

|             |                                                                                                                                                                  |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | みや 脇 たか や<br>宮 脇 貴 也                                                                                                                                             |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                        |
| 学 位 記 番 号   | 医 博 第 2791 号                                                                                                                                                     |
| 学位授与の日付     | 平 成 16 年 11 月 24 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      | Tlx, an Orphan Nuclear Receptor, Regulates Cell Numbers and Astrocyte Development in the Developing Retina<br>(オーファン核内受容体 Tlx は発達網膜において、網膜の細胞数とアストロサイトの発達を制御する。) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 大 森 治 紀    教 授 河 野 憲 二    教 授 影 山 龍 一 郎                                                                                                             |

### 論 文 内 容 の 要 旨

神経網膜の構築において、各種の神経細胞およびミューラー細胞は神経芽細胞層に存在する網膜前駆細胞から発生、分化し、網膜神経節細胞層、網膜内顆粒層、網膜外顆粒層の3つの主要な層を形成する。それに加えて、視神経由来のアストロサイトが、網膜最表層に拡がり、血管構造を伴うことにより網膜の構築が完成されていく。網膜の発生過程において細胞分化に関する様々な分子の研究がなされているが、網膜の各層の細胞数の制御については未だ不明な点が多い。また、網膜における主要な2つのグリア細胞、すなわち、アストロサイトとミューラー細胞の発達がいかんして制御されているかについても詳細に解明されていない。

核内受容体は多様な組織で発達、生理的環境の維持などに重要な役割をはたし、網膜においても種々の核内受容体の存在が確認されている。核内受容体のひとつである Tlx は中枢神経系の発達に重要な役割を担っており、その mutant mouse では嗅脳と辺縁系の発達不全を認めることが報告されている。網膜においては視神経萎縮、網膜変性、血管形成不全などが報告されているが、その機序は不明である。そこで今回我々は Tlx の発現部位、Tlx ノックアウトマウスの網膜変性パターンを解析することにより、Tlx の網膜発達における役割について検討した。

まず Tlx の遺伝子座に導入された lacZ 遺伝子をマーカーとして、蛍光二重染色でその発現細胞を調べた。また、*in situ hybridization* 法でも Tlx の mRNA の局在部位を確認したところ、Tlx は発生初期に網膜前駆細胞、未熟なアストロサイトに発現し、最終的に成熟マウス網膜のミューラー細胞に発現が限局することが明らかとなった。

次に光顕学的な網膜組織の経時的変化により、網膜発達異常のパターンを解析した。Tlx ノックアウトマウスでは網膜神経節細胞層と内顆粒層においては層構造形成期に細胞数の増加を認め、その後の細胞死の亢進により網膜萎縮に陥るのに対し、外顆粒層は層形成時にすでに発達不全を認め、細胞死の増加を認めなかった。網膜の構成細胞は最終的にはすべて減少したが、細胞特異抗体を用いた免疫染色により特異的な細胞型の欠落は認めなかった。層特異的に細胞数の異常を認めたことより、細胞増殖能、細胞周期関連因子の発現について検討したところ、Tlx は胎生網膜において、細胞周期関連分子であるサイクリン D1 と p27<sup>Kip1</sup> を介して各層の適切な細胞数を制御していることが明らかとなった。

更に Tlx が局在する網膜グリアのひとつ、ミューラー細胞の発達について免疫染色および電顕をもちいて検討したところ Tlx ノックアウトマウスではミューラー細胞のマーカーは発現するが構造的に低形成を認めた。Tlx が局在する視神経由来のアストロサイトについても代表的なアストロサイトのマーカーの発現は認めたが、正常網膜に認められる樹枝状のネットワーク構築が認められず、血管発生に不可欠である R カドヘリンの発現欠如とともに、血管形成もほとんど認められなかった。また、神経網膜発達過程と同様に、視神経由来のアストロサイトにおいても Tlx がその増殖能を制御していることが明らかとなった。

以上より、Tlx は網膜神経細胞のみならずグリアの増殖を制御することによって、網膜の発達に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

核内受容体は中枢神経系をはじめとする多様な組織で発達、生理的環境の維持などに重要な役割を果たす。網膜、視神経の発達においても種々の核内受容体が関与していることが示唆されており、その変異に起因するヒトでの網膜変性症も報告されている。核内受容体の一つである Tlx は脳では幹細胞に存在し、Tlx 変異マウスの眼球では網膜変性、視神経萎縮などの表現型が報告されているが、その発症機序をはじめとして、Tlx の網膜発達における役割の詳細は不明である。当研究は Tlx が 1) 胎生期に網膜前駆細胞に発現されると共に、視神経内から遊走してくるアストロサイト前駆細胞にも発現されること 2) 成熟期には網膜幹細胞の可能性が示唆されているミューラー細胞に発現が限局することを明らかにした。また Tlx の欠損が、網膜、およびアストロサイト前駆細胞における細胞周期関連因子 cyclinD1 の発現抑制を介して、1) 網膜内においては細胞の増殖、分化のバランスを変化させ、網膜各層の細胞数の変化をもたらすこと、2) 網膜表面においてはアストロサイトの増殖抑制からアストロサイトおよび血管のネットワーク形成不全をもたらすことを示し、Tlx によるニューロンおよびグリアの数の制御が、網膜発達に重要な役割を果たすことを明らかにした。以上の研究は核内受容体 Tlx の網膜発達における役割の解明に貢献し、網膜発達の理解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のあるものと認める。なお、本学位授与の申請者は、平成16年10月20日実施の論文内容とそれに関した試問を受け、合格と認められたものである。