

博士學位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第42号

2017年3月

京都産業大学

— は し が き —

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日文部省令第 9 号）第 8 条の規定による公表を目的とし、平成 29 年 3 月 19 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位番号に付した甲は学位規則第 4 条第 1 項によるもの（いわゆる課程博士）であり、乙は同条第 2 項によるもの（いわゆる論文博士）である。

目 次

課程博士

1. 長岡 敏彦	[博士 (マネジメント)] ……	1
2. 真野 毅	[博士 (マネジメント)] ……	8
3. 山崎 方義	[博士 (マネジメント)] ……	19
4. 川勝 弥一	[博士 (生物工学)] ……	24
5. 飯田 英明	[博士 (生物工学)] ……	28

氏名（本籍）	飯田 英明（大阪府）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工第27号
学位授与年月日	平成29年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	神経性網膜からの水晶体への分化転換は、Notch シグナルからの脱抑制によっておきる
論文審査委員	主 査 近藤 寿人 教授
	副 査 黒坂 光 教授
	〃 板野 直樹 教授

論文内容の要旨

発生途上の、あるいは発生を遂げた組織が、大きな分化状態の変化を示す現象——特に通常の発生の細胞系列から大きく外れた変化を示す現象——は「分化転換」と総称されている。分化転換の機構を解明することによって、通常の細胞分化がどのようにして成立するのか、また細胞の分化状態にはどのような可塑性が与えられているのかを明らかにする鍵が得られると考えられた。この考えのもとに、1980年代には盛んに分化転換の現象が研究された。なかでも、岡田節人グループが見出した、培養条件下での鳥類胚網膜から水晶体への分化転換は、現象の明確さから分化転換の代表例とみなされた。網膜から水晶体への分化転換に必要な、あるいはそれに影響を与えるさまざまな培養上の条件が検討され、胚の網膜組織の解離や培養自体ではなく、細胞間の相互作用が限定的な、平板培養の条件下に一定期間（8日以上）細胞を置くことが必要であることがわかった。ただ残念ながら、当時は転写因子についても細胞間シグナルについても、全く情報がない時代であり、研究が現象論を越えることはなかった。しかし、研究の意義は現代でも変わらず、むしろ今日、分化転換現象を、現代的な情報と研究方法に基づいて改めて検討することに大きな意義がある。

申請者は、上に述べた、分化転換現象の典型例ともされるニワトリ胚（8日胚）の神経性網膜

から水晶体への分化の機構を研究した。この分化転換が、細胞間相互作用が少ない平板培養下で起きることから、接触した細胞間でのみ伝わるシグナルである Notch シグナルの関与を予想し、Notch シグナルの阻害剤 DAPT を培養に加えた。その結果、通常では培養 20 日以降に低頻度で起きる水晶体分化が、DAPT 処理によって 10 日目以降に急速に開始され、最終的には過半数の細胞が水晶体に分化してしまうことを見つけた。他の Notch シグナル阻害剤でも同様な効果が見られた。また、Notch シグナル阻害剤を 8 日以上作用させないと、阻害剤の効果が減弱された。

培養に DAPT を与えた直後に、Notch シグナルの直下にある *Hey1* 転写因子遺伝子の発現が急速に低下した。このことから、DAPT の効果は Notch シグナルの阻害によるものであることが再確認された。*Hey1* の発現低下に引き続いて、転写因子遺伝子 *Prox1*, *Pitx3* の発現が順次開始された。これらの転写因子は、正常な水晶体発生の初期過程に必須の転写因子であり、分化転換の過程でも正常な水晶体分化と同じプロセスを踏んでいることがわかった。さらに、分化転換で生じた水晶体は、正常な眼の水晶体で特異的に発現されるすべてのクリスタリンと、水晶体特異的な細胞骨格タンパク質を発現していた。

これらの研究結果から、申請者は次の結論に達した。胚発生期の神経性網膜は、神経細胞に分化するプログラムとともに、水晶体へ分化するプログラムを併せ持っているが、後者は正常な発生過程では Notch シグナルによって抑制されている。平板培養では、網膜細胞間の Notch シグナルが減弱するために、水晶体への分化（これが分化転換と呼ばれた）が低頻度で起きる。Notch シグナルが強く抑制されると、水晶体への分化プログラムが多くの細胞で脱抑制されて、大規模な水晶体分化がおきる。

