

氏名	く ぼ ふみ 久 保 郁
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学位記番号	生 博 第 117 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	生 命 科 学 研 究 科 高 次 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Wnt2b による網膜幹細胞の維持機構

論文調査委員 (主査) 教授 竹市雅俊 教授 西田栄介 教授 米原 伸

### 論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物の網膜の最もレンズに近い領域には CiliaryMarginalZone (以下 CMZ) と呼ばれる領域があり、そこには未分化で増殖能を持った網膜幹細胞が存在している。CMZ に存在する網膜幹細胞の性質は、どのような分子機構によって維持されているのかを調べるために、様々な発現現象の制御に参与することが知られている Wnt シグナル伝達経路に注目し、その機能解析を行った。

ニワトリ網膜に Wnt2b の過剰発現を行うと、本来分化するはずの網膜神経節細胞の分化が著しく阻害されていた。逆に、Wnt シグナルの機能を、LEF1 ドミナントネガティブ分子で阻害すると、本来未分化な状態に保たれている網膜マージン領域において、異所的に神経細胞が出現するのが観察された。以上の結果から、Wnt2b は、網膜幹細胞の未分化状態を維持するのに、必要十分な働きを持つことが分かった。さらに、網膜細胞の培養を用いた実験から、Wnt2b は CMZ に存在する網膜細胞の分裂能を長期間持続させる効果を持つことが分かった。以上の結果から、Wnt2b は網膜幹細胞を維持するシグナルとして働くことが強く示唆された。

Wnt2b は網膜細胞の分化を抑制し、未分化な分化状態に保つことが明らかになったので、次に Wnt2b はその下流でどのようなシグナル経路を動かすことで、分化抑制を行っているのかについて検討した。Wnt2b は、分化抑制に関わるシグナルとして良く知られている Delta-Notch シグナルとは異なるの細胞の分化状態を誘導していたことから、Delta-Notch シグナルとは別の独立したシグナル経路を活性化することで、分化を抑制していることが示唆された。また、Wnt2b を過剰発現させた網膜では数々のプロニューラル遺伝子の発現が抑えられていた。したがって、Wnt2b による分化抑制は、これらプロニューラル遺伝子が働くなることで、実現しているのではないかと結論づけられた。

Wnt2b によって引き起こされる細胞内現象を分子レベルで理解するために、Wnt2b の下流で働く遺伝子の探索を行った。私は、Wnt シグナルが活性化されていると予想される網膜細胞で特異的に発現する遺伝子の探索を行った。その結果、7 つの独立のクローンを、幹細胞が存在する領域 CMZ で発現する遺伝子として、同定することができた。これら候補クローンのうちのひとつ、Atonal 遺伝子ファミリーに属する Cath6 は、機能解析の結果、神経細胞を抑制する機能を持っていることが分かった。

さらに、Hes ファミリーに属する遺伝子、c-hairy1 は、網膜 CMZ で発現することが報告されたので、c-hairy1 が網膜幹細胞の維持に関わっているのか、もしそうならば c-hairy1 は Wnt2b によって制御されている可能性があるのか、について検討した。c-hairy1 は、Wnt2b と同様、分化を抑制し、また網膜細胞の増殖を長期間持続させる効果を持っていた。重要なことに、c-hairy1 は、Cath6 を含む上記のスクリーニングで得られた幹細胞特異的遺伝子の発現を誘導していた。さらに、網膜において Wnt シグナルを活性化させると、c-hairy1 の発現が誘導された。以上の結果から、c-hairy1 は Wnt シグナルの下流で働く主要な因子なのではないかと推測された。

以上の結果を総合すると、Wnt2b による網膜幹細胞の未分化状態の維持においては、その下流で、c-hairy1 が主要な役

割を担っており、c-hairy1 が Cath6 を活性化したり、プロニューラル遺伝子の発現を抑制したりする実行役となることで、神経分化を抑制しているという分子機構が働いている可能性が示唆される。

## 論文審査の結果の要旨

網膜の幹細胞は、網膜 CMZ (CiliaryMarginalZone) に限局して存在することが知られている。これまで網膜幹細胞の性質に関しては、記述的な知見が得られていた一方、どのようにしてこれら幹細胞が生体内で維持されているのか、という分子機構についての研究は進んでいなかった。

本論文では、まず申請者は、シグナル分子 Wnt2b が生体内網膜 CMZ に隣接した領域で発現していることに注目し、その機能解析を行った。Wnt2b は網膜細胞の神経分化を抑制し、未分化な細胞分化状態に維持することが示された。また、Wnt2b の存在下では、網膜細胞が長期間に渡って細胞増殖を持続されることを明らかにした。これは、網膜幹細胞の性質の維持に関わる分子をはじめ特定したものである。

さらに、申請者は Wnt シグナル経路の下流で、神経細胞への分化を抑制するシグナル伝達経路についてさらに詳しく調べるために、これまでに神経分化を制御することの知られている分子群である、プロニューラル遺伝子、および Delta/Notch シグナルに関わる分子と Wnt シグナルとの関連を検討した。その結果、Wnt シグナルの下流では、Notch1 の発現、および複数のプロニューラル遺伝子の発現が抑制されていた。したがって、Wnt シグナルの活性化に応じて神経分化抑制を行うためには、Delta/Notch シグナルは介さずに、プロニューラル遺伝子の発現を抑制する、という機構が働いていることを見出した。

また、申請者は、Wnt シグナルの下流で網膜幹細胞の維持に関わる遺伝子のスクリーニング・同定を試み、いくつかの幹細胞特異的な発現を示す遺伝子の同定に成功した。それらは、幹細胞のマーカーとして用いることができるだけでなく、Cath6 という遺伝子は、実際に、Wnt シグナルの下流で、神経分化抑制を実行するのに貢献する可能性が示唆された。

さらに、Wnt シグナルの下流で働く分子として c-hairy1 に注目した解析から、網膜幹細胞においては、c-hairy1 が Wnt シグナルの下流で働き、幹細胞の維持に関わることが示された。この結果は、Wnt シグナルは、c-hairy1 をエフェクターとして用いることによって、幹細胞の維持を行うということだけでなく、c-hairy1 が Wnt シグナルの下流で働くこと可能性をはじめ提示した。

以上の結果は、Wnt2b が網膜幹細胞を維持する働きを持つことをはじめ明らかにし、さらに、Wnt シグナル下流で c-hairy1 が主要な役割を担っていることを示したものであり、網膜幹細胞を維持する分子機構の解明において、大きな貢献をなすものである。

よって本論文は、博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成19年1月22日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。