

令和元年6月11日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11289

研究課題名(和文)線維柱帯細胞の貪食作用に対する生理活性物質の影響とその調節機構の解明

研究課題名(英文)The effects of bioactive molecules on phagocytosis and the elucidation of phagocytic mechanisms in trabecular meshwork cells.

研究代表者

藤本 智和 (Fujimoto, Tomokazu)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：50756426

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)：線維柱帯細胞の貪食能におけるRho-ROCKシグナルの関与について検討を行った。Rho-ROCKシグナルを活性化させるリソフォスファチジン酸(LPA)やcalpeptinで刺激した線維柱帯細胞は濃度依存的に貪食能が有意に低下した。LPAやcalpeptinによる貪食能の低下は、Rho阻害剤の添加により抑制され、さらにsiRNAを用いたRhoAのノックダウンでも抑制されることが示された。さらにROCK阻害剤であるY-27632はLPAによる貪食抑制を回復させる効果があることが確認された。このように、線維柱帯細胞ではRho-ROCKシグナルの活性化により貪食が負に調節されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線維柱帯細胞は眼圧調節において重要な働きをしていると考えられており、その機能解析は眼圧調節機構の理解に極めて重要な意味を持つ。その線維柱帯細胞が持つ機能の一つとして貪食能がある。これは房水の眼外への排出路となっている線維柱帯組織の恒常性維持に重要な作用である。今回の我々の研究では、線維柱帯細胞の貪食能に対して、Rho-ROCKシグナルの活性化が負の制御を示すことを明らかにした。ROCK阻害剤は既に眼圧下降剤として臨床で使用されている。我々の結果は臨床で使用されている薬剤により線維柱帯の機能改善が期待できる可能性を示していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate RhoA signaling effects on phagocytosis of trabecular meshwork (TM) cells. Rho activators, such as lysophosphatidic acid (LPA) and calpeptin, decreased phagocytic activity on TM cells. By contrast, Rho inhibitor suppressed the effects of LPA and calpeptin on phagocytosis. The knockdown of RhoA suppressed the effect of LPA on phagocytosis in TM cells. Moreover, ROCK inhibitor suppressed the effect of LPA on phagocytosis in TM cells. These results suggest that the RhoA signal pathway may regulate the phagocytic function in TM cells.

研究分野：薬理学、生理学、眼科疾患、緑内障

キーワード：貪食能 線維柱帯細胞 Rho ROCK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障は我が国において中途失明原因の第一位の疾患であり、世界的にも失明原因の上位を占める疾患である。そのため、病態解明および有効な治療法の開発は社会的急務である。現在の緑内障治療法は薬剤投与ならびに手術により眼圧を下降させることが唯一の手段である。眼圧は房水の産生と流出のバランスにより維持されているが、緑内障において眼圧上昇の原因となるのは主に流出量の低下である。ヒトにおける房水流出量のおよそ 80% は房水排出の主経路である線維柱帯・シュレム管経路より排出される。これまでの研究から、線維柱帯は細胞外マトリックスの産生や分解、貪食作用による異物の除去を行うことで房水流出路の維持に寄与していると考えられている。緑内障患者の線維柱帯組織では細胞外マトリックスの異常蓄積や、線維柱帯細胞数の減少などの構造的異常が確認されており、組織学的に見ても房水流出抵抗が増加していることが示唆されている。しかし、緑内障の治療薬である眼圧下降剤の作用機序は房水産生抑制および房水流出の副経路と言われるぶどう膜・強膜流出路からの流出増加作用を示すものが主流であった。近年、アクチン細胞骨格の制御因子である Rho-associated kinase (ROCK) の阻害剤が緑内障治療薬として世界で初めて我が国で臨床応用された。ROCK 阻害剤はこれまでの薬剤にはなかった房水流出の主経路を構成する線維柱帯やシュレム管内皮に作用する薬剤である。ROCK 阻害剤は線維柱帯のアクチン細胞骨格の脱重合を促進することで、細胞および組織の弛緩を促し、シュレム管内皮細胞の細胞間接着を弱めることで細胞間の房水流出を促進し、シュレム管腔へと房水を導く作用があることが報告されている。しかし、これまでに ROCK 阻害剤の線維柱帯細胞の貪食への影響について検討した報告は無い。

