

論文内容の要旨

申請者氏名 Kenny Lischer

上皮シートは、器官や組織の表面を覆い、細菌や化学物質などの細胞外の刺激から器官や組織を守るバリアーとして機能する。そのため、上皮細胞は、アドヘレンスジャンクション、タイトジャンクション、ギャップジャンクションなどの細胞接着装置を介して接着し、シート構造を構築している。これらの接着を介して、細胞は多角形の形状を示すことが知られている。ショウジョウバエの翅の発生過程では、当初40個程度のものが5万個程度に増殖し、その際に、ほとんどの細胞の形状が六角形になる現象「六角形パッキング」が起こることが知られている。このような六角形パッキングは、ヒトの眼の角膜上皮細胞でも起こることが知られている。しかし、角膜の表面を構成する上皮細胞は扁平上皮細胞に分類され、接着装置によって多角形の形状を示し、一様な構造をとることが定性的に示されているが、定量的な解析が行われていないため、六角形パッキングが起こるのかについては明らかになっていない。そこで本研究では、眼の角膜上皮細胞で六角形パッキングが起こるかどうか、また、もし起これば、そのメカニズムを理解することを目指して研究を行った。

本研究では、ヒトの眼と類似性を持ち、その発生過程が観察できるゼブラフィッシュの眼をモデルとして角膜上皮細胞で六角形パッキングが起こるかどうかを解析した。まず、角膜上皮細胞の形態を観察するため、角膜上皮細胞を含む上皮細胞で発現する *krt4* プロモーター下でFアクチン結合蛍光タンパク質 *lifeactGFP* を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ *Tg[krt4:lifeactGFP]* を作製し、角膜上皮細胞の細胞の大きさと頂点の数を定量した。その結果、眼の発生の初期では、細胞の大きさ、および、頂点の数はばらついていたが、発生が進むにつれて、均一化していき、視覚がすでに獲得された72時間胚においては、六角形で似た大きさの細胞が中心となり、六角形パッキングが起こることが明らかになった。また、機械受容イオンチャネルの阻害剤を処理したことで、六角形パッキングが阻害され、角膜上皮細胞には、少なくとも、*piezo1*, *piezo2a2*, *piezo2b*, *trpc1*, *trpc6b* が発現する結果が得られたことから、角膜上皮細胞の六角形パッキングには、機械受容イオンチャネルが関与することが明らかになった。

また、機械受容イオンチャネルの関与から、角膜上皮細胞は、何らかの機械刺激に晒されている可能性が考えられたため、角膜上皮シートを剥ぎ取る実験を行った。その結果、発生に伴い眼が体外へ膨らむ現象 (*eye outgrowth*) が、上皮細胞に機械的な刺激を加える可能性が示唆された。また、アガロースにゼブラフィッシュ胚を埋める実験によって、*eye outgrowth* を阻害すると、角膜上皮細胞の六角形パッキングが阻害されることも明らかになった。以上の結果から、角膜上皮細胞の六角形パッキングは、眼の発生のともない発生する機械刺激に依存して起こる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Kenny Lischer

上皮シートは、体表や組織・器官の表面に存在し、細菌や紫外線などの外界からの刺激から組織や器官を保護する役割を果たしている。上皮シートを構成する上皮細胞は、アドヘレンスジャンクション、タイトジャンクション、ギャップジャンクションなどの細胞接着装置を介して接着することで、五角形、六角形、七角形などの多角形の形状を示す。植物や昆虫、哺乳類などに存在する上皮細胞の多くは、構造的に安定な六角形の形状をとることが知られている。例えば、ショウジョウバエの翅の発生においては、70-80%の細胞が六角形を示す「六角形パッキング」と呼ばれる現象が起こることが知られている。一方、ヒトの眼の角膜の上皮細胞は、角膜の最外層に存在し、お互いに接着することで多角形の形状を示し、一様な構造をとることが定性的には示されているが、六角形パッキングが起こるかは明らかになっていない。そこで申請者は、眼の発生過程において、角膜上皮細胞で六角形パッキングが起こるかを調べる研究を行った。本研究では、ヒトの眼と類似性を持ち、発生過程の観察が容易なゼブラフィッシュの眼をモデル系として用いた。

申請者は、角膜上皮細胞の形態を観察するためにトランスジェニックゼブラフィッシュ Tg[krt4:lifeactGFP]を作製し、角膜上皮細胞の「大きさ」と「頂点の数」を定量することによって、ゼブラフィッシュの眼の発生過程で六角形パッキングが起こるかどうかを解析した。その結果、眼の発生初期である受精後 24 時間の時期では、頂点の数がばらつき、しかも、細胞の大きさもばらついていたが、受精後 72 時間までに、大きさが均等で六角形の形状を示す細胞が増えたことから、ゼブラフィッシュの角膜上皮細胞でも、ショウジョウバエの翅の上皮細胞のように六角形パッキングが起こることが世界で初めて明らかになった。さらに申請者は、六角形パッキングが起こる仕組みを薬理学的に解析し、機械受容イオンチャネル (piezo1, piezo2a2, piezo2b, trpc1, trpc6b など) によるリアノジン受容体 (RyR) を介したシグナル経路が関与することを示唆した。しかも、ゼブラフィッシュの眼の発生過程では、眼の発生に伴い体外へ眼が膨らむ現象 (eye outgrowth) が起こり、eye outgrowth によって上皮細胞に機械的な刺激を加わることで、角膜上皮細胞の六角形パッキングが起こる可能性を示唆した。

以上のように、本論文は、ゼブラフィッシュの眼の発生において、角膜上皮細胞において六角形パッキングが起こることを初めて明らかにし、その制御に機械受容イオンチャネルを介したシグナルが関与する可能性を示唆したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。