

## 審査の結果の要旨

氏名 栗林 寛

本研究はマウス網膜発生初期において多様な機能を担う分子 **Bone morphogenetic protein (BMP)**の新たな機能を解明する目的として行われた。これまでその機能が未知であった網膜発生後期に着目し、網膜体外培養系における機能獲得・機能喪失を中心とした解析を試みたもので、下記の結果を得ている。

1. **RT-qPCR** を用い、発生期網膜での発現が知られる **BMP-2**、**BMP-4**、**BMP-7** と **BMP** 受容体 **BMPR-Ia**、**BMPR-Ib**、**BMPR-II** の経時的発現変化を確認した。その結果、胎生 14 日目で **BMP-2**、**BMP-4**、**BMP-7**、**BMPR-Ib** が高い発現を示した。また、出生後においても全ての分子の発現が維持されている事が分かった。
2. リン酸化 **Smad** と細胞特異的マーカーに対する抗体を用いた免疫組織化学により、**BMP** シグナルが活性化されている網膜細胞種の同定を行った。その結果、網膜前駆細胞でリン酸化 **Smad** の弱い発現がみられ、分化後のガングリオン細胞、アマクリン細胞、水平細胞、バイポラー細胞、ミュラーグリアで強い発現が見られた。この結果から、**BMP** シグナルによるこれら細胞種の分化への影響が示唆された。
3. 発生期網膜の体外培養系において活性型／不活性型 **BMPR** を過剰発現させ、**BMP** シグナルが細胞分化に与える影響を調べた。その結果、活性型 **BMPR** によってバイポラー細胞、ミュラーグリアの増加、ロッド視細胞の低下が認められた。また、不活性型 **BMPR** の過剰発現では、逆の表現型を示した。さらに、細胞増殖、細胞死への影響はみられなかった。
4. 活性型／不活性型 **BMPR** の過剰発現が細胞分化を制御する転写因子の発現に与える影響を検討する為に、**RT-qPCR** による解析を行った。その

結果、BMP シグナル活性依存的に発現変動を示す転写因子として Hey2 を同定した。また、プロモーター領域を用いた Luciferase アッセイにより、Hey2 は上流領域を介して BMP シグナルによる発現誘導を受けている事が明らかになった。

5. Hey2 に対する shRNA 発現プラスミドを用い、活性型 BMPR によって生じた表現型に対するレスキュー実験を行った。BMP シグナル活性化に加えて Hey2 を阻害したところ、ミュラーグリアとロッド視細胞数が部分的に回復する事が分かった。一方、バイポラー細胞数では統計学的に有意な回復はみられなかった。
6. BMP シグナルと Notch シグナルの活性操作を組み合わせ、両シグナル経路のクロストークについて検討した。DAPT 処理によって Notch シグナルを阻害すると、ミュラーグリア、バイポラー細胞の減少、ロッド視細胞の増加を引き起こした。DAPT 処理に加えて活性型 BMPR を導入すると、バイポラー細胞とロッド視細胞数の部分的な回復がみられた。一方、NICD の過剰発現により Notch シグナルを活性化すると、ミュラーグリア、バイポラー細胞の増加、ロッド視細胞の減少を生じた。NICD に加えて不活性型 BMPR を導入すると、ミュラーグリアとロッド視細胞数の部分的な回復がみられた。さらに、RBP-J $\kappa$  リポータープラスミドを用い、両シグナル経路に対する応答性を確認したところ、RBP-J $\kappa$  リポータープラスミドは Notch シグナルへの応答性を示すが、BMP シグナルに対しては非依存であった。
7. BMP シグナル活性を遺伝的に欠損した Smad4 Conditional knockout mouse の表現型の解析を行った。網膜体外培養系を模した実験として、胎生 17 日、18 日目で Tamoxifen の腹腔投与をした *Smad4<sup>fx/fx</sup>*; *ROSA26-Cre<sup>ERT2</sup>* mouse の解析を試みた。網膜細胞分化が終了した出生後 14 日目で免疫染色を行ったところ、ミュラーグリア、バイポラー細胞の減少がみられた。さらに、*Smad4<sup>fx/fx</sup>*; *DKK-Cre* mouse で同様の解析

を行ったところ、ミュラーグリア、バイポラー細胞、アマクリン細胞数の減少がみられた。また、網膜を構成する Inner nuclear layer と Outer nuclear layer の厚みが減少していた。

- 最後に、ミュラーグリアの形態形成に対する BMP シグナルの影響を検討した。BMPR 阻害剤 LDN193189 を添加しながら、胎生 17 日目マウス網膜のモノレイヤー培養を行った。S100 $\beta$  陽性かつ双極型の細胞をミュラーグリアとして、そのプロセス長を測定した。培養 10 日目では BMP シグナル阻害によるプロセス伸長への影響はみられなかったが、培養 14 日目ではプロセス伸長の阻害がみられた。さらに、shHey2 を用いた解析により、この影響は Hey2 非依存的である事を明らかにした。

以上、本論文はこれまで未知であった網膜発生後期における BMP シグナルの機能に着目し、網膜細胞分化、形態形成制御への関与を明らかにした。本研究は網膜発生および神経発生の解明に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものとする。