

氏名	あかぎただみち 赤木忠道
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2818号
学位授与の日付	平成17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	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Requirement of Multiple bHLH Genes for Retinal Neuronal Subtype Specification (網膜神経のサブタイプ決定には多くの塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス型遺伝子が必要)
論文調査委員	(主査) 教授 鍋島陽一 教授 中西重忠 教授 松田文彦

論文内容の要旨

網膜の分化過程において6種類の神経細胞(神経節細胞, アマクリン細胞, 双極細胞, 水平細胞, 視細胞(杆体, 錐体))と1種類のグリア細胞が網膜前駆細胞から分化するが, 各網膜細胞の分化過程は多くの塩基性・ヘリックス・ループ・ヘリックス(bHLH)型遺伝子によって制御されている。今までの研究から双極細胞の分化には *Mash1, Math3* が, アマクリン細胞の分化には *Math3, NeuroD* が, 神経節細胞の分化には *Math5* が必要であることが分かっている。しかしながら各網膜細胞種の決定, 特に水平細胞や視細胞の分化を決める厳密な機構はまだ不明な点が多い。我々は3種類の異なるbHLH型遺伝子トリプルノックアウトマウス(TKO)の網膜を検討し, 各網膜細胞の分化へのbHLH型遺伝子の働きについて検討した。

Ngn2-Math3-NeuroD TKO 網膜において, 内顆粒層の細胞が激減し, 双極細胞のような他の神経細胞と同様に水平細胞が著しく減少した。網膜全体の細胞数も減少していたがアポトーシスの亢進は主に視細胞領域で認められた。

Mash1-Ngn2-Math3 TKO 網膜において, 水平細胞などの神経細胞が減少した一方で神経節細胞が増加した。

水平細胞の分化は *Ngn2-Math3-NeuroD* TKO 網膜と *Mash1-Ngn2-Math3* TKO 網膜で減少していたが, *Mash1-Math3-NeuroD* TKO 網膜では正常であったことから水平細胞の分化には *Ngn2* が最も重要な役割を担っていることが示唆された。しかし, どの組み合わせのダブルノックアウト網膜でも水平細胞は正常と変わりなく分化することから, *Ngn2* は必要不可欠ではなく, *Mash1, Ngn2, Math3, NeuroD* のすべてが水平細胞分化に関与していると考えられた。

Mash1-Math3-NeuroD TKO 網膜において, 分化した視細胞が正常の1/3に減少した一方で神経節細胞が増加した。この網膜ではアポトーシスの亢進が認められたが, *NeuroD* シングルノックアウト網膜のそれと比べて差を認めなかった。*NeuroD* は視細胞の生存に最も重要な役割を果たしていると考えられた。一方, *Mash1-Math3-NeuroD* TKO 網膜の視細胞減少は *NeuroD* 単独ノックアウト網膜の視細胞減少より明らかに著しく, *NeuroD* 単独の影響では説明できないため *Mash1, Math3, NeuroD* が協調的に視細胞の分化を制御していることが考えられた。*Mash1-Math3-NeuroD* TKO 網膜ではアマクリン細胞の分化は正常か増加傾向にあった。

上記3種類のいずれのTKO網膜においてもグリア細胞が増加していた。

In situ hybridizationの結果から *Mash1, Ngn2, Math3* はそれぞれお互いに拮抗的に制御しあっていることが判明した。一方 *NeuroD* ノックアウトマウス網膜では *Mash1, Ngn2, Math3* それぞれの発現に影響を認めなかったことから, 網膜において *NeuroD* は *Mash1, Ngn2, Math3* と独立的に制御されている可能性が示唆された。

Math5 の発現は *Mash1-Ngn2-Math3* TKO 網膜と *Mash1-Math3-NeuroD* TKO 網膜では増加し, 結果として神経節細胞の発生が促進されていたが, *Ngn2-Math3-NeuroD* TKO 網膜では *Math5* の発現は抑制され神経節細胞の発生は減少していた。したがって, *Math5* の発現は *Mash1, Ngn2, Math3, NeuroD* など他のbHLH型遺伝子によって制御されており, 神経節細胞の発生と連動していた。

このような網膜細胞の発生・分化の増減は細胞運命転換と細胞死の結果であり、そこには残された bHLH 遺伝子の発現が部分的に関与していた。また、残された bHLH 遺伝子の発現は他の bHLH 遺伝子発現消失の影響を受けて変化していた。これらの結果から発生過程の網膜において多くの bHLH 遺伝子はお互いに制御し合い、網膜神経細胞種の決定に関与し、網膜神経細胞の生存にも重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

網膜の分化過程において各網膜細胞の分化過程には多くの塩基性・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 型遺伝子関与しているが、網膜細胞の運命決定における厳密な機構は不明な点が多い。3 種類の異なる bHLH 型遺伝子トリプルノックアウトマウス (TKO) の網膜を検討し、各網膜細胞の分化への bHLH 型遺伝子の働きについて検討した。

Mash1, Ngn2, Math3 はそれぞれ互いに拮抗的に制御しあっていた。*Math5* の発現は他の bHLH 型遺伝子によって制御されており、神経節細胞の発生と連動していた。

水平細胞の分化は *Ngn2-Math3-NeuroD* TKO 網膜と *Mash1-Ngn2-Math3* TKO 網膜で減少し *Mash1-Math3-NeuroD* TKO 網膜で正常であり、*Ngn2* が最も重要な役割を担っていることが示唆された。しかし、どのダブルノックアウト網膜でも水平細胞は正常数分化し、*Mash1, Ngn2, Math3, NeuroD* のすべてが水平細胞分化に関与していると考えられた。

Mash1-Math3-NeuroD TKO 網膜で視細胞が著明に減少した。この網膜でのアポトーシスは *NeuroD* シングルノックアウト網膜と同等であり、*NeuroD* は視細胞の生存に最も重要な役割を果たしており、*Mash1, Math3, NeuroD* が協調的に視細胞の分化を制御していると考えられた。*Ngn2-Math3-NeuroD* TKO 網膜では視細胞のアポトーシスの亢進が認められた。

残存する bHLH 遺伝子の発現は他の bHLH 遺伝子発現消失によって変化し、網膜細胞の分化に関与していた。発生過程の網膜で多くの bHLH 遺伝子は互いに制御し合い、網膜神経細胞種の決定において重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上の研究は網膜細胞分化機構の解明に貢献し今後の網膜発生の研究及び網膜の再生医療に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成16年11月24日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。