

論文内容の要旨

申請者氏名 Supanji

HtrA1 は細胞外に分泌されるセリンプロテアーゼであり、細菌から哺乳動物まで広く分布する。細菌の HtrA 遺伝子はストレス応答遺伝子であり、熱や浸透圧ショックで発現が誘導され細胞のストレス抵抗性を増加させる機能がある。哺乳動物の HtrA1 の機能は不明な点が多いが、細胞外基質のプロテオグリカンや一部のコラーゲンを分解し、TGF- β のシグナル伝達を阻害することが知られている。また、加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD) を始め、様々なヒトの疾患と関連しており注目を浴びている。AMD の危険因子には酸化ストレスと遺伝素因があり、HtrA1 遺伝子のプロモーター領域の 1 塩基多型 (SNP) と AMD 発症に強い相関がある。高リスク SNP は網膜色素上皮 (RPE) 細胞で HtrA1 の発現を上昇させることから、RPE 細胞での HtrA1 の発現上昇が AMD 発症に関与すると考えられる。申請者は、「RPE 細胞では酸化ストレスが HtrA1 の発現を誘導し、誘導された HtrA1 が RPE 細胞の老化を促進する。」との仮説を立て、これを検証した。

申請者はマウス繊維芽細胞 (MEF) 及びヒトの RPE 細胞株である ARPE-19 細胞に H_2O_2 を添加することで酸化ストレスによる細胞老化を誘導した。老化マーカーとして p21、p16、SA- β galactosidase 活性を指標とした。MEF および ARPE-19 細胞において、 H_2O_2 添加による細胞老化に伴い HtrA1 の発現が誘導されることを定量的 RT-PCR とウェスタンブロット法で証明した。ARPE-19 細胞では t-BH やヒドロキノンによる酸化ストレスや UV 照射も HtrA1 の発現を誘導した。HtrA1 ノックアウトマウスから単離した HtrA1^{-/-}MEF とヘテロマウスからの HtrA1^{+/-}MEF の細胞老化について検討したところ、HtrA1^{-/-}MEF は HtrA1^{+/-}MEF に比べ細胞老化が起こりにくかった。しかし、酸化ストレスにより誘導される細胞死に対しては HtrA1^{+/-}MEF の方が高い抵抗性を示した。ARPE-19 細胞と MEF に HtrA1 発現ベクターを導入して一過的に HtrA1 の発現を増加させた後に H_2O_2 添加により細胞老化を誘導すると老化がより促進された。しかし、プロテアーゼ活性を持たない変異型である S328A HtrA1 は老化を促進しないことから、細胞老化の促進はプロテアーゼ活性に依存することを示した。さらに、野生型リコンビナント HtrA1 蛋白質の添加によっても細胞老化が促進され、HtrA1 は細胞の外から作用することを示した。最後に、HtrA1 による細胞老化の促進は p38 MAPK を活性化し、p38 MAPK 阻害剤により阻害されることから、p38 MAPK 経路を介していることを明らかにした。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Supanji

HtrA1 遺伝子は、Complement Factor H (CFH) 遺伝子とともに、加齢黄斑変性 (AMD) と最も強い相関を示す遺伝子の一つである。AMD の発症にリンクした HtrA1 遺伝子プロモーター領域の SNP は、網膜色素上皮 (RPE) 細胞で HtrA1 の発現を上昇させる。また、AMD の病変部では HtrA1 蛋白質が沈着し、HtrA1 を RPE 細胞で過剰発現させたトランスジェニックマウスは AMD 様の異常を示す。このことから、RPE 細胞での HtrA1 の発現上昇が AMD 発症に関与することが示唆されている。しかし、HtrA1 の発現の増加が RPE 細胞に対してどのような作用を持つかについては不明であった。AMD は酸化ストレスで誘導されるが、哺乳類の HtrA1 が酸化ストレスや細胞老化の過程でどのような機能を持つか報告は少ない。

申請者は、「RPE 細胞では酸化ストレスが HtrA1 の発現を誘導し、誘導された HtrA1 が RPE 細胞の老化を促進する」との仮説を立て、所属する研究室で樹立された HtrA1 遺伝子ノックアウトマウスから調製した胎児性繊維芽細胞 (MEF) とヒトの RPE 細胞株である ARPE-19 細胞を活用して、この仮説を検証した。

申請者はまず、ARPE-19 細胞と MEF において H₂O₂ 添加による酸化ストレスを与えたところ、誘導される細胞老化に伴って HtrA1 の発現が増加することを示した。また ARPE-19 細胞では t-BH やヒドロキノンによる酸化ストレスや UV 照射によっても HtrA1 の発現が mRNA レベルと蛋白質レベルの両方で誘導され、哺乳類の HtrA1 も種々のストレスに応答することを明らかにした。一方、リソソーム阻害剤で網膜毒性を持つクロロキンは HtrA1 を誘導しなかった。次に HtrA1 ノックアウトマウス、ヘテロマウス、および野生型マウスから単離した MEF を用いて、酸化ストレスで誘導される細胞老化と細胞死と HtrA1 遺伝子量について検討し、HtrA1 は細胞死を抑制するが細胞老化は促進する作用を持つことを示した。さらに、ARPE-19 細胞と MEF 細胞において HtrA1 の一過性過剰発現やリコンビナント HtrA1 の添加は細胞老化を促進するが、その活性にはプロテアーゼ活性が必須であることを示した。最後に、細胞老化を促進する HtrA1 の活性には p38 MAPK を介するシグナル伝達系が関与していることを明らかにした。

以上のように、本論文は、AMD にリンクした HtrA1 遺伝子の SNP と酸化ストレスが相加的に HtrA1 遺伝子の発現を上昇させ、RPE 細胞の老化を促進することが AMD の病態形成メカニズムの一つであることを提唱し、AMD の発症の理解に新たな知見を加えたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。