

平成 30 年 8 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10872

研究課題名(和文) 房水生理活性物質の相互作用による緑内障発症機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of glaucoma pathogenesis based on molecular signalings of TGF-beta and IL-6-mediated trans-signaling

研究代表者

井上 みゆき (Inoue, Miyuki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任助教

研究者番号：20631766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は緑内障発症に関わる房水流出調節機序を解明するため、緑内障患者房水で高値のTGF- β 2とTGF- β 1に誘導されるサイトカインとの相互作用を検討した。線維柱帯細胞にてTGF- β 2刺激によりIL-6が誘導され、さらに緑内障患者房水内においてIL-6、sIL-6Rの産生が認められた。我々の研究にてTGF- β 2はアクチン重合や α -SMAを誘導し、線維柱帯細胞の線維化を生じさせたが、IL-6とsIL-6Rを同時刺激によりTGF- β シグナルを抑え、線維化を抑制した。さらにIL-6シグナル下流のSTAT3ノックダウンにより抑制効果は解除され、これら相互作用が房水流出調節に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the regulatory mechanisms of aqueous outflow, we assessed the crosstalk between TGF- β 2 and proinflammatory cytokines in human trabecular meshwork cells, because those levels in aqueous humor were elevated in glaucoma patients. We examined the effect of TGF- β 2 and IL-6 signals on the expression of actin polymerization, α -SMA and TGF- β signals. We confirmed IL-6 production induced by TGF- β 2 in HTM cells, and production of IL-6 and soluble IL-6 receptor in aqueous outflow of glaucoma patients. We examined that the crosstalk between TGF- β and IL-6 signals may relate to the regulation of aqueous outflow. TGF- β 2 induced actin polymerization, α -SMA production and activation of TGF- β 2 signals. However, these effects were inhibited by treatment with IL-6/sIL-6R. Furthermore, knockdown of STAT3 is downstream of IL-6 signals inhibited the effects. These data suggests that the crosstalk between TGF- β 2 and IL-6/sIL-6R signals may relate to the regulation of aqueous outflow.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 線維柱帯細胞 TGF- β 2 IL-6 soluble IL-6 receptor

1. 研究開始当初の背景

緑内障は世界で約 6-8 千万人が罹患し (Quigley and Broman. *Br J Ophthalmol* 2006) 我が国においても 40 歳以上の緑内障有病率は約 5%と高率で (Iwase et al. *Ophthalmology* 2004) 失明原因の上位を占める。緑内障の最大の危険因子である眼圧上昇は房水流出抵抗上昇が主な原因であるが、その主座は線維柱帯・シュレム管経路の異常にあると考えられている。したがって線維柱帯細胞およびシュレム管内皮細胞における房水流出調節メカニズムを解明することは緑内障治療において重要な意味を持つ。房水中に含まれる生理活性物質のうち、TGF- β 2、炎症性サイトカインの濃度は緑内障患者において非緑内障患者と比較して高値であることが申請者の研究室から報告されており (Inatani et al. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001; Inoue et al. *J Cat Refract Surg* 2012) これらの物質が線維柱帯細胞、シュレム管内皮細胞に作用し、房水流出抵抗を変化させることを申請者らは見出している (Tsuboi et al. *IOVS* 2012) 。したがって生理活性物質が房水流出路に及ぼす影響が緑内障病態に重要であり、単独の生理活性物質が線維柱帯細胞やシュレム管内皮細胞に与える影響についてはこれまで多く検討されている。例えば TGF- β 2 は Rho-ROCK シグナルを介し線維柱帯細胞に作用し、アクチン重合や細胞外マトリックス産生を促すことで房水流出抵抗を上昇させる作用がある (Li et al. *IOVS* 1998; Gottanka et al. *IOVS* 2004) 。本庄らのグループ及び申請者らの研究室では ROCK 阻害剤が線維柱帯細胞およびシュレム管内皮細胞に作用し房水流出率を上昇させることを明らかにしている (Honjo et al. *IOVS* 2001; Kameda et al. *IOVS* 2012) 。申請者も TGF- β 2 により産生誘導される型コラーゲンを ROCK 阻害剤と酸化ストレスに関連している p38 の阻害剤が抑制していることを見出した (Inoue-Mochita et al. *PLOS ONE* 2015) 。また TGF- β シグナルは他臓器の細胞においては線維化を生じさせ、さらに癌細胞においては正常細胞から筋線維化細胞に変化することにより増殖能や転移を促進することが知られている。よって、線維柱帯細胞においても TGF- β 2 によって筋線維化を生じさせ房水流出調節に影響を及ぼしている可能性も考えられる。このように TGF- β 2 や複数の生理活性物質が生体の房水において協調的に作用し、房水流出調節に影響を及ぼしている可能性が示唆される。線維柱帯細胞におけるシグナル間のクロストークを解析することでより生体に近い環境を再現することが可能と考えられ、緑内障病態を理解するにあたって房水中生理活性物質の相互作用を解析することが重要な意義を持つと考えられる。