線維柱帯細胞の貪食に関しては、 α 5 インテグリン-focal adhesion kinase (FAK) シグナルの活性化により貪食能が亢進するとの報告がある。さらに、デキサメサゾン刺激により α 3 インテグリンの発現上昇および活性化レベルの上昇が認められており、 α 3 インテグリンシグナルの活性化が α 5 インテグリン-FAK シグナルを抑制することが示されている。また、マクロファージの研究においてアポトーシス細胞の貪食において Rho ファミリー分子の関与が報告されており、RhoA シグナルの活性化により貪食が抑制され、RhoG シグナルの活性化により貪食が亢進されることが示されている。線維柱帯細胞における Rho ファミリー分子に関する研究はこれまで我々が行ってきた研究分野であるが、貪食との関係についてはこれまで明らかになっていない。

2. 研究の目的

線維柱帯細胞の貪食作用を調節する分子機構を明らかにすることで、線維柱帯細胞の貪食作用が関与する房水流出調節機構の解明を目指す。特に、本研究では Rho-ROCK シグナルと線維柱帯細胞の貪食作用の関係を解明することを目的とし検討を行った。

3. 研究の方法

実験には豚眼より採取、培養した線維柱帯細胞を使用した。細胞培養にはダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に 10% 濃度のウシ血清および抗生物質を加えた培地を使用した。リゾフォスファチジン酸 (LPA) および calpeptin を RhoA 活性化剤として使用した。Rho 阻害剤として C3 トランスフェラーゼ、ROCK 阻害剤として Y-27632 を使用した。RhoA および Rac1 の活性は G-LISA® Rho and Rac1 activation assay kit (Cytoskeleton 社) を使用し測定した。細胞の貪食は、pH 感受性色素の pHrodo で標識した bioparticle (S.aureus) を 2 時間貪食させ、その後セルソーターで細胞内の蛍光強度を測定した。

RhoA のノックダウンは siRNA により実施した。Lipofectamine™ RNAiMAX を使用し RhoA siRNA を細胞内へ導入し、48 時間後に貪食能を評価した。RhoA のノックダウンの可否はウエスタンブロットによる RhoA タンパク発現量により評価した。

デキサメサゾンによる貪食抑制に対する ROCK 阻害剤の効果についても検討を実施した。デキサメサゾン刺激 72 時間後に貪食能を評価し、ROCK 阻害剤である Y-27632 の有無による影響を評価した。

4. 研究成果

LPA および calpeptin による線維柱帯細胞の RhoA の活性化について評価した。10 μ M LPA および 100 μ M calpeptin 添加 30 分および 1 時間後の線維柱帯細胞で有意な RhoA の活性化が認められた。Rac1 の活性についても同様に検討を実施したが、LPA および calpeptin では添加 30 分および 1 時間後で活性化されていないことが確認された。本検討により、LPA および calpeptin はこれまでの報告と同様に、線維柱帯細胞において RhoA を活性化させることが確認できた。

LPA および calpeptin の貪食作用への影響を検討した。RhoA の活性化が認められた 10 μ M LPA および 100 μ M calpeptin 刺激 1 時間後に bioparticle を添加し貪食作用を評価した結果、両薬物ともに有意な貪食低下を示した。この貪食低下と Rho-ROCK シグナルとの関係を調べるため、まず Rho 阻害剤による影響を検討した。LPA による貪食の低下は、Rho 阻害剤により有意に抑制され、calpeptin による貪食低下も Rho 阻害剤添加により一部抑制された。さらに、ROCK 阻害剤である Y-27632 を使用し、LPA の貪食低下に対する影響を検討したところ、LPA と Y-27632 の同時添加により貪食能が LPA を添加していないコントロールと同じレベルとな

り LPA による貪食抑制作用を阻害した。さらに、siRNA による RhoA のノックダウンを行った線維柱帯細胞を使用して LPA 刺激後の貪食作用について検討したところ、コントロール siRNA を導入した細胞では LPA による貪食低下が認められたのに対して、RhoA をノックダウンした細胞では LPA による貪食低下が認められなかった。また、RhoA をノックダウンした細胞の貪食作用はコントロールとの差は認められず、RhoA ノックダウンによる貪食能の増加は認められなかった。

線維柱帯細胞の貪食低下作用が報告されているデキサメサゾンを使用し、ROCK 阻害剤の影響を評価した。デキサメサゾン刺激 72 時間後に貪食作用を評価したところ、既報と同様に有意な貪食の低下が認められた。Y-27632 をデキサメサゾンとともに添加し、72 時間培養後の貪食能を評価したところ、デキサメサゾン単独で認められた貪食低下作用を抑制する結果が得られた。

