

Title	Emergence of dorsal-ventral polarity in ES cell-derived retinal tissue( Abstract_要旨 )
Author(s)	Hasegawa, Yuiko
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2017-01-23
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2433/218002">http://hdl.handle.net/2433/218002</a>
Right	許諾条件により本文は2017-11-01に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士 (医学)	氏名	長谷川 結子
論文題目	Emergence of dorsal-ventral polarity in ES cell-derived retinal tissue (ES細胞由来網膜組織における背腹軸の出現)		
(論文内容の要旨)			
<p>脊椎動物において網膜は間脳上皮に由来し、眼胞の遠位が陥入して二重の上皮構造(眼杯)となり、内側より神経網膜が、外側より網膜色素上皮(RPE)が発生する。この一連の形態形成は非軸対象の過程を含み、背腹軸特異的な遺伝子発現を伴う。背腹軸の不完全な形成はコロボーマや視神経の投射の異常、視細胞のサブタイプの分布異常などを招く。ES細胞から無血清浮遊凝集塊培養法で分化誘導された網膜組織は、表皮外胚葉組織や間葉系組織などを欠いた状態で自律的に眼杯構造をとり、長期培養では成熟した網膜構造を形成する。本研究では <i>in vitro</i> 実験系の易操作性を利用し、眼の発生における自己組織的な背腹軸形成のメカニズムを解明することを目的とした。</p> <p>まず背腹軸を制御する重要な転写因子である <i>Tbx5</i> (背) と <i>Vax2</i> (腹) に対して抗体を作成し、ES細胞由来網膜組織における発現を調べたところ、<i>in vivo</i> 同様に相互に排他的であった。また、<i>in vivo</i> における形態的な背腹軸とは、眼杯形成中に腹側に一時的に形成される眼裂に特徴付けられるが、その詳細は不明であった。今回、インキュベーター一体型多光子顕微鏡による経時的な観察からES細胞由来眼杯構造に、<i>in vivo</i> 類似の間隙が自発的に形成されることが示された。眼裂様構造は <i>Tbx5</i> 陰性の領域(非背側)に存在する傾向があった。</p> <p>さらに眼胞形成期に一致するES由来神経網膜を用い、BMPのアゴニスト、アンタゴニストを加えてRT-qPCRを行ったところ、前者で <i>Tbx2/3/5</i> の増加と <i>Vax2</i> の減少を認め、後者で <i>Tbx2/3/5</i> の減少と <i>Vax2</i> の増加を認めた。免疫染色法でもBMPシグナルの増減によって、<i>Tbx5</i> の発現と phospho-Smad1/5/8 (pSmad) の発現が qPCR の結果と一致して増減することから、BMPシグナルが <i>Tbx5</i> を介して背側化を支配していることが示唆された。</p> <p>次にWntシグナルを可視化するESラインを樹立し、Wntシグナルの背腹軸への関与を調べた。ライブイメージングによりES由来眼胞(d6.5)においてWntシグナルはRx+半球構造の片側の近位に限局して出現し始め、同側の網膜の陥入が対側に先行することが示された。また、ES由来眼胞の内因性Wntの抑制は <i>Tbx5/BMP4</i> の発現を著明に減少させるが、BMP4を同時に添加すると回復することから、Wntシグナルが <i>BMP/Tbx5</i> を介して背側を誘導することが示唆された。眼胞期(d6-d8)にWntシグナルを抑制すると、成熟した網膜(d43)では相対的なS-opsinの増加を認め、腹側の特性を維持していると考えられた。免疫染色ではd6ES由来眼胞にRxと <i>Vax2</i> が広く発現しており、d6.5には眼胞の半球の近位部にWnt活性が限定的に認められるとともに、その隣接部に <i>Tbx5</i> の発現が限局し、対側に <i>Vax2</i> が限局するパターンを認めた。そこでグラスキャピラリーを用いて局所でES由来神経網膜にWnt活性を誘導したところ、<i>Tbx5</i> の発現はWnt活性化領域の隣に限局していた。一方、BMPの局所的な誘導は、活性化部位にはほぼ一致して pSmad/<i>Tbx5</i> の発現を認めた。これらより、ES由</p>			

来網膜組織において、背側化に対してWnt及びBMPシグナルの協調的な役割が推察され、また、Wntシグナルのダイナミクスが経時的・空間的に形態及び遺伝子発現における極性をもたらしていることが示唆された。本実験系では *in vivo* と類似の背腹軸を自立的に再現することができたが、同時に形態及び遺伝子発現における多様性も認めた。内在的なメカニズムに加え、*in vivo* では眼周辺組織を介した外的因子の影響などが頑健な眼の発生を可能にしていることが推察された。

(論文審査の結果の要旨)

発生過程の網膜は、背腹軸に沿った特異的な遺伝子発現及び形態を伴う。不完全な背腹極性はコロボーマや視神経の投射異常、視細胞サブタイプの分布異常を招く。これまでES細胞由来網膜組織は自律的に眼杯構造をとることが報告されている。今回、申請者はマウスES細胞を用いて内在的な背腹極性の形成機構に注目して研究を行なった。ES細胞由来網膜にてにおいても *Tbx5* (背) と *Vax2* (腹) は *in vivo* 同様に相互排他的に局在し、形態的にも腹側に特徴的な眼裂様構造の形成を認めた。さらにBMP阻害剤により背側化が阻害され、BMPシグナルが *Tbx5* を介して背側化を直接支配していることが示唆された。一方、Wnt阻害剤によっても背側化が阻害され、BMPとWntの2つのシグナル経路が網膜の背腹軸形成に重要であることが示唆された。両者の関係を調べるために canonical Wntシグナル動態を可視化し、局所的に各シグナルを活性化できる実験系を構築した。その結果、初期ES細胞由来眼胞にて canonical Wntシグナルが局所的に活性化され、その隣接部位にBMPシグナルの下流にある *Tbx5* の発現を誘導することが初めて示された。これらの結果により、Wnt及びBMPシグナルが時間・空間的に協調し網膜の背腹極性を形成していることが明らかになった。*in vivo* ではこのような網膜神経上皮内在的な機構に加え、外的要因が協調することで、より頑健な背腹極性形成を実現していると考えられる。

以上の研究は網膜組織の背腹極性形成機構の解明に貢献し、内在的な極性形成機構や背腹極性の破綻に伴うヒト疾患の病態理解の発展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28年11月29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。

