

氏 名	はる 春 田 まさ 雅 とし 俊
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2456 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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	Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue (成体哺乳類虹彩組織における視細胞特異的表現型の誘導)
論文調査委員	(主 査) 教 授 笹 井 芳 樹 教 授 西 川 伸 一 教 授 本 田 孔 士

論 文 内 容 の 要 旨

視細胞は網膜内において光を受容するように特殊に分化した中枢神経系のニューロンである。視細胞は様々な疾患により容易に損傷され視機能障害を引き起こすが、現代の医学では成体哺乳類の視細胞を再生させることはできない。今回、網膜と発生学的に関連のある虹彩組織から視細胞を誘導することができるかを成体ラットを用いて検討した。

成体ラットの虹彩組織を酵素処理したのち、塩基性線維芽細胞増殖因子存在下の無血清培地で培養すると、虹彩組織から多くの細胞が遊走して増殖してくる。この虹彩細胞を神経分化誘導条件下に移行させて培養を続けると成熟ニューロンのマーカーであるニューロフィラメント200を発現する細胞が検出された。しかしこの培養条件下では視細胞の特異的蛋白であるロドプシンを発現する細胞は全く得られなかった。

Crx は視細胞の発生と機能維持に重要なホメオボックス遺伝子である。そこで虹彩細胞に Crx を遺伝子導入することにより視細胞を誘導できるかを検討した。培養した虹彩細胞にアデノウィルスベクターを用いて Crx を遺伝子導入し、神経分化誘導の培養条件下で引き続き培養を行った。免疫細胞化学的解析により視細胞特異的蛋白であるロドプシン (10.6%) や視細胞蛋白であるリカバリン (11.8%) を発現する細胞が認められた。同様にして虹彩細胞に EGFP 遺伝子を導入したときには、これらの視細胞蛋白は全く認められなかった。

アデノウィルスによる Crx 遺伝子導入では視細胞蛋白を発現する虹彩細胞は分裂細胞由来であるのか、分裂を完了した分化細胞由来であるのかは不明である。そこで分裂細胞にしか遺伝子導入されないレトロウィルスベクターを用いて Crx の遺伝子導入を試みた。培養した虹彩細胞にレトロウィルスベクターを用いて Crx と EGFP 遺伝子を強制発現させると、EGFP 陽性細胞の96%で視細胞特異的蛋白であるロドプシンの発現が検出された。また遺伝子が導入されなかった EGFP 陰性の虹彩細胞ではロドプシンの発現は得られなかった。これはこの培養条件下ではロドプシン発現に Crx が必要であることを示している。またレトロウィルスは分裂細胞にしか遺伝子導入されないため、Crx 遺伝子導入前に虹彩細胞を増殖させれば、視細胞の移植源として細胞を増幅できる可能性がある。

自己複製能と多分化能を有する成体ラット海馬由来の神経幹細胞を新生児ラット硝子体に移植すると網膜内で生着し、視細胞様の形態をとるが、ロドプシンは発現しないことが報告されている。この海馬由来の神経幹細胞に Crx を遺伝子導入することにより視細胞を誘導できるかを検討した。アデノウィルスベクターを用いて海馬由来神経幹細胞に Crx を遺伝子導入し、神経分化誘導条件下に移行してもロドプシンを発現する細胞は得られなかった。虹彩色素上皮細胞は発生学的に神経網膜と同じ眼杯内層に由来するため、虹彩細胞は Crx に応答して視細胞蛋白を発現できるのかもしれない。

虹彩組織は周辺虹彩切除術により視機能に影響することなく、安全確実に自己組織を採取することができる。そのため、視細胞が損傷された患者の虹彩組織を採取して光受容器として機能する視細胞を誘導できれば、将来拒絶反応のない視細胞の自家移植が可能になるかもしれない。今後の課題としては虹彩から得られた視細胞蛋白を発現する細胞が視細胞としての機能を有しているか、また網膜に移植した場合に宿主細胞とシナプスを作りネットワークの一員として機能するかという点

について説明することである。

論文審査の結果の要旨

網膜色素変性は網膜の視細胞が選択的に変性する疾患であり、現代の失明原因として最も頻度の高い疾患の一つである。成体哺乳類の視細胞はひとたび損傷されると再生させることはできないため、有効な治療法はない。欧米では網膜色素変性の患者に胎児網膜を移植する臨床試験が行われたが、胎児組織を使用することの倫理的な問題や拒絶反応のためうまく行っていない。

本論文はまず網膜と発生学的に関連のある成体ラットの虹彩組織を特殊な条件で培養すると神経細胞の性質を表すことを示した。また視細胞の発生に重要なホメオボックス遺伝子 *Crx* を遺伝子導入すると、虹彩由来の培養細胞が視細胞蛋白であるロドプシンやリカバリンを発現することを示した。

自己の虹彩組織は周辺虹彩切除術によって視機能に影響することなく、安全確実に採取することができる。そのため、自己の虹彩組織を採取し、視細胞に分化誘導させて、視細胞の自家移植を行うことも将来できる可能性がある。この場合、自己の虹彩組織を利用するため同種移植後に生じることのある拒絶反応の発生を回避することができる。

以上の研究は成体哺乳類の虹彩組織の網膜神経細胞への分化転換の解明に貢献し、臨床的にも新しい視細胞移植の治療法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14年1月23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。