The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina
Author(s)	井上, 智之
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43936
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	井上智之（いのうえ ともゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　17679　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	*Math3* and *NeuroD* regulate amacrine cell fate specification in the retina **（網膜神経分化におけるMath3とNeuroDのアマクリン細胞運命決定の制御）**
論文審査委員	（主査） 教授　田野　保雄 （副査） 教授　不二門　尚　　教授　福田　淳

論文内容の要旨

【目的】哺乳動物の神経系は多様な神経細胞とグリア細胞から構成される。その発生分化の初期の段階では、神経前駆細胞が未分化の状態を維持して分裂を繰り返し、必要な細胞数を確保するステップと神経前駆細胞が適切なタイミングで分裂を終了し、神経細胞あるいはグリア細胞に分化するステップが想定される。中枢神経系に属する唯一の感覚器である網膜は、5種類の神経細胞と1種類のグリア細胞が共通の前駆細胞から発生することが知られているが、その分子メカニズムはよくわかっていない。しかし、最近の研究で、塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス（basic helix-loop-helix ; bHLH）型転写因子が網膜の各細胞への運命決定および分化に重要な役割を果たしていることが示されてきた。今回の研究では、哺乳動物の神経発生分化を正に制御するbHLH型転写因子 *Math3*、*NeuroD* に着目し、網膜神経分化における役割を解析した。

【方法ならびに成績】*Math3* および *NeuroD* の発現パターンを解析すると、発生途中の網膜アマクリン細胞にて発現が一致して認められる。網膜アマクリン細胞は網膜内顆粒層と網膜節細胞層に存在するインターニューロンで、網膜双極細胞と網膜節細胞とシナプスを形成し、そのシナプス連絡を修飾している。これらは形態学的に調べられているが、発生の分子レベルでは研究がなされていない。我々は網膜発生過程のこれらの因子、*Math3*、*NeuroD* の役割を明らかにする目的で、*Math3* と *NeuroD* のダブルノックアウトマウスを作製した。過去の予備実験結果にて、*Math3* 単独もしくは *NeuroD* 単独のノックアウトマウスでは、アマクリン細胞は正常に発生することが示されている。今回、我々は *Math3* と *NeuroD* のダブルノックアウトマウス網膜の細胞タイプを解析すると、アマクリン細胞が完全に欠失し、代償的に網膜神経節細胞とミューラーグリア細胞の細胞数が増加することをつきとめた。ダブルノックアウト網膜において、ノックインしたマーカーのLacZにて、本来アマクリン細胞に分化する予定であった細胞をモニターすると、欠失したアマクリン細胞はアポトーシスをおこしてなくなるのではなく、増加した神経節細胞とミューラーグリア細胞の位置に存在していた。このことは、アマクリン細胞に分化する予定であった前駆細胞は *Math3* と *NeuroD* がはたらかないことで神経節細胞とミューラーグリア細胞に運命転換が生じたことが示唆された。さらに、網膜神経節細胞の神経繊維の集合である視神経を調べたところ、*Math3* と *NeuroD* のダブルノックアウトマウス胎児

の視神経は野生型に比較して直径が増しており、面積は 1.7 倍であった。また、網膜節細胞の発生に不可欠であることが知られている bHLH 因子 *Math5* の発現が、ダブルノックアウトマウス網膜にて増加していた。このことより網膜発生過程における *Math3/NeuroD* と *Math5* の bHLH 因子間のクロスレギュレーションの存在が示唆された。さらに、これら因子がアマクリン細胞への分化を誘導するかを検討するために、レトロウイルスによる強制発現実験を行った。発生途中の網膜に *Math3* もしくは *NeuroD* を強制発現させて前駆細胞がどのように分化するかを観察すると、*Math3* もしくは *NeuroD* 発現ウイルス感染細胞は視細胞にのみ分化し、アマクリン細胞には分化を認めなかった。これより *Math3* もしくは *NeuroD* は単独では前駆細胞からアマクリン細胞への分化決定を行う活性を持たないと考え、bHLH 因子に加えてホメオボックス因子に着目した。最近の報告で、bHLH 因子とホメオボックス因子の組み合わせで細胞の運命決定がおこることが示されており、特に網膜においても、我々のグループは bHLH 因子 *Math3*、*Mash1* とホメオボックス因子 *Chx10* によって網膜双極細胞への分化が決定することを示していた。このことより、bHLH 型転写因子群 *Math3*、*NeuroD* に加えて、成体網膜においてアマクリン細胞に発現が維持されているホメオボックス因子 *Pax6* に着目した。*Pax6* を網膜前駆細胞に強制発現させると、感染細胞がアマクリン細胞を含む網膜内顆粒層まで移動するが、最終分化を遂げていないことが予備実験にて示されている。これらより、bHLH 因子とホメオボックス因子の２種類を同時発現するレトロウイルスベクターを構築し、網膜感染実験をおこなったところ、*Pax6* と *Math3*、*Pax6* と *NeuroD* を同時強制発現させると *Pax6* を共発現したウイルス感染細胞、つまり *Pax6* と *Math3* を共発現した細胞または *Pax6* と *NeuroD* を共発現した細胞は成熟したアマクリン細胞に分化していた。このことから bHLH 因子とホメオボックス因子の組み合わせにより特定の細胞への分化が決定されることが示唆された。

【総括】これらの結果から、bHLH 型転写因子 *Math3*、*NeuroD* はアマクリン細胞の形成に必要であることが明らかになった。また、前駆細胞からグリア細胞および神経細胞のサブタイプへの運命決定には bHLH 型転写因子群のバランスで制御されることが強く示唆された。さらに運命決定には bHLH 因子に加え、ホメオボックス因子の協調が必要であることが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、網膜細胞の再生という国際的にもきわめて関心の高い問題にとりくんでおり、神経網膜の構成細胞のひとつである網膜アマクリン細胞の発生には転写因子 *Math3*、*NeuroD* が必要であることをつきとめた。この結果は、機能的網膜細胞に分化させる因子を同定したという点で、将来の再生医療への応用を考える上でとても意義深い。

本論文は学位の授与に価するものと認める。