

## 審査の結果の要旨

氏名 林 雅萍

本研究では、網膜前駆細胞の分化を制御する転写因子としてSox2に着目し、マウス網膜の発生におけるSox2の役割を解析した。胎児網膜体外培養系を用いてSox2の過剰発現と機能阻害実験を行うことで、Sox2が網膜前駆細胞の増殖と分化に及ぼす影響を明らかにした。さらに、Sox2による既知の転写因子の発現制御を解析することで、網膜前駆細胞において細胞の運命を決定する転写因子のネットワークについても研究を進めた。

下記の結果を得ている。

1. 発生期網膜におけるSox2の発現をRT-PCRと免疫染色で調べたところ、Sox2は発生初期には網膜前駆細胞で発現し、分化に伴って神経節細胞層の神経節細胞と、内顆粒層に存在するアマクリン細胞とミューラーグリア細胞で発現を認めた。この結果は、Sox2が前駆細胞から神経節細胞とアマクリン細胞、そしてミューラーグリア細胞への分化を制御している可能性を示している。
2. Sox2過剰発現ベクターより作成したレトロウイルスをマウス胎児網膜器官培養感染後2週間培養して、分化に対する影響を調べた。コントロールのウイルスでは、感染細胞の大部分は外顆粒層に位置し、視細胞に分化したことが確認された。一方、Sox2過剰発現の場合、感染細胞の大部分は内顆粒層に存在していた。免疫染色を行って細胞種を検討したところ、これらの細胞は、神経節細胞とアマクリン細胞のマーカーであるHuやPax6を発現していた。感染細胞の中でHuとPax6陽性細胞の割合は、コントロールウイルスでは10%であったのが、Sox2過剰発現によって60%に増加した。以上の結果から、網膜前駆細胞にSox2を過剰発現させると、視細胞への分化を抑制して、神経節細胞とアマクリン細胞への分化を促進することが明らかになった。
3. RNA干渉を利用して、網膜前駆細胞でSox2の機能阻害実験を行った。コントロール、またはSox2を機能阻害した場合のいずれでも、感染細胞の大部分は外顆粒層に存在し、視細胞へ分化したことが確認されたが、Pax6陽性細胞を比較したところ、Sox2機能阻害の場合に有意にPax6陽性細胞が減少することが確認された。Sox2は網膜発生において、神経節細胞とアマクリン細胞への分化を制御していることが明らかになった。
4. Sox2がPax6の発現を制御している可能性を検討するために、Pax6のプロモーター領域を単離して、この領域によってルシフェラーゼの発現が制御される遺伝子配列を作成した。この配列を含むベクターを単独で、あるいはSox2と共にY79培養細胞に遺伝子導入して、ルシフェラーゼ活性を測定した。コントロールと比較してSox2を発現させた場合には、ルシフェラーゼ活

性が増加することを認め、このことからSox2 がPax6 に対して転写アクチベーターとして作用していると考えられた。実際、Pax6 のプロモーター領域を解析したところ、Sox2 結合配列を 1 箇所認められた。この結果から、網膜前駆細胞においてSox2 はPax6 の発現を促進することによって、アマクリン細胞への分化を制御していると考えられた。

以上、本研究では網膜前駆細胞の分化に対するSox2 の役割を解析し、Sox2 が前駆細胞から神経節細胞とアマクリン細胞への分化を制御していることを明らかにした。また、Sox2 はPax6 の発現を促進することで、アマクリン細胞への分化を制御する作用が示唆された。本研究は発生初期に働くと考えられる、転写因子のネットワーク網の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。