2. 研究の目的

近年、緑内障危険因子である眼圧上昇に影響

する因子として、緑内障房水中の TGF- β 2 とサイトカインの濃度が非緑内障房水と比較して高値であることが報告されている。しかし、房水流出調節における両者の相互作用については不明である。本研究の目的はこれまで未解明であった包括的・総体的な房水生理活性物質の作用に着目し、これらの相互作用が房水流出路に与える影響を生体に近い環境で解析することである。本研究によって新たな緑内障病態の知見が得られ、当研究室に蓄積されたデータと組み合わせることで将来的な緑内障治療のシーズを見出す端緒となることが期待される。

3. 研究の方法

ヒト線維柱帯細胞はアメリカ ScienCell 社より購入した。ヒト線維柱帯細胞において TGF- β 2 によって誘導されるサイトカイン分泌および緑内障患者房水を用いたサイトカイン IL-6、soluble IL-6 receptor (sIL-6R) 量は multiplex immunoassay によって定量した。ヒト線維柱帯細胞において TGF- β 2 単独刺激、または TGF- β 2 と IL-6/sIL-6R 共刺激後のアクチン重合、 α -SMA のタンパク発現は Western blot 法を用いて調べた。さらに細胞内のアクチン重合はファロイジンを用いて染色し、STAT3 の核移行については抗 STAT3 リン酸化抗体を用いて免疫染色を行った。また TGF β 型レセプターの mRNA の発現変化については real-time RT-PCR を用いて、Smad の転写活性化の検討についてはルシフェラーゼアッセイ法を用いて検討を行った。TGF- β シグナルの下流への影響については、Smad2、p38、ERK のリン酸化抗体を用いて Western blot 法によって調べた。さらに TGF- β シグナルと IL-6 シグナルのクロストークを調べるため、siRNA 法を用いて STAT3 のノックダウンを *in vitro* で行い、シグナルに関わる抗体を用いて Western blot 法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 緑内障患者房水における IL-6 および可溶性 IL-6 レセプター (sIL-6R) の産生

ヒト線維柱帯細胞内において TGF- β 2 刺激により IL-6 産生が有意に上昇していることを示した (図 1.D) 。さらに申請者は非緑内障患者房水、緑内障患者房水内における IL-6、sIL-6R 産生について調べた。その結果、緑内障患者房水内において、sIL-6R 産生が非緑内障患者房水と比較して有意に増加していることを見出した。緑内障患者房水内において IL-6 と sIL-6R 間の相関について調べたが、IL-6 と sIL-6R 間における相関はみられなかった。以上の結果から sIL-6R が緑内障患者房水において産生されており、病態に影響を及ぼしている可能性が示唆された (図 1.A,B,C) 。