本研究の結果、Rho-ROCK シグナルの活性化を抑制する Rho 阻害剤や ROCK 阻害剤が、LPA や calpeptin といった Rho 活性化剤による貪食低下を回復させること、RhoA のノックダウンにより LPA の貪食低下作用が認められなくなることから、Rho-ROCK シグナルの活性化が線維柱帯細胞の貪食作用を負に調節していることが強く示唆された。緑内障と関連の深い TGF-

2 は、線維柱帯細胞において RhoA を活性化させることが報告されている。またデキサメサゾンも線維柱帯細胞で RhoA の活性化が認められている。今回の検討では TGF- 2 の貪食作用への影響を直接的に検討することはできなかったが、デキサメサゾンに関しては ROCK 阻害剤により貪食低下作用を抑制する結果を得た。今後、TGF- 2 や他の緑内障関連生理活性物質と線維柱帯細胞の貪食作用検討を進めることで、線維柱帯細胞の貪食作用の低下が緑内障病態に与える影響についての理解が進むと考えられる。また、本研究で使用した ROCK 阻害剤は臨床で使用されている ROCK 阻害剤とは化合物が異なるが、臨床での ROCK 阻害剤の眼圧下降機序の一つとして緑内障患者で低下した貪食作用の回復による房水流出路の抵抗低下が予想される。本研究では、貪食作用も含めた、線維柱帯細胞の機能回復の点から緑内障治療薬の創出の可能性を示すことができたと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Inoue-Mochita M, Inoue T, Kojima S, Futakuchi A, Fujimoto T, Sato-Ohira S, Tsutsumi U, Tanihara H. Interleukin-6-mediated trans-signaling inhibits transforming growth factor- β signaling in trabecular meshwork cells. *J Biol Chem*. 2018;293(28):10975-10984. DOI: 10.1074/jbc.RA118.003298. 査読あり

Fujimoto T, Inoue T, Ohira S, Awai-Kasaoka N, Kameda T, Inoue-Mochita M, Tanihara H. Inhibition of Rho Kinase Induces Antioxidative Molecules and Suppresses Reactive Oxidative Species in Trabecular Meshwork Cells. *J Ophthalmol*. 2017;2017:7598140. DOI: 10.1155/2017/7598140. 査読あり

Fujimoto T, Inoue T, Maki K, Inoue-Mochita M, Tanihara H. Vascular Endothelial Growth Factor-A Increases the Aqueous Humor Outflow Facility. *PLoS One*. 2016;11(9):e0161332. DOI: 10.1371/journal.pone.0161332. 査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

藤本智和、井上俊洋、谷原秀信、線維柱帯細胞における TGF- 2 刺激に対するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の作用の検討、第 29 回日本緑内障学会、2018 年

Fujimoto T, Inoue T, Ohira S, Inoue M, Tanihara H. RhoA activation inhibited phagocytic activity of trabecular meshwork. 13th European Glaucoma Society (EGS) Congress. 2018

藤本智和、井上俊洋、大平さおり、井上みゆき、谷原秀信、線維柱帯細胞における Rho/ROCK シグナル活性化因子および阻害剤の貪食能に対する影響、ConBio2017(生命科学系学会合同年次大会)、2017

Fujimoto T. Steroid-induced alterations in trabecular meshwork. Biennial Meeting of the International Society for Eye Research (ISER). 2016

藤本智和、In vitro および ex vivo の研究手法を用いた経シュレム管流出路研究の実践、第 27 回日本緑内障学会、2016

Fujimoto T, Inoue T, Maki K, Kojima S, Inoue M, Tanihara H. Vascular Endothelial Growth Factor-A Increases Aqueous Humor Outflow Facility. The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学大学院生命科学研究部眼科学講座 研究業績

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/ganka/kyousitu/gyouseki.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：谷原 秀信

ローマ字氏名：(TANIHARA, hidenobu)

所属研究機関名：熊本大学

部局名：医学部附属病院

職名：病院長

研究者番号(8桁)：60217148

研究分担者氏名：井上 俊洋

ローマ字氏名：(INOUE, Toshihiro)

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院生命科学研究部(医)

職名：教授

研究者番号(8桁)：00317025

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。