



Title	The Effect of TGF- β 1 on Differential Gene Expression Profiles in Human Corneal Epithelium Studied by cDNA Expression Array
Author(s)	日比野, 佐和子
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43909
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

氏名	日比野 佐和子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 17683 号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	The Effect of TGF- β 1 on Differential Gene Expression Profiles in Human Corneal Epithelium Studied by cDNA Expression Array. (cDNA expression arrayを用いたヒト角膜上皮細胞におけるTGF- β 1による遺伝子発現変動のプロフィール)
論文審査委員	(主査) 教授 田野 保雄 (副査) 教授 内山 安男 教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

【目的】種々のサイトカインが角膜の恒常性維持に関与しているが、中でも、TGF- β は間葉系細胞では増殖を促進させ、上皮系細胞では抑制するということがわかっており、角膜上皮においても上皮細胞の増殖を抑制し、上皮の創傷治癒を遅延させることが知られている。今回、われわれはTGF- β 1に注目し、ヒト角膜上皮細胞の遺伝子発現がTGF- β 1によりどう変化するかについてcDNA array (Atlas Human 1.2 array; Clontech) を用いて検討した。そして、TGF- β 1の解析結果においてはその結果より得られた遺伝子発現の上昇あるいは減少が著明であった遺伝子について蛋白レベルでの変化を検討した。

【方法ならびに成績】培養正常ヒト角膜上皮細胞にTGF- β 1(10 ng/ml)を添加12時間後に回収した細胞より、PolyA⁺RNAを精製し、³²P-標識cDNAプローブを作製し、cDNA arrayを用いてTGF- β 1非添加群および添加群において遺伝子発現の変動を解析した。

培地には無血清培養液を用いた。また、非添加群と添加群の2種のサンプルをPoly⁺RNA画分と結合するビオチン化したオリゴ(dT)と混合し、ストレプトアビジン磁気ビーズを加えてビオチン化オリゴ(dT)/Poly⁺RNA複合体と結合させ、磁気粒子セパレーターを用いて複合体を回収した。cDNAプローブ合成は、捕獲したPoly⁺RNAを鋳型として、ビーズ上で直接行った。ハイブリダイゼーションを一晩かけて行った後、メンブレンを洗浄し、3時間、6時間、12時間、24時間感光させ、フォスフォイメージングにて取り込んだのち、アレイ解析ソフトArrayGauge(FUJIFILM)にて、遺伝子変動解析を行った。解析には12時間露光のデータを使用した。非添加群および添加群の画像におけるすべてのスポットの濃度、Ratio値(添加群/非添加群の発現比)を求めた。数多くの遺伝子がTGF- β 1により誘導を示した。今回解析した1176遺伝子のうちTGF- β 1により発現上昇が明らかな遺伝子は19遺伝子で代表的なものとしてcaspase10、CD45などがあげられた。一方、発現低下している遺伝子は277遺伝子で、plasminogen activator inhibitor-2(PAI-2)、transferrin receptor、integrin α 3等が代表的なものであった。これらの著明に変動した10遺伝子(PAI-2、transferring receptor、integrin α 3、cyclinD1、IGF-receptor、EGF-receptor、caspase3、caspase10、CD45、integrin β 4)についてはreverse transcription-polymerase reaction(RT-PCR)及

び、Fluoimaging を用いて mRNA での変動を定量的に解析した。RT-PCR ではそれら代表遺伝子のいずれも cDNA array と同様の変動を示し、Fluoimaging で得られた濃度比率は 10 遺伝子中 7 遺伝子で cDNA array の結果と一致していた。さらに、TGF- β 1 添加 48 時間後に蛋白を採取し、mRNA レベルで著明に減少した遺伝子 PAI-2、transferrin receptor、integrin α 3、不变であった遺伝子 IGF-R、EGF-R、caspase3、増加を認めた遺伝子 caspase10、CD45 については Western blotting 法により、蛋白の変動についても検討した。これらの 7 遺伝子については蛋白レベルにおいても、cDNA array の結果と一致していた。

【総括】TGF- β 1 により、ヒト角膜上皮細胞の多くの遺伝子の変動を認め、特に発現の低下が顕著であった。特に、角膜上皮での発現が報告されている PAI-2、transferrin receptor、integrin α 3、IGF-receptor、EGF-receptor、caspase3、caspase10 は TGF- β 1 の存在下では遺伝子の発現が著明に低下することがわかった。また、cDNA array によりその遺伝子変動が明らかになった PAI-2、transferrin receptor、integrin α 3、IGF-receptor、EGF-receptor、caspase3、caspase10 などが蛋白レベルでも同じ変動を示していることが初めて明らかとなった。こうした解析を発展させることにより TGF- β 1 の角膜上皮での役割、及び生物学的意義が明らかになる可能性があり、cDNA array による遺伝子発現のプロファイリングは有用な方法と考えられる。

論文審査の結果の要旨

角膜上皮の創傷治癒には多くのサイトカインが関与しているが、EGF が角膜上皮修復過程を促進するのに対し、Transforming growth factor- β (以下 TGF- β) はむしろ抑制することが *in vitro* の実験でわかっている。TGF- β は細胞外マトリックスを産生亢進することにより、*in vivo* では角膜の透明性を低下させるため、創傷治癒時には一時的に制御されることにより角膜の透明性を維持している。

本論文はヒト角膜上皮細胞における遺伝子発現が TGF- β 1 によりどう変化するかについて cDNA array (Atlas Human 1.2 array ; Clontech) を用いて検討したものである。

遺伝子変動解析により 1176 遺伝子のうち TGF- β 1 により発現上昇が明らかな遺伝子は 19 遺伝子で、代表的なものとして caspase10、CD45 などが挙げられ、一方、発現低下している遺伝子は 277 遺伝子で、plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2)、transferrin receptor、integrin α 3、cyclinD1 等が代表的なものであった。これらの著明に変動した遺伝子および変動を認めなかつた遺伝子 10 遺伝子 (PAI-2、transferrin receptor、integrin α 3、cyclinD1、IGF-receptor、EGF-receptor、caspase3、caspase10、CD45、integrin β 4) については reverse transcription-polymerase reaction (RT-PCR) および、Fluoimaging を用いて mRNA での変動を定量的に解析し、RT-PCR においてはいずれも cDNA array の結果と一致していた。Fluoimaging で得られた添加群/非添加群の発現比は 10 遺伝子中 7 遺伝子で cDNA array の結果と一致していることを見出した。次に、mRNA レベルで著明に低下していた遺伝子 PAI-2、transferrin receptor、integrin α 3、不变であった遺伝子 IGF-R、EGF-R、caspase3、増加を認めた遺伝子 caspase10、CD45 については Western blotting 法により、蛋白レベルにおける変動について検討した結果、いずれも cDNA array の結果と一致していることが示された。

角膜上皮における TGF- β の働きは種々のサイトカインや他の因子により遺伝子レベルで調節されているが、まだ不明な点も多い。今回の結果より、TGF- β 1 はさまざまな遺伝子の情報伝達経路を通して、角膜上皮の創傷治癒過程における調節に深く関与していることが明らかとなった。こうした TGF- β の作用を遺伝子レベルで明らかにすることにより、(TGF- β に関与する多くの疾患の病因解明および、診断、治療に貢献するものとして、) 角膜創傷治癒過程における角膜混濁の原因解明および診断、治療に貢献するものとして、本論文は学位に値するものと考える。