

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 白 井 智 彦

角膜内皮細胞は角膜の透明性維持に重要な役割を果たしており、内皮細胞の機能破綻は重篤な角膜浮腫を招くため、この細胞の機能を解析することは視機能維持のため大変重要である。このような背景から本研究では角膜内皮細胞の細胞外基質産生と水輸送に関するメカニズムを明らかにするため、角膜内皮における TGF- β の細胞内シグナル伝達機構、イオン輸送体の発現を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. TGF- β によるラミニン産生調節の分子メカニズム

培養角膜内皮細胞に TGF- β 刺激を加えたところ基底膜を構成する代表的な細胞外基質であるラミニン (LN) の産生が促進した。Constitutively active TGF- β type 1 receptor (T β R-I) cDNA を培養細胞に強制発現したところ、LN の産生が促進され、また Dominant negative T β R-I cDNA を遺伝子導入すると、TGF- β 刺激を加えても LN の産生が抑制された。このことから TGF- β による LN 産生は T β R-I を介した直接作用であることが確認された。また T β R-I 下流の細胞内シグナル伝達分子である Smad の LN 産生に対する影響を、Smad cDNA を培養細胞に強制発現することにより観察したところ、Smad2, Smad3, Smad4 の遺伝子導入により TGF- β による LN の産生はさらに促進され、これら Smad の相加効果も見られた。また Smad7 の強制発現により、TGF- β による LN の産生は抑制され、Smad7 は T β R-I 下流のシグナル伝達における negative feedback を担っていると考えられた。

2. ヒアルロン酸合成酵素の発現調節

ヒアルロン酸 (HA) は細胞運動や細胞の coating に関する働きを持つ重要な細胞外基質であり、HA を産生する酵素であるヒアルロン酸合成酵素 (Hyaluronan synthase; HAS) の角膜内皮における発現とその調節機構について検討した。培養角膜内皮細胞には分子レベルで HAS1, HAS2, HAS3 全ての isoform が発現し、HAS1, HAS2 は蛋白レベルで角膜組織に発現していた。HAS

の発現調節を検討するため、TGF- β や PDGF-BB 刺激を培養内皮細胞に加えたところ、HAS2のみ産生が促進された。またLNの実験同様 Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 を介した HAS2 の発現調節が観察され、TGF- β は Smad を細胞内シグナル伝達物質として HAS の発現を調節することにより、HA の産生を調節していると考えられた。

3. 角膜内皮細胞における NBC の発現

角膜内皮細胞における水輸送メカニズムの解明のため、水輸送や細胞内 pH (pHi) 調節機能を持つ、Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter (NBC-1) の角膜内皮における発現を検討した。培養ヒト角膜内皮細胞には RT-PCR の結果 NBC-1 の発現を認め、またヒト角膜組織において蛋白レベルで NBC-1 が角膜内皮細胞に発現していた。次に培養内皮細胞に対し pHi の測定をフルオロフォトメトリーで観察したところ、ナトリウム依存性、クローラ非依存性で、DIDS に感受性のある、起電性を持つイオントランスポーターの機能的発現を認め、それは NBC-1 であると考えられた。

以上、本論文は角膜内皮に重要な TGF- β による細胞外基質産生の分子メカニズムやイオン輸送体の発現を検討、解析したものである。TGF- β の作用を調節、制御することにより角膜内皮の創傷治癒や細胞保護に臨床応用される可能性がある。また内皮の水輸送、イオン輸送機構の解明により、角膜浮腫の治療法開発の一助になると考えられる。本研究は、将来角膜内皮をターゲットとした機能調節、制御を生体内へ応用する基礎となると考えられ、学位の授与に値するものとする。