかった。さらに、Pax6単独強制発現、COUP-TFsとPax6の共発現のいずれの場合にも、ウイルス感染細胞の、内顆粒層で増加、外顆粒層で減少を認めしたが、COUP-TFsとPax6の共発現による変化は、Pax6単独での変化より有意に小さかった。以上より、COUP-TFsがPax6に対して抑制的に作用したと考えられた。

桿体から錐体への運命転換に関しては、桿体特異的に発現する既知の遺伝子のなかで、もっとも上流に位置するNrlに着目した。Y79 retinoblastoma細胞は内因性のNrlを発現しているが、この細胞にCOUP-TFsを強制発現すると、NrlのmRNA発現低下を認め、網膜体外器官培養系でのCOUP-TFs強制発現の結果を支持する結果となった。さらに、Nrl遺伝子のプロモーター上流領域1.2Kbを用いたレポーターアッセイでは、COUP-TFsによるNrl遺伝子プロモーターの活性抑制が認められ、この領域を介した転写制御が示された。



<発生期マウス網膜におけるCOUP-TF I, IIの時間的空間的発現パターン>

NBL, neuroblastic layer; GCL, ganglion cell layer (神経節細胞層); INL, inner nuclear layer (内顆粒層); ONL, outer nuclear layer (外顆粒層)

<考察>

表面抗原であるCD73が桿体の分化過程早期から発現することを見出し、これにより桿体前駆細胞を単離、濃縮できることを初めて示した。分化途上にある視細胞が単離可能となれば、その分化メカニズムの研究のみならず移植にも有用であると考え。特

に、近年、視細胞への分化過程にある前駆細胞を移植すると、その後の生着が良好であるとの報告があり、移植による視細胞再生に応用可能な発見であると考え。さらに、CD73の触媒産物であるアデノシンに関する発見は、アデノシンを用いてex vivoでの視細胞分化の効率やスピードの向上を促進できる可能性が示唆された。

COUP-TFsについては、発生期網膜においてユニークで特徴的な発現パターンを呈することを示し、COUP-TFsが錐体とアマクリン細胞の分化に関与することを示した。その機序としては、COUP-TFsによる、Nrlの発現とPax6の機能に対する抑制的作用を介していることが示唆された。また、COUP-TF IIはMオプシンの発現にも関与している可能性が考えられる。今後、錐体発生に関与する既報の他の分子との関連を解析していくことで、錐体の分化メカニズムのさらなる解明に貢献するものとする。

<最後に>

本研究では2種類の視細胞に関して、今後のさらなる網膜発生制御メカニズムの解明と、視細胞移植に繋がる新しい知見を得ることが出来たと考える。