

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

Reeshan ul Quraish より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 551 号

学位申請者 : リーシャーン ウル クライシ
Reeshan ul Quraish

学位審査論文 : p27^{KIP1} loss promotes proliferation and phagocytosis but prevents epithelial-mesenchymal transition in RPE cells after photoreceptor damage

(p27^{KIP1} の欠損により視細胞傷害後の網膜色素上皮細胞の増殖と貪食が促進され、上皮間葉転換が抑制される)

著者 : Reeshan ul Quraish, Norihiro Sudou, Kaori Nomura-Komoike, Fumi Sato, Hiroki Fujieda

公表誌 : Molecular Vision (in press)

論文内容の要旨 :

p27^{KIP1} (p27) はサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 阻害因子の一つであり、核内でサイクリン-CDK 複合体に結合することで細胞周期を抑制し、細胞周期からの脱出と分化の促進に作用することが知られている。しかし、現在では細胞周期制御以外にも細胞骨格、細胞移動、転写、上皮間葉転換等、細胞の様々な機能の制御に関与していることが報告されている。p27 は神経網膜および網膜色素上皮の正常な発生に必須な因子であるが、成熟した網膜色素上皮における役割は不明である。p27 が成熟した網膜色素上皮の維持と機能にどのような役割を果たしているのかを明らかにするために、p27 欠損マウスを用いて、視細胞傷害に伴う網膜色素上皮の反応が p27 の欠損によりどのような影響を受けるかを検討した。

野生型 (C57BL/6J) マウスと p27 ノックアウト (KO) マウスにアルキル化剤 N-methyl-N-nitrosourea (MNU) を腹腔内投与し、視細胞変性を誘導した。MNU 投与後の各ステージでマウスの眼球を固定し、クリオスタット切片を作成して、BrdU アッセイ、免疫蛍光染色、TUNEL アッセイを行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。さらに野生型の網膜色素上皮を初代培養し、p27 タンパクの局在変化を解析した。

野生型と KO マウスのいずれにおいても MNU 投与後に視細胞特異的な変性が認められた。野生型では網膜色素上皮の増殖はほとんど認められなかったが、KO マウスでは MNU 投与後 2 日において約 16% の網膜色素上皮細胞で BrdU の取り込みが認められた。

KO マウスの網膜色素上皮は MNU 投与後に異常な突起を外顆粒層に向かって伸ばし、死んだ視細胞の外節や TUNEL 陽性の視細胞の細胞体を貪食しているのが観察されたが、このような異常な突起や細胞体の貪食は野生型では認められなかった。KO マウス網膜では野生型と比較して変性した視細胞がより早く除去されたが、マクロファージ系の細胞数は野生型と KO 網膜で大差はなく、KO 網膜において網膜色素上皮の貪食能がより活性化されていることが示唆された。KO マウスの網膜色素上皮細胞では MNU 投与後、ミオシン軽鎖のリン酸化が増加し、活性化したアクチン-ミオシン複合体がファゴソームの表面にリクルートされているのが観察された。p27 は RhoA を不活性化することにより細胞骨格の制御に関わることが知られており、網膜色素上皮の細胞骨格制御の異常が貪食能の活性化を引き起こしている可能性が示唆された。また、野生型の網膜色素上皮細胞は視細胞変性後に正常な上皮構造を失い、 α 平滑筋アクチンの発現増加、閉鎖帯タンパク質 ZO-1 の発現低下など、上皮間葉転換を示す所見が認められたが、このような変化は KO マウスでは認められなかった。正常な網膜色素上皮細胞では p27 は核のみに局在を認めたが、MNU 投与後に上皮間葉転換を示した網膜色素上皮細胞では核と細胞質の両方に p27 の発現が観察された。また網膜色素上皮を初代培養すると、細胞体の肥大化、 α 平滑筋アクチンの発現増加、ZO-1 の発現低下など、上皮間葉転換が認められたが、ここでも同様に p27 が細胞質に観察された。したがって、p27 タンパク質の細胞質への移行が網膜色素上皮の上皮間葉転換に関与している可能性が示唆された。

以上の結果より、p27 の欠損により、視細胞変性後の網膜色素上皮細胞の増殖と貪食が促進され、一方上皮間葉転換は抑制されることが明らかとなった。従って、p27 が網膜傷害に対する網膜色素上皮の様々な反応を制御し、網膜色素上皮の機能および維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 551 号	氏 名	Reeshan ul Quraish
学位審査担当者	主 査	中 野 裕 康
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	前 野 貴 俊
	副 査	堀 裕 一
	副 査	富 田 剛 司

学位審査論文の審査結果の要旨 :

本論文は細胞周期の阻害タンパク質 p27 遺伝子欠損マウスを用いて、細胞周期以外にも多彩な機能を有することが明らかにされている p27 分子の成熟した網膜色素上皮細胞における役割を明らかにすることを目的とした研究である。アルキル化剤の一種である MNU という薬剤を野生型マウスおよび p27KO マウスに投与して視細胞に細胞死を誘導し、その後の網膜上皮細胞による視細胞の貪食や組織修復過程を主に免疫組織学的に解析した。薬剤投与による細胞死の程度に両群で変化は認められなかったが、網膜色素上皮細胞の増殖は、p27KO マウスにおいて亢進していた。さらに細胞死に陥ったロドプシン陽性細胞を貪食した多数の網膜上皮細胞が p27KO マウスでは観察された。しかしながらマイクログリアのマーカーである Iba1 陽性細胞は増加していなかったことから、p27KO マウス由来の網膜上皮細胞の貪食能が、野生型マウスに比較して亢進していることが明らかとなった。そのメカニズムとしては p27KO マウス由来の細胞では、貪食に関与する Rho キナーゼの標的タンパク質であるミオシン軽鎖のリン酸化が亢進していることが原因と考えられた。さらに組織修復過程における epithelial-mesenchymal transition (EMT) について検討したところ、EMT は野生型マウスでは認められるものの、p27KO マウスで誘導されなかった。以上より、p27 は細胞周期に関与する以外にも、網膜上皮細胞の貪食や EMT などの反応を制御していることが明らかとなった。

質疑応答では、様々な質問が発表者に投げかけられた。例えば、①今回の知見から p27 遺伝子の機能を阻害するような治療法が考えられるか、もし可能だとするならばどのような疾患が適応となるか、②それぞれの実験ではマウスを何匹ずつ使用して、何回同じ実験を繰り返したのか、③使用した p27KO マウスは発がんの亢進などの表現型が出るのか、非ストレス下では網膜や視神経の形成に異常が認められないのか、④網膜上皮細胞を培養して粒子などを貪食させる in vitro の解析をしたことがあるのか、⑤MNU は視神経に対して強い毒性を発揮すると思われるが、もう少し程度の弱い刺激、例えば光刺激などで障害を加えた実験をしたことがあるかなど、様々な質問がなされた。申請者はそれらの質問に一つずつ的確に応答することができ、本研究内容及びこの研究の背景を確実に理解できていることが確認できた。

以上より、本研究は学位に値すると審査員全員一致で判断した。