




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 478 号	氏 名	横 山 勝 彦
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	濱 田 文 彦	
	副査氏名	山 岡 吉 生	
	副査氏名	松 浦 恵 子	
<p>【論文題目】 The PI3K/Akt pathway mediates the expression of type I collagen induced by TGF-β2 in human retinal pigment epithelial cells</p> <p>ヒト網膜色素上皮細胞において、PI3K/Akt 経路は、TGF-β2 による I 型コラーゲンの発現誘導シグナル伝達を媒介する</p> <p>【掲載雑誌】 Graefe's Archives for Clinical and Experimental Ophthalmology (Published on 20 Aug,2011)</p> <p>【背景と目的】 Transforming growth factor-β (TGF-β) は、増殖性硝子体網膜症の病態を形成する key mediator であるが、TGF-β を受容したヒト網膜色素上皮細胞が細胞外マトリックスを産生するシグナル伝達機構は、完全には解明されていない。本研究は、TGF-β2 による I 型コラーゲンの発現誘導シグナルにおける PI3K/Akt 経路の役割を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】 培養ヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19) を用いて、TGF-β2 刺激によって誘導される I 型コラーゲン mRNA (COL1A1, COL1A2) の発現と I 型コラーゲン蛋白質の産生を、PI3K/Akt 経路の阻害剤である wortmannin 存在下に、それぞれ real-time PCR、抗 I 型コラーゲン抗体を用いた免疫組織染色によって解析した。さらに、TGF-β2 による COL1A2 の転写活性化に wortmannin が与える影響は、COL1A2 プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーターコンストラクト (COL1A2/Luc) を用いたルシフェラーゼアッセイによって評価した。また、COL1A2 の転写活性化における TGF-β シグナル経路の主要伝達分子 Smad の関与の評価には、上述の COL1A2/Luc の Smad 結合部位に点変異を導入した Smad-mut/Luc と Smad の DNA 結合エレメント (CAGA) を 12 個連結させた Smad 反応性プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだ CAGA12/Luc を用いた。加えて、TGF-β シグナル経路を負に制御する Smad7 の mRNA 発現に対する wortmannin の影響についても検討した。</p> <p>【結果】 wortmannin の添加は、TGF-β2 によって誘導される I 型コラーゲン mRNA の発現と蛋白質産生、COL1A2 遺伝子の転写活性化を抑制した。また、TGF-β2 による Smad-mut/Luc、CAGA12/Luc の活性化も、wortmannin の添加による PI3K/Akt pathway の阻害によって有意に抑制された。一方、TGF-β2 による Smad7 mRNA の発現は wortmannin の添加によって増加した。</p> <p>【結論】 ヒト網膜色素上皮細胞において、PI3K/Akt 経路は、TGF-β2 による I 型コラーゲンの発現誘導シグナル伝達を媒介することが明らかになった。また、PI3K/Akt 経路は、Smad を介するシグナル伝達とこれを介さないシグナル伝達をともに媒介する作用を持つが、特に Smad を介するシグナル伝達を媒介する一つのメカニズムは、シグナル抑制型 Smad である Smad7 の発現を阻害するためであることが示唆された。</p> <p>本研究は、PI3K/Akt 経路の抑制が、網膜色素上皮細胞からの I 型コラーゲンの産生を抑え、増殖性硝子体網膜症の治療に繋がる可能性を示した新たな成果である。このため、審査員の合議により、本論文は学位論文に値するものと判断した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 横山 勝彦

論 文 題 目

The PI3K/Akt pathway mediates the expression of type I collagen induced by TGF- β 2
in human retinal pigment epithelial cells.

(網膜色素上皮細胞において、PI3K/Akt pathway は、TGF- β 2 で誘導される
I型コラーゲンの発現増加のシグナル伝達機構に重要な役割を果たす。)

要 旨

緒言: Transforming growth factor- β (TGF- β) は増殖性硝子体網膜症の病態形成における key mediator であるが、これによって引き起こされる細胞外マトリックス産生の細胞内シグナル伝達機構は完全には解明されていない。今回、網膜色素上皮細胞において、TGF- β で誘導される I 型コラーゲンの発現に PI3K/Akt pathway が関与するか否かを検討した。

方法: 培養ヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19) を TGF- β 2 で刺激し、PI3K/Akt pathway の阻害剤である wortmannin を添加し I 型コラーゲン mRNA (COL1A1, COL1A2) の発現を real-time PCR で解析した。抗 I 型コラーゲン抗体を用いた免疫組織学的検査により TGF- β 2 により誘導された I 型コラーゲン産生への wortmannin の影響について検討した。

COL1A2 の転写活性に wortmannin が与える影響をルシフェラーゼアッセイで検討した。Smad を介する経路とのクロストークについての検討は、COL1A2 プロモーターの Smad 結合部位に点変異を起こしたプラスミド (Smad-mut/Luc) と Smad の DNA 結合エレメント: (CAGA) を 12 個連結させた Smad 反応性プロモーター: (CAGA)₁₂ を各々ルシフェラーゼ遺伝子上流に繋いだプラスミド (CAGA₁₂/Luc) を用いて行った。さらに TGF- β 2 により誘導された Smad7 mRNA の発現に対する wortmannin の影響も検討した。

結果: wortmannin の添加は TGF- β 2 刺激で誘導される I 型コラーゲン mRNA (COL1A1, COL1A2) の発現とタンパク産生を抑制した。COL1A2 の転写活性も同様に抑制した。TGF- β 2 による Smad-mut/Luc の活性化は、wortmannin の添加による PI3K/Akt pathway の阻害により有意に抑制された。CAGA₁₂/Luc においても同様であった。さらに TGF- β 2 が誘導する Smad7 mRNA の発現が増加した。

結論：網膜色素上皮細胞において、PI3K/Akt pathway は、TGF-β2で誘導される I型コラーゲンの発現のシグナル伝達機構に重要な役割を果たす。また PI3K/Akt pathway は Smad 依存性の経路と非依存性の経路が存在する可能性がある。PI3K/Akt pathway を抑制することで網膜色素上皮細胞からの I型コラーゲンの産生が抑制できる。PI3K/Akt pathway は増殖性硝子体網膜症治療の新たな標的となり得る。