

氏名	關谷 由美子		
学位の種類	博 士 (生物科学)		
学位記番号	博 甲 第 7746 号		
学位授与年月日	平成 28年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on miRNAs-mediated Action Mechanisms of Type I Interferon for Hepatic Stellate Cell (I型インターフェロンの肝星細胞に対するmiRNAを介した作用メカニズムに関する研究)		
主査	筑波大学教授	博士 (理学)	中田 和人
副査	筑波大学教授	理学博士	沼田 治
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	桑山 秀一
副査	筑波大学准教授 (連携大学院)	博士 (理学)	栗崎 晃

論 文 の 要 旨

肝線維化は、傷害刺激により炎症が慢性的に起こった結果、組織修復のバランスが破綻し、コラーゲンなどの細胞外基質が過剰に産生・蓄積する現象であり、ウイルス性慢性肝炎、アルコール性肝炎、および非アルコール性脂肪性肝炎などの肝臓で認められる。肝臓を構成する細胞の一つである肝星細胞は、肝傷害が起こると活性化と呼ばれる分化転換を起こし、筋線維芽細胞様の形態を呈する。活性化星細胞は、増殖刺激に応じて活発に増殖するとともに、コラーゲン等の細胞外基質を過剰産生することから、肝線維化の責任細胞と認識されている。インターフェロン (IFN) - α およびIFN- β のI型IFN製剤は、ウイルス排除を目的としてB型およびC型ウイルス性慢性肝炎の治療薬として広く用いられている。近年、肝炎ウイルスによらない肝線維化モデル動物において線維化進展を抑制するといった報告や、肝星細胞の活性化、細胞増殖およびコラーゲン産生を抑制するといった報告もなされ、IFNがウイルス排除ではなく、肝星細胞に直接作用し肝線維化を抑制する可能性が示されている。一方、マイクロRNA (miRNA) はターゲット分子の発現を調節する20-25塩基のノンコーディングRNAである。IFNがmiRNAの発現調節を介してC型肝炎ウイルスの肝細胞への感染および複製を抑制することが報告された。また、IFNがmiR-29b発現を誘導し、活性化肝星細胞の特徴であるコラーゲン発現を抑制することが明らかとなっている。そこで本研究では、細胞外基質産生以外の肝星細胞の特徴である活性化および細胞増殖へのmiR-29bの関与について、またIFNにより調節される新規のmiRNAとしてmiR-195に着目し、肝星細胞増殖への関与について検討した。

1. miR-29bの肝星細胞活性化および細胞増殖に対する作用

初代肝星細胞を用いた検討の結果、培養日数の増加に伴い活性化のマーカーである α -SMAの発現および細胞増殖に係るPDGFR- β の発現が増加すること、またmiR-29b発現が減少することを確認した。したがって、miR-29bが細胞外基質産生以外に、肝星細胞の活性化および細胞増殖

にも関与している可能性が考えられ、さらに検討を行った。初代肝星細胞にmiR-29bを過剰発現させた結果、 α -SMA発現の培養に伴う増加が抑制された。また、培養日数の増加、即ち活性化に伴い、初代肝星細胞は細胞体が広がった形態へ変化するが、miR-29b過剰発現により形態変化も抑制された。以上より、miR-29bの発現誘導により肝星細胞の活性化は抑制されることが明らかとなった。次に、細胞増殖への関与を検討した。肝星細胞株LX-2細胞にmiR-29bを過剰発現させると、細胞増殖は抑制された。また、初代肝星細胞では培養に伴いPDGFR- β 発現が増加したことからPDGFシグナルの増加が細胞増殖能の獲得に寄与していると考えられた。そこで、初代肝星細胞にmiR-29bを過剰発現させ、さらにPDGF-BBを添加した結果、PDGF-BBによる細胞増殖はmiR-29b過剰発現により抑制された。以上より、miR-29bの発現誘導により肝星細胞の増殖が抑制されることが明らかとなった。

2. IFNのmiR-195発現調節を介した肝星細胞増殖に対する作用

初代肝星細胞において、培養日数の増加に伴ってmiR-195発現の減少およびcyclin E1発現の増加を確認した。miR-195は肺癌細胞でcyclin E1やCDK6発現を調節し細胞増殖を抑制しているとの報告がなされていたことから、肝星細胞の増殖にもmiR-195が関与している可能性が考えられた。肝星細胞株LX-2細胞にIFN- α およびIFN- β を添加し培養すると、細胞増殖は抑制された。細胞周期についてフローサイトメトリーによる解析を行った結果、IFN- α およびIFN- β はともに細胞周期のG1期からS期への移行およびS期の進行を抑制することが明らかとなった。なお、細胞増殖および細胞周期に対する作用はIFN- β の方がIFN- α よりも強かったため、以降の検討ではIFN- β を用いた。IFN- β の細胞周期のG1期からS期への移行およびS期の進行に関与する分子の遺伝子発現に対する作用を検討した結果、IFN- β の細胞周期進行抑制作用にはcyclin E1発現の抑制およびp21発現の誘導が関与していると考えられた。また、IFN- β はLX-2細胞において、miR-195発現を誘導した。したがって、IFNの肝星細胞増殖抑制作用に、miR-195発現誘導を介した細胞周期関連分子の発現調節が関与していると考えられた。そこで、IFNにより誘導された状態と同様の状態にするためにmiR-195をLX-2細胞に過剰発現させた。その結果、細胞周期関連分子のうちcyclin E1発現は抑制され、p21発現は誘導された。さらに、miR-195の過剰発現により、LX-2細胞増殖も抑制された。したがって、miR-195はcyclin E1の発現抑制およびp21の発現誘導を介して肝星細胞増殖を抑制していると考えられた。なお、データベース検索から、miR-195の予測結合部位がcyclin E1の3' UTRに存在することを確認したが、p21の3' UTRには確認できなかった。そこで、IFN- β のcyclin E1発現抑制作用に対するmiR-195の関与について検証するために、miR-195 inhibitorを用いた検討を行った。その結果、miR-195 inhibitorによりmiR-195機能を抑制すると、IFN- β によるcyclin E1発現に対する抑制作用は阻害されることが明らかとなった。

審 査 の 要 旨

本研究では、I型インターフェロンによる肝星細胞の活性化および細胞増殖の抑制において、マイクロRNA miR-29bが作用することを見出し、さらに、I型インターフェロンによって誘導される新規マイクロRNAとしてmiR-195を同定し、このmiR-195が肝星細胞の増殖を抑制するという新たな機構も明らかにしている。本研究は、肝線維化の抑制にマイクロRNAが関与することを実験的に立証している点が極めて独創的であり、学問的な価値が高い。また、特定のマイクロRNA (miR-29bとmiR-195)が、重症肝疾患 (肝炎、肝硬変、肝がん)の原因となる肝線維化の治療ターゲットになることを提案した点は優れた生物科学的な研究成果であると評価された。

平成28年2月1日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (生物科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。