

審査の結果の要旨

氏名 井上 真理子

本研究は、網膜再生への応用を最終目標として、視覚機能において重要な役割を果たしている網膜視細胞の発生制御メカニズムを解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. フローサイトメトリーを用いて、発生期マウス網膜細胞に発現する表面抗原をスクリーニング的に解析し、CD73 の発現開始時期や発現細胞数の変化が、桿体の発生に類似することを見出した。成熟した桿体に含まれる感光色素であるロドプシンは、生後 1 日目の CD73 陽性細胞では発現していないが、9 日目では大多数で発現を認めた。マウス眼球凍結切片の免疫染色では、CD73 が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タイムコースで桿体へと分化を遂げた。以上より、CD73 が、桿体において分化過程の早期から発現していることが示された。

2. 桿体の lineage における CD73 の発現時期の検討のため、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し、桿体分化に関与する転写因子の mRNA 発現を比較した。網膜前駆細胞や早期の視細胞に発現する分子は CD73 陰性細胞に強く発現していたが、Crx は CD73 陽性、陰性の両方にほぼ同等に発現し、より後期の桿体に発現する Nrl とロドプシンは CD73 陽性細胞でのみ発現が見られた。さらに、これらの分子の発現の時間的推移を検討したところ、CD73 の発現開始は Crx よりも後期で、Nrl よりも早期であった。以上より、桿体の lineage において、CD73 は Crx と Nrl の間に位置することが示された。また、マウス未分化網膜の体外器官培養系にレトロウイルスを用いて、Nrl、Crx をそれぞれ強制発現させたところ、Crx の強制発現でのみ CD73 陽性細胞の増加を認め、CD73 が Crx の下流にあることが示された。

3. 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働きを持つことから、発生期網膜細胞におけるアデノシン受容体遺伝子発現を検討した。A1、A2a、

A2b の 3 種類のアデノシン受容体が、特に出生後早期に CD73 陽性細胞に発現することを示した。胎生期マウス網膜体外培養系を用いて、CD73 を強制発現、もしくは Knock-down したが、層構造や各種細胞の数に変化は認めなかった。そこで、その触媒産物であるアデノシンを添加して網膜を体外培養したところ、1 週間前後で有意なロドプシン陽性細胞の増加を認めた。しかしながら、さらに培養を継続すると差は認められなくなった。さらに、アデノシン A1 受容体のアゴニストである 2-chloro-N6-cyclopentyl adenosine (CCPA) を添加して培養したところ、同様の現象を認めた。以上より、アデノシンは、A1 受容体を介して、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することが示唆された。

4. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors (COUP-TFs)の時間的空間的発現パターンを、マウス眼球凍結切片の免疫染色にて詳細に解析した。COUP-TF I は胎生期には網膜全体に広く発現する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。それぞれの網膜細胞に特異的なマーカーとの共染色を行い、COUP-TF I、II とともに、腹側、背側にかかわらず、アマクリン細胞での強い発現が示され、特に腹側の COUP-TF II は、glycinergic アマクリンで発現することを示した。

5. マウス網膜体外器官培養法にレトロウイルスを用いて COUP-TF I、II をそれぞれ強制発現させ、免疫染色とフローサイトメトリーにて、ウイルス感染細胞でのアマクリン細胞と錐体の増加と、双極細胞とミュラーグリア、桿体の減少を示した。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、運命転換したと考えられた。とくに、COUP-TF II の強制発現で増加した錐体の大多数が M オプシンを発現していた。

6. COUP-TF I もしくは II とともに Pax6 を強制発現させたところ、アマクリン細胞の数は、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。また、このウイルス感染細胞は、内顆粒層で増加、外顆粒層で減少していた。Pax6単独の強制発現でも同様の細胞分布の変化が報告されているが、COUP-TFsとPax6の共発現における変化は、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の機能を抑制する可能性が示唆された。

7. 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を強制発現したところ、mRNAレベルでのNrl発現低下を認め、網膜体外培養系でのCOUP-TFsの強制発現結果を支持する結果が得られた。また、Y79細胞にマウス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によってNrl遺伝子プロモーターの活性が抑制されることを示した。

以上より、表面抗原であるCD73が分化過程早期から桿体に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。分化途上にある桿体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、移植による視細胞再生にも応用可能であると考えられる。また、発生期網膜におけるCOUP-TFsの特徴的な発現パターンを解析し、COUP-TFsが錐体とアマクリン細胞の分化に促進的に働くことを示した。さらに、その機序として、Nrlの発現とPax6の機能に対するCOUP-TFsの抑制的作用を示唆する結果も得ており、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考えられる。