

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第487号	氏名	矢野博之
審査委員会委員	主査氏名	藤原 淳平 (藤)	
	副査氏名	藤島 誠 (藤)	
	副査氏名	伊奈 啓輔 (伊)	
論文題目			
Smad, but not MAPK, pathway mediates the expression of type I collagen in radiation induced fibrosis (放射線による線維化において、I型コラーゲンの発現にはSmad経路が重要な役割を担うが、MAPK経路は関与しない)			
論文掲載誌名 Biochemical Biophysical Research Communications 418:457-463, 2012			
論文要旨			
<p>放射線は医学的に広く利用されているが、局所的な高線量放射線被曝により肺や皮膚等の組織に線維化(Radiation-induced fibrosis; RIF)が生じる。RIFは放射線により線維芽細胞の増殖や形質変化、細胞外マトリックスの再構築が生じる結果と考えられているが、その過程を促進する細胞内のシグナル伝達や遺伝子発現に関わるメカニズムについて詳細には解明されていない。本研究ではRIF過程におけるI型コラーゲンの発現の変化とシグナル伝達およびMAPK経路との関与について検討した。</p> <p>NIH3T3細胞マウス胎仔線維芽細胞に、10Gyのγ線を照射後I型コラーゲンのmRNA発現の変化をreal-time PCR法により検討すると、照射後48時間でmRNA発現が照射前に比較して有意に増加した。ルシフェラーゼアッセイ法により、γ線照射によるI型コラーゲンの転写活性の変化を調べたところ、照射後72時間でルシフェラーゼ活性が増加した。さらに培養液中のI型コラーゲンタンパク量をELISA法で検討したところ、照射後72時間で有意に増加していた。シグナル伝達について解明するために、TGF-βの発現変化をreal-time PCR法により、TGF-βシグナル伝達の主要な下流分子であるSmad3のリン酸化の変化をWestern blotting法により調べた。TGF-β1の発現は放射線照射後24時間で上昇し、Smad3のリン酸化は照射後72時間で増加した。一方、TGF-βシグナルを阻害すると放射線によるI型コラーゲンの発現の増加が抑制され、Smad結合部位を変異させた場合も、放射線による転写活性の増加が抑制された。しかし、MAPK特異的阻害剤を用いてMAPK経路を阻害した場合は、放射線によるI型コラーゲンの発現増加に、ほとんど変化は見られなかった。siRNA法を用いてSmad3の発現を抑制した場合、放射線によるI型コラーゲンの発現増加が抑制されるのに対し、MAPKの発現を抑制した場合は、ほとんど変化は見られなかった。本研究は、放射線によりI型コラーゲンの発現が、転写、翻訳、タンパク質レベルにおいて増加していること、TGF-βシグナル活性を阻害すると、I型コラーゲンの発現増加が抑制されること、MAPK経路を阻害しても、放射線によるI型コラーゲンの発現増加に影響がみられないことを示した。</p> <p>英語表現に誤記述などがあるものの、審査委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 矢野 博之

論 文 題 目

Smad, but not MAPK, pathway mediates the expression of type I collagen in radiation induced fibrosis.

(放射線による線維化において、I型コラーゲンの発現には Smad 経路が重要な役割を担うが、MAPK 経路は関与しない。)

要 旨

緒言：放射線は医学的に広く利用されているが、局所的な高線量放射線被曝により肺や皮膚等の組織に生じる線維化 (Radiation-induced fibrosis; RIF) が懸念される。RIF は放射線による線維芽細胞の増殖や分化、細胞外マトリックスの再構築、或いは各種サイトカインや成長因子によるシグナル伝達の変化等、放射線に対する複数の要因の協調的な応答の結果、生じると考えられている。しかし、RIF プロセスを促進する細胞内のシグナル伝達や遺伝子発現に関わるメカニズムについて詳細には解明されていない。一方、近年、細胞外マトリックス産生に関与する TGF- β シグナルにおいて、Smad 経路が細胞内シグナル伝達の主要経路であることが認められている。また、この経路と MAPK 経路の間にはクロストークがみられ、MAPK 経路は放射線により影響を受けるとの報告がなされている。本研究では RIF プロセスに関連し、細胞外マトリックスの主成分である I 型コラーゲンについて、放射線による発現の変化とシグナル伝達への影響、さらには MAPK 経路との関与について検討した。

方法：10 Gy の γ 線を照射した NIH3T3 細胞を用いて、放射線による I 型コラーゲンの mRNA 発現の変化を real-time PCR 法、タンパク産生の変化を ELISA 法により調べた。放射線による I 型コラーゲンの発現に関するシグナル伝達について調べるために、real-time PCR 法により TGF- β の発現変化を、Western blotting 法により TGF- β シグナル伝達の主要な下流因子である Smad のリン酸化の変化を調べた。さらに、TGF- β シグナル伝達経路を阻害した場合の I 型コラーゲンの発現を調べた。ルシフェラーゼアッセイ法により、放射線による I 型コラーゲンの転写活性の変化を調べた。また、転写領域に存在する Smad 結合部位に変異を導入し、転写活性の変化を調べた。MAPK の関与については、MAPK 特異的阻害剤及び siRNA を用いて MAPK 経路を阻害し、I 型コラーゲンの発現の変化を調べた。

結果：NIH3T3 細胞において、放射線により I 型コラーゲンの mRNA 発現、タンパク産生、及び転写活性が増加し、TGF- β の発現、Smad のリン酸化も増加した。一方、TGF- β シグナルを阻害すると放射線による I 型コラーゲンの発現の増加が抑制され、Smad 結合部位を変異させた場合も、同様に放射線による転写活性の増加が抑制された。しかし、MAPK 特異阻害剤を用いて MAPK 経路を阻害した場合は、放射線による I 型コラーゲンの発現増加にほとんど変化は見られなかった。同様に、siRNA 法を用いて Smad3 の発現を抑制した場合、放射線による I 型コラーゲンの発現増加が抑制されるのに対し、MAPK の発現を抑制した場合は、ほとんど変化は見られなかった。

結語：本研究にて、放射線により I 型コラーゲンの発現が、転写、翻訳、タンパク産生レベルにおいて増加していることを示した。さらに、放射線により増加した TGF- β シグナル活性を阻害すると、I 型コラーゲンの発現増加が抑制された。一方、MAPK 経路を同様に阻害しても、放射線による I 型コラーゲンの発現増加に影響がみられなかった。

以上より、放射線による I 型コラーゲンの発現増加に関するシグナル伝達には、TGF- β /Smad シグナル経路が重要な役割を担い、MAPK 経路はほとんど関与していないと考えられる。