

論文の内容の要旨

論文題目 Sall3 Regulates Terminal Differentiation of the Horizontal Cells in the Mouse Retina

和訳 Sall3 はマウス網膜水平細胞の最終分化を制御する

指導教員 渡邊 すみ子 教授

東京大学大学院医学研究科

平成18年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

馬場 行広

水平細胞は網膜の介在ニューロン的一种であり、視細胞と双極細胞とのシグナル伝達に対して抑制的に機能している。水平細胞は、水平細胞への運命決定、細胞局在、および神経突起の伸展といった分化過程を経て、視細胞や双極細胞とシナプスを形成する。しかし、その分化過程の制御機構はほとんど明らかになっていない。近年、転写因子に注目した水平細胞分化の研究が行われ、水平細胞への運命決定機構についていくつかの知見が集まっている。転写因子 Prox1 は水平細胞の運命決定に必要な分子であることが、ノックアウトマウスモデルを用いた解析によって明らかになっている。従って、水平細胞分化メカニズムの解析するうえで、転写因子に注目することは有用な手法である。しかし、近年の研究によって水平細胞への運命決定については明らかにされつつあるが、分化後期における水平細胞分化の制御機構についてはまだ明らかになっていない。

これまでに、転写因子 Sall3 が発生期のマウス網膜で発現していることが示されていたが、どの種類の網膜細胞が発現しているかは特定されておらず、その生物学的意義もまだ明らかにされていなかった。私は、その Sall3 の発現パターンから、分化途中の水平細胞が Sall3 を発現している可能性を見出したため、水平細胞分化における Sall3 の機能を解明することを目指して解析を行ってきた。

はじめに、Sall3^{lacZ/+} マウスを用いて、網膜発生期での Sall3 の発現パターンを解析した。β-ガラクトシダーゼと、水平細胞マーカーであるニューロフィラメント 160 (NF160) による免疫組織化学染色を行ったところ、胎生 15.5 日から生後 8 日にかけて lacZ 陽性細胞は NF160 を発現していることが観察されたため、網膜分化過程において Sall3 は水平細胞で発現していることが確認された (図. 1)。また、胎生 15.5 日から生後 8 日までの期間は、運命決定された

水平細胞が成熟する時期であることから、Sa113 は水平細胞の分化に関与することが示唆された。

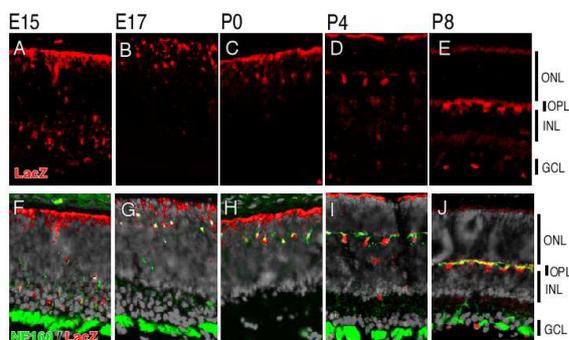


図. 1

胎生期でのSa113の役割を明らかにするために、Sa113^{-/-}マウス網膜で水平細胞マーカーであるcalbindinとNF160の免疫組織化学染色を行った。Sa113^{-/-}マウスとコントロールマウスの胎生17.5日および生後0日の網膜において、NF160とcalbindin陽性の水平細胞が生み出されていること、および水平細胞が予定水平細胞層に局在していることが確認された (図. 2)。一方、Sa113^{-/-}マウスの水平細胞はコントロールの水平細胞よりもNF160とcalbindinの発現が低下していた。これらの結果から、Sa113は水平細胞の運命決定、細胞局在、およびNF160とcalbindinの発現開始には関与しないことが明らかになり、Sa113はNF160とcalbindinの発現レベルの制御に関与していることが示唆された。

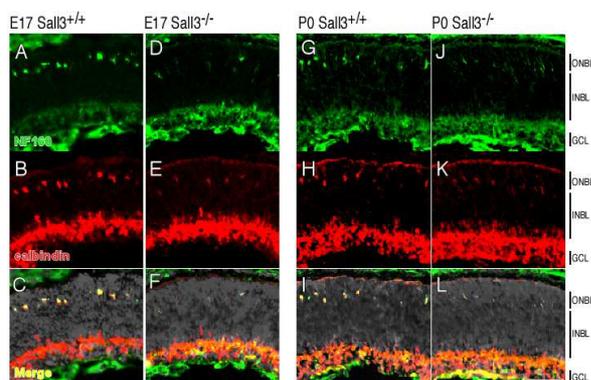


図. 2

Sa113^{-/-}マウスは生後0.5日で死んでしまうために、これまでの研究では後期発生におけるSa113の機能解析が行われていなかった。私はこの問題に対して、網膜体外培養システムを用いることにより、これまで不可能であった後期発生におけるSa113の機能を解析することに初めて成功した。生後0日のSa113^{-/-}マウスの網膜で体外培養を行い、水平細胞の最終分化についてさらに解析を進めた。培養6日において、コントロール水平細胞がNF160とcalbindin陽性の神経突起を伸展している様子が観察された (図. 3)。Sa113^{-/-}マウスの水平細胞では

、NF160の著しい発現抑制が見られた。さらに、コントロール水平細胞では calbindin陽性の水平方向への神経突起形成が見られるのに対して、*Sall3*^{-/-}マウスの水平細胞では神経突起形成が見られなかった。この結果から、*Sall3*は後期網膜発生における水平細胞の神経突起形成に必要であることが示唆された。

