京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	村 西 由 紀
論文題目	Gene expression analysis of embryonic photoreceptor precursor cells using BAC-Crx-EGFP transgenic mouse （BAC-Crx-EGFP トランスジェニックマウスを用いた胎児期網膜視細胞に発現する遺伝子の解析について）		

（論文内容の要旨）

網膜は中枢神経系由来の組織で、眼球の後方に位置する薄いシート状の組織である。明確な層構造を形成し、形態学的にもシンプルで各ニューロンならびにグリアは特徴的な形態を有し、明確な区別が可能である。網膜を構成する細胞としては、神経節細胞、アマクリン細胞、双極細胞、水平細胞、網膜視細胞、ミュラーグリア細胞の６種類が存在する。この網膜視細胞は、暗所視に必須な杆体細胞ならびに明所視と色覚に重要な錐体細胞の２つの細胞種から成っている。両者の視細胞に占める割合は、ヒトならびにマウス成体において約97 %が杆体細胞で残り約3% が錐体細胞である。錐体細胞の発生は胎生期に始まり、その後の錐体細胞の発生は杆体細胞の発生と混在するため、マウスにおいて錐体細胞のみの発生動態を追った報告はほとんど知られていない。

Crx（cone-rod homeobox）は、網膜視細胞および松果体に特異的に発現する遺伝子で、杆体細胞と錐体細胞の両方に発現する。マウス Crx は胎生 12.5 日齢から発現し始め、成体においても分化した視細胞に強く発現がみられる。Crx 遺伝子のノックアウトマウスの網膜では、視細胞の外節がまったく形成されず、Crx は網膜視細胞の終末分化に必須であることが知られている。視細胞の発生は、錐体細胞が胎生 15.5 日齢頃にピークとなり、胎生後期より杆体細胞の誕生が始まり出生後にピークをむかえる。

本研究では、BAC(Bacterial artificial chromosome)を用いて、BAC-Crx-EGFP のトランスジェニックマウスを作製し、Crx の発現を EGFP で再現し可視化した。まず、胎生 11.5 日齢では Crx-EGFP 陽性細胞の発現は見られなかったが、胎生 15.5 日齢では網膜の外側に Crx-EGFP 陽性細胞の発現がみられた。また、出生後 3 日齢と 6 日齢では、将来視細胞層となる外顆粒層に強く Crx-EGFP の発現がみられ、出生後 14 日齢から成体の期間においても継続して外顆粒層に Crx-EGFP 陽性細胞が観察された。

免疫染色法を用いて網膜の組織染色を行い、ホスホヒストン H3 抗体および Ki67 抗体(増殖マーカー)、そして、Pax6 抗体および Chx10 抗体（網膜前駆細胞マーカー）を用いて、BAC-Crx-EGFP トランスジェニックマウス網膜を免疫染色したところ、Crx-EGFP 陽性細胞はこれらのマーカーとは重ならなかった。一方、網膜特異的な成熟細胞マーカーによる免疫染色では、網膜視細胞の成熟マーカーであるロドプシン抗体（杆体細胞マーカー）や S-オプシン・M-オプシン抗体（錐体細胞マーカー）と重なることが確認された。

次に、EGFP 陽性細胞の細胞周期を調べるために、フローサイトメトリーを用いて胎生 17.5 日齢の網膜組織中の EGFP 陽性細胞と陰性細胞を比較した。Crx-EGFP 陽性細胞は陰性細胞に比べて細胞周期はほとんどが細胞分裂後間期（G1 期）にあり、Crx が細胞周期を出てから発現することが明らかとなった。

またソーティングにより、ほとんどが錐体細胞の前駆細胞であると考えられる胎生 17.5 日齢の Crx-GFP 陽性細胞を回収した。Crx-EGFP 陽性細胞から RNA を単離し、マイクロアレイ解析によって、錐体細胞に豊富に発現する遺伝子群を同定した。以上、BAC-Crx-GFP トランスジェニックマウスは、胎生期に発現する錐体細胞を可視化し、錐体の形成に関わる可能性のある遺伝子群を同定するための有用なマウスツールである。

（論文審査の結果の要旨

網膜視細胞は、暗所視を司る杆体細胞と、明所視と色覚を司る錐体細胞から成る。錐体細胞は数が少なく主に胎生期に発生することから、その分化機構に関する知見は比較的乏しい。ヒトの視覚は主に錐体細胞が担っており、医学的にも錐体細胞の発生メカニズムの解明は重要である。

本研究は、胎生期の錐体細胞特異的に発現する遺伝子群を同定することを目的とし、遺伝子工学的手法を用いてマウス錐体前駆細胞における遺伝子の解析を行った。本研究では、BAC-Crx-EGFP(Crx-EGFP)トランスジェニックマウスを作製し、視細胞特異的に発現する遺伝子 Crx が発現する細胞を EGFP で可視化した。また、網膜の免疫組織染色において、増殖マーカー・網膜前駆細胞マーカーは Crx-EGFP 陽性細胞と重ならず、網膜視細胞の成熟マーカーであるロドプシン抗体（杆体細胞マーカー）や S-オプシン・M-オプシン抗体（錐体細胞マーカー）と重なることを示した。次に、胎生 17.5 日齢の Crx-EGFP 陽性細胞と陰性細胞の細胞周期は、EGFP 陽性細胞はほとんどが細胞分裂後間期にあり、Crx が細胞周期を出てから発現することを示した。また、錐体前駆細胞が多く存在する胎生 17.5 日齢の Crx-EGFP 陽性細胞を回収し、マイクロアレイ解析によって、錐体前駆細胞に発現する遺伝子群を同定し、錐体細胞の発生研究の基盤を確立した。

以上の研究は、網膜錐体細胞の発生に関わる分子機構の解明に貢献し、ヒトの視覚に重要な錐体細胞発生の解明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。

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 22 年 3 月 2 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。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降