

9. ブドウ糖液の添加は問題ないのか？

通常の血液製剤の糖液との混和は日赤より慣例的に禁止されていますが、本研究では5%ブドウ糖液を用いて最終濃度0.1%(100 mg/dl)になるように調整しました。さらに10 mg/dlから500 mg/dlの範囲でブドウ糖液添加による溶血を測定しましたが、有意な溶血は認めませんでした。また、各ブドウ糖液濃度における浸透圧をそれぞれ測定しましたが、有意な差は認められませんでした。他のパラメーターは測定しておりません。

10. イノシンの毒性があるならば濃度を下げてみてはどうか？

イノシン濃度を下げることでヌクレオシド経路の活性化が低下する可能性があるため、ATP産生が低下すると考えられます。実際、イノシン濃度を50%にするとATP、2,3-DPG共に半減したため、濃度を下げるのは難しいと考えます。

その結果、麻酔科学一般および血液学について、学位授与に相当する十分な学識を有していることが認められ最終試験に合格した。

氏 名

あお まつ けい いち  
青 松 圭 一

学位の種類

博 士 (医学)

学位記番号

医 第 1 0 5 1 号

学位授与の日付

平 成 2 3 年 3 月 2 2 日

学位授与の要件

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目

TGF- $\beta$  induces sustained up-regulation of SNAIL and SNAI2 through Smad and non-Smad pathways in a human corneal epithelial cell line (TGF- $\beta$ は角膜上皮細胞に対してSmadおよびnon-Smad経路を介してSNAILとSNAI2の持続的発現上昇を誘導する)

論文審査委員 (主査)

教 授 下 村 嘉 一

(副主査)

教 授 福 田 寛 二

(副主査)

教 授 宮 澤 正 顯

## 論文内容の要旨

### 【研究の目的】

EMT (epithelial mesenchymal transition, 上皮間葉移行) は、細胞分子生物学的に上皮細胞形質から間葉系細胞形質に変化する現象であり、発生学から腫瘍学までの広い領域で EMT の関与が報告されている。しかし現在までに角膜上皮における EMT の関与はほとんど知られていない。今回我々は角膜上皮と EMT との関連を明らかにするために、角膜上皮細胞の TGF- $\beta$  誘導性 EMT について検討を行った。

### 【方法】

実験には不死化ヒト角膜上皮細胞株を用いた。TGF- $\beta$ 1 刺激条件下で角膜上皮細胞の細胞増殖、遺伝子発現変化についてウエスタンブロット法、MTT assay で検討した。TGF- $\beta$ 1 刺激条件下での EMT 関連分子の遺伝子発現変化については Realtime RT-PCR 法、細胞免疫染色、ウエスタンブロット法にて検討した。TGF- $\beta$ 1 刺激条件下での *SNAIL* および *SNAI2* 遺伝子発現変化については、48時間までの時系列データを評価した。

### 【結果】

TGF- $\beta$ 1 刺激により角膜上皮細胞は、時間・濃度依存的にリン酸化 smad2 の亢進を認め、細胞増殖抑制効果が見られた。TGF- $\beta$  刺激により EMT 関連分子の *VIM*, *FN1*, *SNAIL*, *SNAI2* の有意な発現上昇を認めたが、*TWIST1* の発現変化は観察されなかった。TGF- $\beta$  シグナルは smad 経路および non-smad 経路を介して *SNAIL* および *SNAI2* 遺伝子発現を誘導した。また角膜上皮細胞においては EGF 刺激と比較して、TGF- $\beta$  刺激は一部の細胞が細胞形態的に EMT に特徴的な変化を示した。細胞免疫染色およびウエスタンブロット法では TGF- $\beta$  シグナルによるカドヘリンスイッチの誘導が認められた。これらの結果から TGF- $\beta$  刺激により角膜上皮細胞は EMT を誘導することが明らかになった。EMT 誘導性分子である EGF と比較して *SNAIL* および *SNAI2* 遺伝子発現変化について検討したところ、TGF- $\beta$  は角膜上皮細胞の *SNAIL*, *SNAI2* に対して 48 時間前後までの持続的発現上昇を誘導した。

