The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Transforming growth factor -β1, -β2 and -β3 mRNA expression in human cornea
Author(s)	西田, 幸二
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40373
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【 87 】

氏　　名	西田幸二（にしだ こうじ）
博士の専攻分野の名称	博　　士（医　　学）
学 位 記 番 号	第　12847　号
学位授与年月日	平成 9 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Transforming growth factor-β1, -β2 and -β3 mRNA expression in human cornea （角膜組織における TGF-β1～3 の発現に関する研究）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 田野 保雄 （副査） 教 授 谷口 直之　教 授 吉川 邦彦

論 文 内 容 の 要 旨

〔目　的〕

Transforming growth factor-β(TGF-β)は約25 kDのポリペプチドで，胎児組織から成人までのさまざまな臓器・組織に存在し，胚発生の誘導や細胞増殖と分化，細胞外基質の産生，血管新生，創傷治癒の調節，免疫機構の調整などさまざまな生理機能を果たしている物質である。TGF-βは活性をもたない潜在型となって細胞から分泌されるが，潜在型は成熟型（活性型）にTGF-β前駆体蛋白の一部であるlatency-associated peptide（LAP）が結合して構成されている。また，現在ヒトのTGF-βとしてはTGF-β1～3の3つのアイソホームがクローニングされているが，これらは発生段階や組織により，異なった発現様式を示し，またゲノム遺伝子が位置する染色体も異なることから，それぞれが異なった機能を果たしていることが示唆されている。

角膜上皮層の維持には基底細胞の増殖・分化と表層細胞の脱落が常に調節されていることが必要で，創傷時には周辺部の上皮細胞が伸展・増殖して欠損部を修復し，その後はもとの細胞動態に帰するという機構が存在する。我々はこれまでに，上記の角膜の組織維持機構と修復機構におけるTGF-βの役割を明らかにすることを目的として，種々の研究を行ってきた。まず，角膜の器官培養系において，TGF-βが有意に角膜上皮創傷治癒を抑制させることを報告し，TGF-βが角膜上皮創傷治癒を調節している可能性を示唆した。つぎに，正常ヒト角膜におけるTGF-β1～3のLAPの局在を免疫組織化学的に検討し，β2-LAPが角膜上皮全層と実質全体に，β3-LAP抗体が上皮下に局在していることを証明した。本研究では，正常角膜におけるTGF-β1～3のmRNAの発現を，reverse-transcriptase polymerase chain reaction（RT-PCR）法で解析した。この際，TGF-β1～3の成熟型部分は極めて相同性が高い点を考慮し，それらの前駆体の相同性の低いLAP部分に対するプライマーを用いた。

［方法ならびに成績］

本研究ではhuman studyに関するヘルシンキ宣言に従って行った。剖検時に同意を得て入手した9例9眼（年齢49～81歳，男性2人，女性7人）の正常角膜組織を使用した。これらの組織から，角膜上皮細胞はゴルフメスで剝離して，角膜内皮細胞はデスメ膜を剝離して採取した。実質細胞のサンプルとして，残りの角膜実質を液体窒素で凍結し

紛砕したものを使用した。これらのサンプルから，mRNA を抽出して，reverse transcriptase で complementary DNA (cDNA) を合成した。その cDNA を鋳型として，TGF-β1～3 に特異的なプライマーを用いて PCR 法を施行した。プライマーとして，それぞれの TGF-β アイソホームの前駆体のアミノ酸配列から特異的な部分（LAP 部分の一部）を2箇所選択して，その部位に相当する20～22mer のオリゴヌクレオチドを作成した。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動しエチジウムブロマイド染色して検討した。さらに放射性（^{32}P）標識したそれぞれのアイソホーム特異的プローブを用いてサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。プローブは2つのプライマー間でアイソホーム特異的配列のオリゴヌクレオチド30mer を作成した。結果としては，角膜上皮細胞では，TGF-β2 前駆体 mRNA の発現を強く認め，TGF-β1と β3 前駆体 mRNA の発現も弱いながら認めた。実質細胞では TGF-β1と β2 前駆体 mRNA は発現していたが，TGF-β3 前駆体 mRNA の発現はみられなかった。内皮細胞はすべてのアイソホームの mRNA が発現していた。

［総　括］

本研究から，角膜上皮細胞に TGF-β2-LAP 蛋白および mRNA が発現していることが明らかとなり，潜在型の TGF-β2 が存在していることが示された。この結果は，TGF-β の3つのアンソホームのうち，TGF-β2 が角膜上皮層の維持に重要な働きをしていることを示唆している。今後，角膜上皮における TGF-β の役割を明確にするためには，in vivo における TGF-β の活性化のメカニズムを解明することが必須である。そのためには，角膜上皮創傷治癒過程や角膜上皮疾患などの病態における TGF-β の発現を検索すべきであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

TGF-β は細胞の増殖，分化や細胞外基質の産生を調節し，組織維持と修復に重要な働きをしていると考えられている増殖因子で，ヒトにおいては TGF-β1～3 の3つのアイソホームが存在して，異なった機能を司っている可能性が示唆されている。本研究では，正常角膜における TGF-β1～3 の mRNA の発現を reverse transcriptase polymerase chain reaction（RT-PCR）法で検討された。

角膜上皮細胞に TGF-β1～3 前駆体 mRNA が発現しており，特に，TGF-β2 前駆体 mRNA が有意に発現していることが明らかにされた。また，実質細胞に TGF-β1と β2 前駆体 mRNA，内皮細胞に TGF-β1～3 前駆体の mRNA が発現していることが証明された。これまでの研究を考慮して，角膜上皮細胞に TGF-β2-LAP 蛋白と mRNA が発現し，潜在型の TGF-β2 が存在していると結論づけられた。

本研究は，角膜組織における TGF-β の3つのアイソホームの発現を初めて明らかにした報告で，角膜上皮層の維持機構と修復機構における TGF-β の役割を解明するための基礎的データを導き出している。今後の角膜創傷治癒における増殖因子の役割についての研究に大きく寄与するものと考えられ，本研究は学位に値するものと認める。