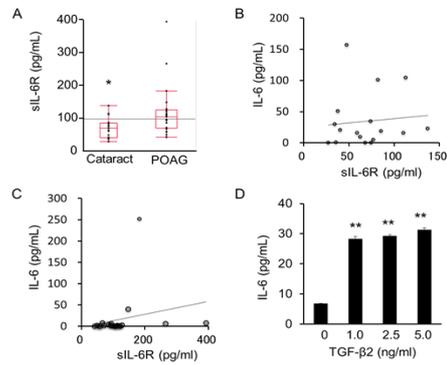
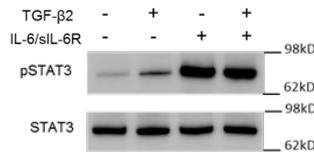


図1. 非緑内障患者と緑内障患者房水内 sIL-6R 量 (A,B,C)とヒト線維柱帯細胞内における TGF-β2 刺激によって誘導された IL-6 量について

次にヒト線維柱帯細胞において IL-6/sIL-6R によって下流の転写因子 STAT3 を活性化しているかを調べるため、STAT3 のリン酸化および細胞内局在を検討した。その結果、IL-6/sIL-6R で刺激した細胞内において STAT3 のリン酸化が確認され、TGF-β2 との共刺激においても STAT3 のリン酸化がコントロールと比較し有意に上昇していることが明らかになった。また STAT3 の核移行についても IL-6/sIL-6R 刺激後に核内でリン酸化されていることが確認できた。この結果から、ヒト線維柱帯細胞においても STAT3 が IL-6/sIL-6R 刺激により活性化されることが明らかになった。



(2) TGF-β2 下流シグナルに対する IL-6/sIL-6R の影響

次に申請者はヒト線維柱帯細胞を用いて、TGF-β2 の効果に対する IL-6/sIL-6R シグナルの影響を検討するため、TGF-β2 単独刺激および TGF-β2、IL-6/sIL-6R 共刺激をし、線維化マーカーである α-SMA 発現とアクチン重合に関わるシグナルの一つである Myocin Light Chain 2 (MLC2) のリン酸化の変化について調べた。その結果、TGF-β2 単独刺激にて SMA 発現および MLC2 リン酸化が上昇したのに対して、IL-6/sIL-6R の同時刺激されたことによりその効果は有意に抑制された (図2)。さらに TGF-β シグナル下流で

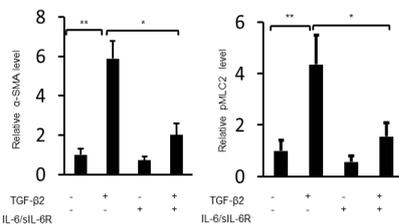


図2. TGF-β2 刺激による SMA および pMLC2 リン酸化に対する IL-6/sIL-6R の影響

活性化する転写因子 Smad2 および p38 リン酸化についても検討した。Smad2、p38 のリン酸化についても TGF-β2 単独刺激に対して IL-6/sIL-6R 共刺激による抑制効果が認められた (図3)。また Smad の転写活性化についてルシフェラーゼアッセイを用い調べた結果、転写活性化についても TGF-β2 単独刺激に対して IL-6/sIL-6R 共刺激の抑制効果が認められた。

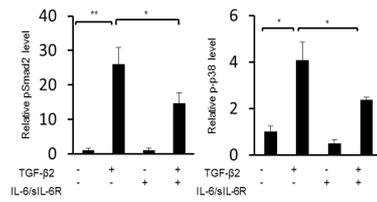


図3. TGF-β2 刺激による Smad2、p38 リン酸化に対する IL-6/sIL-6R の影響

以上の結果から、線維柱帯細胞において、TGF-β シグナルによる筋線維化およびアクチン重合といった細胞変化に対して、IL-6/sIL-6R を介したシグナルが抑制的な影響を及ぼしていることが示唆された。