### 【考察】

我々はヒト角膜上皮細胞において、TGF- $\beta$  刺激が EMT を誘導すること、そのシグナルは smad および non-smad 経路を介すること、*SNAIL*, *SNAI2* の持続的発現上昇をもたらすことを明らかにした。TGF- $\beta$  シグナルと EGF シグナルのクロストークについては明らかな変化は認められなかった。本研究では、ヒト角膜上皮細胞において TGF- $\beta$  シグナルが EMT を誘導すること、*SNAIL*, *SNAI2* に対して長時間の発現制御を行なうことを明らかにした。

### 【結論】

ヒト角膜上皮細胞に対して、TGF- $\beta$  シグナル経路は *SNAIL*, *SNAI2* の持続的発現上昇を介して EMT を誘導する。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2011 年 月 日 公表予定	出版物名 Investigative Ophthalmology & Visual Science
	公 表 内 容	2011 年 月 日 発行予定
	全 文	

論文審査結果の要旨

本学位論文は角膜上皮細胞におけるTGF-β誘導性の上皮間葉移行（EMT, epithelial-mesenchymal transition）の検出とその特徴について解析を行ったものである。

EMTとはElizabeth Hayらによって提唱された概念で、胎生期の原腸形成過程において上皮系細胞が間葉系細胞化する現象として提唱され、発生学から腫瘍学までの広い領域で生理的あるいは病理的現象とEMTの関与についての報告がある。眼科学領域でも一部線維化性疾患との関係について報告が散見されるが、角膜上皮細胞とEMTについての詳細な検討についてはこれまで報告がなかった。

研究の結果、TGF-βシグナルは角膜上皮細胞に対して主にはSmad経路であるが一部non-Smad経路を介して、転写因子SNAI1およびSNAI2を誘導することによりEMTを強力に誘導することが示された。また、この誘導の特徴として転写レベルで時間的に長時間誘導能が維持されていることも示された。この中でEMTの分子生物学的特徴とされるカドヘリンスイッチや特徴的な細胞形態変化についても確認がなされていた。角膜組織の生理、特に上皮細胞では角膜創傷治癒過程でTGF-βやEGFシグナルが重要な役割を担うことから、両経路のクロストークについても検討がなされたが、本研究の結果からは有意なクロストークは認められなかったとしている。

上記をふまえ、平成23年2月9日に公聴会が開かれ慎重に審査が行われた。審査の過程において、本実験と生理的条件下でのTGF-β濃度の差について、細胞形態変化やEMTマーカー分子の誘導のみでEMTを起こしていると結論してよいか、角膜上皮細胞で実際にEMTが起こっていることを示す動物実験や初代培養細胞での報告が他に存在するか、TGF-βの下流シグナルであるSmadやnon-Smadシグナルの存在証明に他の方法論もしくは他細胞株での報告の有無、EGFシグナルの眼科臨床面での役割について、角膜上皮細胞の分泌するTGF-βの量について、E-カドヘリン抑制の機序について、角膜上皮でのTGF-βとEGFによるシグナルクロストークについての報告の有無、Smad2の欠損モデルによるEMT誘導抑制を証明することの提案と是非について、等の質疑応答がなされ、申請者からは概ね適切な回答と考察がなされた。

本研究によって角膜上皮細胞においてTGF-βがEMTを誘導する可能性が示された。このことは角膜創傷治癒の生理における分子生物学的メカニズムにEMTが関与する可能性を示唆するものと考えられ、医学博士の学位を授与するに値すると判断された。

氏名	香川 祐毅
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医第1052号
学位授与の日付	平成23年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	高速多相性CT撮像を用いた多血性肝細胞癌の最適な撮像時間の検討
論文審査委員(主査)	教授 村上 卓道
(副主査)	教授 上 裕 俊 法
(副主査)	教授 竹 山 宜 典