この研究から、神経性網膜から水晶体への「分化転換」とされた現象は、内在の発生プログラムの脱抑制によって起きたことが示された。また同時に、他の分化転換現象も同様の機構によるものであることが示唆された。これまでの発生生物学では、「単一の細胞種を生み出すためには、特定の細胞系譜のステップを踏むことが必須である」という考え方が支配的であったが、その考え方を現代的な視点から改める必要があることを示している。1つの細胞系譜をたどっても、実際には複数の細胞種を生む潜在性が常にあるのだが、機能的な組織や器官の形成の障碍となるような細胞種の生成は、通常の発生過程では積極的に抑制されているというのが、この研究からもたらされた、新しいモデルである。

論文審査結果の要旨

発生生物学の分野では、20世紀の後半に重要な問題提起が数多くなされたが、遺伝子もシグナル因子も未だ明らかでなかった時代背景のために、研究が現象の記述に終わり、重要課題であるにもかかわらず未解決のままのものが幾つか残っている。その1つが、分化転換の機構である。その機構を、現代の情報と研究方法に基づいて解き明かすことが現代の発生生物学に大きく貢献しうる。

申請者は、40年ほど前に日本で見出された、胚の神経性網膜から水晶体への分化転換に注目した。特に、解離された網膜細胞が培養に移された際に、細胞間相互作用が制限される平板培養のもとに一定期間置かれることが必要であるという報告に着目して、細胞接着に依存した細胞間シグナルである Notch シグナルの関与を検討した。そして、ニワトリ8日胚の神経性網膜を解離、平板培養するとともに Notch シグナルの阻害剤である DAPT を培養に与えたところ、網膜細胞から水晶体細胞への分化が劇的に促進された。

申請者は、DAPT によって培養網膜細胞に引き起こされる現象を詳細に分析した。その結果、Notch シグナルの抑制の後に、水晶体分化の初期過程を制御する転写因子が順次発現され、それが水晶体分化を引き起こすだけでなく、生み出された水晶体細胞が、正常の水晶体で発現される特異的なタンパク質をすべて発現することを示した。つまり、網膜から出発した水晶体分化の過程は、正常な水晶体分化の過程をよく反映している。

申請者が採用した研究方法は、高度で多岐にわたっており、申請者の幅広い知識と高い研究能力を示している。洗練された培養技術を駆使するとともに、組織の免疫蛍光染色、レーザー顕微鏡による高解像度画像解析、セルソーターを用いた個々の細胞での発現解析と細胞集団の定量的な計測、免疫プロテオミクスを用いた発現タンパク質の定量的な分析、qRT-PCR を用いた遺伝子発現の経時変化の定量的な分析、マイクロアレイを用いた全遺伝子の発現分析など、多彩な研究方法を組み合わせ、客観性を持った揺るぎのない結論を導いた。つまり、胚の網膜細胞には、水晶体分化の能力が潜在しているのだが、正常発生ではその潜在的な分化能が、細胞間相互作用を介した Notch シグナルによって抑制されているという結論である。

この研究から、神経性網膜から水晶体への「分化転換」とされた現象は、内在の発生プログラムの脱抑制によって起きたことが示された。また、他の分化転換現象も同様の機構によるものであることが示唆された。つまり、発生生物学では、単一の細胞種を生み出すためには、特定の細胞系譜のステップを踏むことが必須であるという考え方が支配的であったが、その考え方を現代的な視点から改める必要があることが示された。具体的には、1つの細胞系譜から複数の細胞種が生まれうるのだが、機能的な組織や器官の形成の障碍となるような細胞種は、通常の発生過程では積極的に抑制されているという新しいモデルの提唱である。

本研究は、細胞分化の機構に新たな基本概念と科学的根拠を与え、その理解に大いに貢献する内容であることから、学術的に意義深いと評価される。また、多面的かつ論理的な解析が行われ、

得られた結果も説得力があることも評価される。本学位論文は斬新で充実した内容を持ち、申請の充実した研究能力を示すものでもあり、博士論文として高く評価される。

博士論文公聴会では、論理性に富んだ研究内容の説明がなされ、研究発表に続く質疑に対して、的確な応答がなされていた。これらの状況から、申請者の論理構成力、論文執筆力、説明力、質疑応答力、申請者がもつ学術的な見識と専門知識は、いずれも高い水準にあると評価された。したがって、調査委員は、申請者を「博士の学位授与にふさわしい基準を満たしているものとして合格」と判定した。