

氏名	徐 曉 鶴
学位論文題目	Upregulation of multiple signaling pathways by Dock5 deletion in epithelial cells (上皮細胞での Dock5 の欠失による複数の細胞内信号伝達経路の活性化)

## 学位論文内容の要旨

### 研究目的

Rupture of lens cataract (RLC)は、生後 45~100 日齢にレンズ後極の破裂により眼の白濁を来す希なマウスの系統である。これまでの研究から、RLC マウスではレンズ上皮細胞に由来するレンズ線維細胞の変性が示された。さらに最近、RLC マウスの責任遺伝子の研究から、低分子量 G 蛋白 Rac1 の活性化因子である Dock5 遺伝子の 27bp の欠失による Dock5 蛋白欠損が報告された。しかし、レンズ上皮細胞の機能異常によるレンズ線維細胞の変性やレンズ被膜の破裂に関わる分子機構は未知である。本研究は、RLC マウスにおける Dock5 蛋白欠損が特有の形態的变化にいたる細胞内シグナル伝達機構の解明を目的とした。

### 実験方法

眼球の形態的变化が出現する前の生後 3 週齢の RLC マウスと対照群として野生型 BALB/c マウスを用いた。マウス眼球からレンズ上皮細胞を単離・培養し、total RNA を抽出し、Affymetrix 社製 GeneChip を用いマイクロアレイ解析を行った。野生型マウスと比較し RLC マウスで 1.5 倍以上の発現変動のある遺伝子群を選別し、その正当性を real time RT-PCR 法で検証し、Ingenuity Pathway Analysis に応用することで Dock5 欠損によりレンズ上皮細胞内で変化するシグナル伝達経路の予測を行った。最も予測値の高い経路で主要な役割を演じることが推定される extracellular signal regulating kinase (Erk)に関し、RLC マウスとその対象群ならびに Dock5 遺伝子欠損マウスとその野生型マウスから抽出された眼球のホルマリン固定・パラフィン包埋切片を用い、活性型リン酸化 Erk の局在と発現の半定量解析を免疫染色により行った。さらに、培養イヌ上皮細胞 MDCK 細胞を用い、予測値上位の 3 経路で主要な役割を演じると推測される分子 Erk, Akt, NF  $\kappa$   $\beta$  に関し、Dock5 に対する選択的阻害薬 N-(3,5-dichlorophenyl) benzenesulfonamide (以下 C21 と略す)処理による各分子の活性化の有無を、特異的リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法で定量解析した。

### 実験成績

マイクロアレイ解析で、BALB/c マウスと比較して RLC マウスにおいて 1.5 倍以上発現変動した 149 遺伝子が示された。うち 93 遺伝子は発現上昇、56 遺伝子は発現低下してい

た。これら遺伝子から選別された代表的6遺伝子の real time RT-PCR 法による発現とマイクロアレイ法の発現との相関が示された。これら遺伝子発現変動情報の Ingenuity Pathway Analysis を用いた解析により、有意に変動する10の標準的パスウェイが示されるとともに、遺伝子の機能や関連する疾患などの情報に基づく”Ontology analysis”により“Antimicrobial response”, “Inflammatory response”, “Dermatological diseases and conditions”をはじめとする26のオントロジーが抽出された。さらにRLCマウスで影響を受ける10の生体機能・疾患に関連するネットワーク群が抽出された。

“Antimicrobial Response, Inflammatory Response, Dermatological Diseases and Conditions”, “Lipid Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry”, “Endocrine System Disorders, Gastrointestinal Disease, Metabolic Disease”の3つの経路が上位を占めた。

RLCマウスのレンズ上皮細胞で変動が予測されるこれらのネットワーク群が、実際にDock5の欠損によって変化するかを検証するために、“Antimicrobial Response, Inflammatory Response, Dermatological Diseases and Conditions”のネットワークマップを構成する遺伝子群の中でErkが中心となっていることに着目した。生後3週齢のマウスの眼球における活性化Erkの発現の抗リン酸化Erk抗体を用いた免疫染色による検討で、野生型マウスではレンズ赤道面の上皮細胞で陽性を示すが、RLCマウスでは同部の陽性細胞数の有意な増加を認めた。さらに、Dock5遺伝子欠損マウスにおいても野生型と比較しレンズ赤道面におけるリン酸化Erk陽性細胞の数の増加を認めた。

次に、Dock5欠損によるErkのリン酸化による活性化の検証を、Dock5の選択的阻害薬D21を用いた。マウス由来のレンズ上皮培養細胞ではC21処理によるErkのリン酸化状態の有意な変動は得られなかった。この理由として、マウスレンズ上皮培養細胞細胞はE-Cadherinの発現量が検出限界以下であり、既に上皮としての性格を失っているためと考えられた。そこで汎用されているイヌ尿細管由来のMDCK細胞を用いC21処理によるErkのリン酸化状態をウエスタンブロット法で解析したところ、処理後48時間でリン酸化Erkの有意な上昇を認めた。

同様に、“Lipid Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry”, “Endocrine System Disorders, Gastrointestinal Disease, Metabolic Disease”のネットワークの中核を占めるAktおよびNF $\kappa$ Bに着目し検討した。これらの蛋白質群はリン酸化によって機能が制御される。MDCK細胞の48時間C21処理により、これら蛋白質群のリン酸化の上昇が観察された。

## 総括および結論

本研究結果より、Dock5を欠損したマウスレンズ上皮細胞、特にレンズ赤道面のgenerator cellでは、Ingenuity Pathway Analysisで選別・予想された信号伝達経路が変化を来し、さまざまな蛋白質群の発現変動が生じることが示唆された。変動する蛋白質群のなかには、細胞外に放出される増殖因子群やサイトカインなども含まれており、それらの受容体を持つ細胞内において信号伝達の変化が誘導されると考えられた。レンズ赤道面のレンズ上皮細胞においてリン酸化Erkが上昇していることが示唆されたが、どの蛋白質群がそれを担うのかの同定にまでは至らなかった。本研究では変動を受ける複数の

ネットワーク群が予想されたことや、Dock5 が欠損して、マウスでは3週間、培養細胞では48時間としばらく時間が経過してからの変化であることから、一つの分子が変動するというよりは、Dock5 が上皮細胞において発現を制御する複数の遺伝子群が存在し、それらが変動することで、レンズ線維細胞の形態と機能に影響を及ぼす経路が変動するというモデルを提唱することが出来た。