

氏 名	たか つか けん じ 高 塚 賢 二
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2718 号
学位授与の日付	平 成 16 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 病 理 系 専 攻
学位論文題目	Roles of the bHLH gene Hes1 in retinal morphogenesis (bHLH型転写因子Hes1の網膜形態形成における役割)

論文調査委員 (主 査) 教 授 鍋 島 陽 一 教 授 中 辻 憲 夫 教 授 影 山 龍 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物の神経性網膜は6種類の神経細胞と1種類のグリア細胞から形成される。網膜は、桿体、錐体からなる光受容細胞層、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、ミュラーグリアからなる内顆粒層、視神経細胞が存在する視神経細胞層の3層構造をなしている。網膜の発生においてこれらの7種の細胞は共通の前駆細胞から発生し、さらに生まれる細胞の種類によって、例えば視神経細胞は網膜の発生段階初期に、ミュラーグリアは発生段階後期に発生するというように、時間的な重なりはあるが決められた順番に分化する。このようにどの種類の細胞に分化するのかという網膜前駆細胞の分化能は時間とともに変化するもので、網膜前駆細胞を維持することは適切な種類の細胞を適切な時期に適切な数だけ生み出すために必須である。網膜前駆細胞は神経栄養因子などの外的因子やベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 型転写因子などの内的因子の制御を受けながら増殖・分化することが知られている。

これまでに、bHLH型転写因子Hes1が網膜前駆細胞の維持に重要な役割を果たしていることが示されてきた。マウスにおいてHes1は発生初期には網膜前駆細胞に発現しているが、発生後期にはミュラーグリアに発現し、生後10日前後にその発現は消失する。発生中の網膜にHes1を強制発現させると神経への分化を抑える。これに対してHes1の発現をなくすと網膜前駆細胞は早熟に神経に分化し、十分な数の網膜細胞を生み出すことが出来ないため網膜の大きさは小さくなる。また網膜の層構造は壊れ、ロゼット構造と呼ばれる異常な構造を形成する。これらのことからHes1は前駆細胞の維持と網膜の構造に非常に重要であるといえるが、前駆細胞の早熟な分化と異常なロゼット構造についての関係は未だ明らかにされていなかった。

本研究ではHes1の網膜における分化と形態形成における役割を解明するため、強制発現による機能亢進実験と、ノックアウトマウスを用いた機能喪失実験による解析を行った。正常マウス網膜にHes1発現ウイルスを感染させて感染細胞の運命を調べたところ、Hes1は神経細胞への分化を阻害し、前駆細胞あるいはミュラーグリア様の細胞を生み出した。また、網膜の発生初期ではN-cadherinは前駆細胞に発現し、後期では外境界膜を形成するミュラーグリアに発現することが報告されているが、Hes1ノックアウトマウスの網膜では前駆細胞から視神経細胞への分化が亢進し、外境界膜が壊れていた。分化した視神経細胞は外境界膜の壊れた部分から神経性網膜と網膜色素上皮の間の領域に入り込んでおり、この結果ロゼット構造が形成されると考えられた。またノックアウトマウスの網膜を2週間器官培養し組織免疫染色を行ったところ、ミュラーグリア細胞の数が減少していた。このHes1の欠如による早熟な視神経細胞への分化とその結果としての前駆細胞の損失、さらに外境界膜の破壊によって網膜の異常な構造が引き起こされるものと考えられる。これらのことから、Hes1は未分化細胞の維持を行い、細胞の分化のタイミングを適切にコントロールすることで網膜の形態維持に関与している可能性が強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

脊椎動物の神経性網膜の発生過程では共通の前駆細胞から6種類の神経細胞と1種類のグリア細胞が形成される。前駆細胞の維持は7種類の細胞を適切な時期に適切な数だけ生み出すために必須である。これまでにbHLH型転写因子Hes1は網膜前駆細胞の維持に重要な役割を果たしていることが示されてきた。Hes1を強制発現すると前駆細胞の神経分化を抑え、Hes1が欠損すると前駆細胞は早熟に神経に分化しロゼット構造と呼ばれる異常な層構造を形成する。したがってHes1は前駆細胞の維持と網膜の構造に重要であるといえるが、分化抑制と層構造の異常についての関係は明らかにされていなかった。

本研究ではHes1の網膜における分化と形態形成における役割を解明するため、レトロウイルスによる強制発現と遺伝子改変マウスを用いた解析を行った。Hes1強制発現実験では神経細胞への分化を阻害し、前駆細胞あるいはミューラーグリア様の細胞を生み出した。Hes1欠損マウスでは視神経細胞への分化が亢進し外境界膜が壊れ、またミューラーグリアの数が減少していた。このHes1の欠如による早熟な視神経細胞への分化と前駆細胞の損失、さらに外境界膜の破壊によって網膜の異常な構造が引き起こされたと考えられた。以上の結果からHes1は未分化細胞の維持を行い、分化のタイミングを適切にコントロールすることで網膜の形態維持に関与することが強く示唆された。

以上の研究は、分化抑制因子Hes1による網膜の形態形成制御機構の解明に貢献し、神経発生学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16年2月5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。