

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Study on the dedifferentiation of retinal pigmented epithelial (RPE) cells during newt retina regeneration by Otx2 expression   |
| Author(s)    | 酒見, 早苗  |
| Citation     | 大阪大学, 2005, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/45636">https://hdl.handle.net/11094/45636</a>   |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | 酒見 卓苗  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(理学)   |
| 学位記番号      | 第 19224 号  |
| 学位授与年月日    | 平成 17 年 3 月 25 日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>理学研究科生物科学専攻  |
| 学位論文名      | Study on the dedifferentiation of retinal pigmented epithelial (RPE) cells during newt retina regeneration on by Otx2 expression<br>(Otx2 の発現変化によるイモリ網膜再生時の網膜色素上皮細胞脱分化過程の解析) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 徳永 史生<br><br>(副査)<br>教授 永井 克也    教授 小倉 明彦    助教授 堀内 眞理<br>助教授 久富 修  |

#### 論文内容の要旨

Otx2 はホメオドメインを持つ転写因子で、網膜色素上皮細胞予定域を決定し、さらに分化を促進する。また、最近の研究ではマウスで Otx2 が Crx の転写を活性化し、神経網膜前駆細胞の視細胞への運命決定を行っていることや、ゼノパスで双極細胞の分化を促進していることが分かっている。Otx2 の網膜発生過程における発現はマウスとニワトリの解析から、はじめ眼胞全体に発現し、次に神経網膜予定域での発現が消え、眼杯外層(網膜色素上皮細胞予定域)に局在するものの、その後、再び一部の post-mitotic な神経網膜前駆細胞で発現し、最終的には網膜色素上皮細胞層、視細胞層・双極細胞の位置する内顆粒層外側に局在することが知られている。これらの発現変化は Otx2 の機能とよく一致している。しかし、イモリの網膜発生過程では特殊な発現を示す可能性は否定できない。また、イモリの網膜再生の後半は発生と多くの共通点があることが分かっている。そこでまず、イモリの網膜発生過程における Otx2 の発現を調べた。その結果、基本的にはマウスやニワトリの網膜発生過程での発現の報告と一致することが分かった。

再生網膜に対する蛍光免疫組織化学的解析の結果、網膜再生前期の新しく形成された 1~2 細胞の厚みをもつ層が色素を様々な程度で含む段階では Otx2 は新しく出来た層と元の網膜色素上皮細胞層の両方で一様に発現しており、これはこの段階で新しく出来た層を神経網膜原基とし、元の網膜色素上皮細胞層を網膜色素上皮細胞層と区別してきたこれまでの研究とは異なっていた。そこで、本研究では便宜的にブルック膜に接する単層の細胞層(元の網膜色素上皮細胞層)とブルック膜に接しない新しく出来た層をそれぞれ外層、内層と呼ぶことにする。次に、内層がさらに 1 細胞層程厚くなり、色素を全体的に失うと、若干の細胞を残して内層での Otx2 の発現は弱まるが、外層での Otx2 の発現は維持されていた。Otx2 はチロシナーゼなどの転写を活性化し、網膜色素上皮細胞の分化と維持に働くことが分かっている。よって、神経網膜原基とされてきた内層は Otx2 が downregulate される時期まで網膜色素上皮細胞の一部の性質を維持していることが予想された。そこで、網膜色素上皮細胞特異的なマーカーで、網膜色素上皮細胞の機能の一つであるレチノイドの代謝に働く RPE65 と CRBP の発現を蛍光免疫組織化学により解析したところ、Otx2 同様、はじめは内層と外層の両方でこれらのタンパクの発現が維持されていたが、その後全体的に内層が色素

を失うと内層での発現がほとんど見られなくなった。よって、神経網膜原基とされてきた内層は色素を全体的に失う時期までは網膜色素上皮細胞の一部の性質を維持していることが明らかになった。また、他の報告からイモリの網膜再生前期に *Otx2* が *downregulate* されるのと同じステージに内層で *N-CAM* の発現が始まることが分かっている。また *in vitro* でウズラの *embryo* の神経網膜細胞に *Otx2* を過剰発現させると網膜色素上皮細胞に分化転換するという報告がある。このことから網膜色素上皮細胞の一部の性質の消失が網膜神経前駆細胞への分化転換に必要であること、*Otx2 downregulation* がその性質の消失に働いている可能性が考えられる。

本研究では網膜再生の典型的なモデルであるイモリについて解析することにより、網膜再生研究において注目すべき時期として、*Otx2* が *downregulate* される時期を挙げ、網膜色素上皮細胞から網膜神経前駆細胞への分化転換は、網膜色素上皮細胞の一部の性質の消失を伴うこと、そのステップに *Otx2* が働いていることを示唆する結果を得た。

### 論文審査の結果の要旨

イモリは脊椎動物のうち、成体になってからも主に網膜色素上皮細胞から神経組織を再生させることができる典型的な網膜再生のモデル動物である。酒見早苗君は *Cynops pyrrogaster* (アカハライモリ) のこれまで形態的な知見が主であった、網膜色素上皮細胞の分化転換の最初のステップである形態的な脱分化過程を網膜色素上皮細胞の分化と維持に働く転写因子と網膜色素上皮細胞のレチノイドの代謝に働く蛋白の発現により研究した。まず、ホメオドメインを持つ転写因子 *Cynops Otx2 cDNA* を単離し、その発現を、RT-PCR、免疫組織化学、*in situ hybridization* により解析し、次に網膜再生過程での *Otx2* の発現を網膜色素上皮細胞マーカーである *RPE65* と *CRBP*、網膜色素上皮細胞とミュラーグリア細胞のマーカーである *CRALBP* の発現と比較して、再生過程でのそれら蛋白質の発現変化を調べた。

成体と、発生過程での *Otx2* の発現状態を確かめた後、再生網膜については次の知見を得た。網膜再生の始めの段階では、*Otx2* の発現は再生した網膜で一様に見られた。続いて、新たに形成された層が全体的に色素を失うと、*Otx2*、*CRBP* と *RPE65* の発現はブルック膜に接する色素を持つ単層の外層に局在し、新しくできた層での *Otx2* の発現は低下することを見出した。これらの結果は時空間的な *Otx2* の発現制御が色素上皮細胞のマーカーの発現と一致していることが示された。一方、他の色素上皮細胞のマーカーと対照的に、*CRALBP* は *Otx2*、*CRBP* と *RPE65* の発現は外層に局在した後も再生網膜全体に発現していた。また、この時期にミュラーグリア細胞特異的に発現する *GFAP* も新たに形成された層で発現することから、ミュラーグリア細胞が再生の早い時期から現れていることが示唆された。このことは、ミュラーグリア細胞が網膜の再生の初期に重要な役割を果たしていることを示唆している。本研究によって、酒見早苗君はイモリの網膜再生研究ではじめて、網膜色素上皮細胞の分化と維持に働く転写因子と網膜色素上皮細胞のレチノイドの代謝に働く蛋白の発現から研究することで、新たに網膜再生の初期過程には外層の細胞は完全には脱分化しないこと、また新しく形成される神経網膜原基は、網膜色素上皮細胞の脱分化を経て、神経網膜原基に転換していることを支持する結果を得た。また、この結果は *Otx2* の網膜再生過程における働きを知る上でも重要な知見である。

この結果は再生医療に貢献する可能性ある知見を提供するものであり、酒見早苗君提出の論文が博士(理学)の学位論文として十分価値有るものと認める。