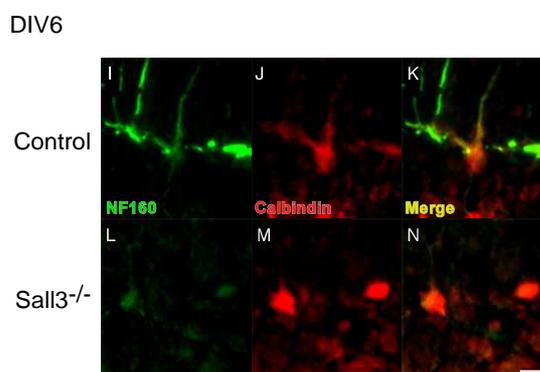


図. 3

さらに、*Sall3*^{-/-}マウスとコントロールマウスの網膜における水平細胞マーカーの発現をmRNAレベルで比較するために、RT-PCRを用いて解析した。胎生17.5日では*Sall3*^{-/-}マウスとコントロールマウスの網膜で水平細胞マーカーであるNefm、Nefl、Lim1、およびCX57の発現レベルに違いは見られなかった (図. 4)。一方、発生後期の培養3日目 (DIV3)、培養6日目 (DIV6) において、*Sall3*^{-/-}マウス網膜の水平細胞マーカーの発現がコントロールと比較して低下していた。これらの結果から、*Sall3*^{-/-}マウスでは水平細胞の最終分化に異常がおきていることが、mRNAレベルでの解析からも明らかとなった。

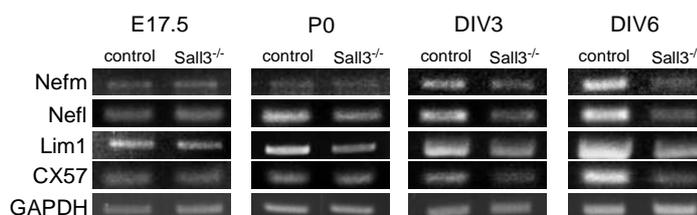


図. 4

ノックアウトマウスの解析結果から*Sall3*はNF160の発現制御や神経突起形成に関与していることが示唆されたため、レトロウイルスを用いた遺伝子過剰発現実験によって*Sall3*の機能解析をさらに検討した。*Sall3*あるいは*Sall3v* (バリエーションフォーム) をpMX-IRES-EGFP に組み込み、PLAT-Eを用いてウイルスを作成した。胎生17.5日のマウス網膜にレトロウイルスを感染させて、3日間培養した後に、網膜を単一細胞にした状態でさらに11日間単層培養を行った。組織免疫染色を行った結果、*Sall3*と*Sall3v*においてNF160陽性細胞の割合がコントロールと比較して有意に上昇することが認められた (図. 5)。この結果によって、*Sall3*がNF160の発現制御に関与していることが強く示唆された。

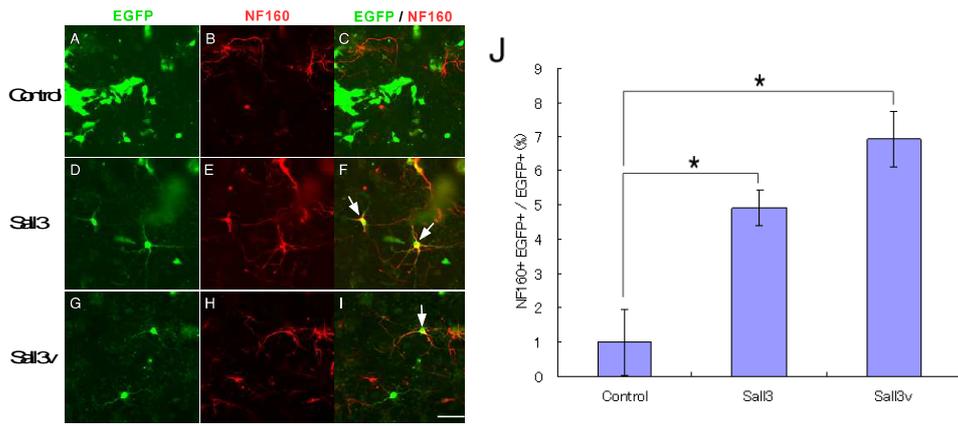


図. 5

これまでに網膜発生後期における水平細胞の分化制御機構については未解明であったが、当研究によってSal13がNF160の発現制御に関わること、およびSal13が水平細胞の最終分化を制御する因子として重要な機能を持つ分子であることが明らかになった (図. 6)。

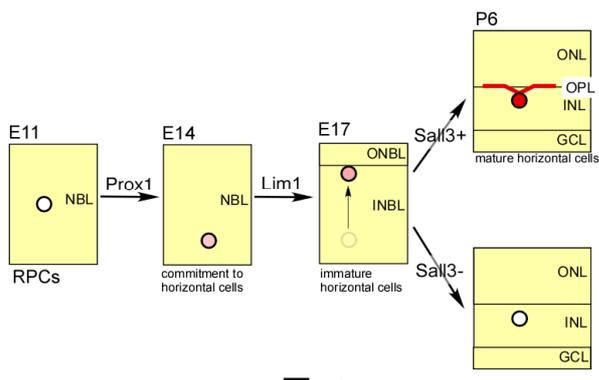


図. 6