(3) 転写因子 STAT3 ノックダウンによる TGF-β2 シグナルへの影響

次に申請者は IL-6 シグナルによって活性化される転写因子 STAT3 が TGF-β シグナルに対する IL-6/sIL-6R による抑制効果に関与しているかどうかを検討した。ヒト線維柱帯細胞において siRNA 法を用い STAT3 をノックダウンし、6 時間後、12 時間後、24 時間後の SMA 発現レベル、Smad2、Smad3、p38、ERK リン酸化について Western blot 法にて調べた。その結果、刺激 6 時間後、12 時間後において、これまで確認されていた TGF-β2 刺激に対しての IL-6/sIL-6R による抑制効果が解除されていた (図4)。MLC2 リン酸化に関してはその効果は弱かった。24 時間後に関しては、SMA 発現のみが有意に抑制効果の解除が確認された。siRNA の実験においては 24 時間後において TGF-β2 単独刺激で Smad2、Smad3、p38、ERK リン酸化において抑制効果は確認できなかったが、STAT3 ノックダウンによってリン酸化の上昇がみられた。

以上の結果から STAT3 が TGF-β2 シグナルと IL-6/sIL-6R の相互作用に関与していることが示唆された。

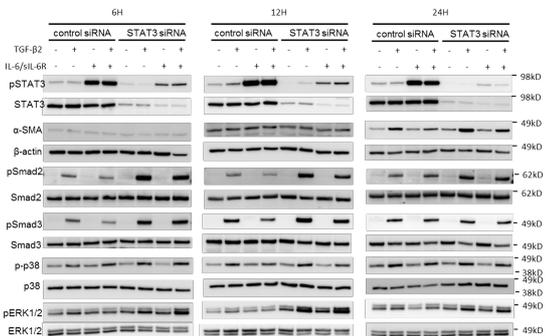


図4. TGF-β2 刺激に対する IL-6/sIL-6R による抑制効果における STAT3 の影響について

(4) TGF-βレセプターに対するIL-6/sIL-6Rの影響

TGFβレセプターの mRNA 発現に対する IL-6/sIL-6R の影響について検討した。Real-time RT-PCR を行った結果、TGF-β2 単独刺激で発現上昇した TGFβRI、TGFβRII の発現が IL-6/sIL-6R との共刺激により有意に抑制されることが明らかになった。さらに Smad のリポーターアッセイを用いて TGFβRI、TGFβRII cDNA プラスミドを単独および共発現させ、IL-6/sIL-6R の影響について調べたところ、それぞれ単独発現では IL-6/sIL-6R 共刺激によっても転写活性化の抑制効果が認められたが、両者同時に発現させたところ抑制効果は見られなかった。この結果より、TGFβRI、TGFβRII に対しても直接的に IL-6/sIL-6R のシグナルが影響を及ぼしていることが示唆された。

以上の結果より、房水内において産生される生理活性物質が線維柱帯細胞内にて相互作用し、TGF-βシグナルやIL-6シグナルを介し、アクチン重合や筋線維化に影響を及ぼしていることが明らかになった。これらのシグナルの相互作用が房水流出調節のメカニズムの解明に寄与できると考えており、さらに房水流出調節に関わっているとされるシュレム管内皮細胞に対しても影響を及ぼしていることも考えられる。シュレム管内皮細胞に関しても今後さらに検討していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1) Miyuki Inoue-Mochita, Toshihiro Inoue, Sachi Kojima, Akiko Futakuchi, Tomokazu Fujimoto, Saori Sato-Ohira, Utako Tsutsumi, Hidenobu Tanihara.
Interleukin-6-mediated trans-signaling inhibits transforming growth factor-β signaling in trabecular meshwork cells.
Journal of Biological Chemistry, in press 2018.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 みゆき (Inoue Miyuki)
熊本大学大学院生命科学研究部
特任助教
研究者番号：20631766

(2)研究分担者

1)井上 俊洋 (Inoue Toshihiro)
熊本大学医学部附属病院
講師
研究者番号：00317025

2)谷原 秀信 (Tanihara Hidenobu)
熊本大学大学院生命科学研究部
教授
研究者番号:60217148

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()