

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11464

研究課題名(和文) スフィンゴシン1リン酸の眼線維化疾患での上皮間葉系移行への関与解明と新規治療戦略

研究課題名(英文) Development of a novel treatment strategy based on the roles of sphingosine-1-phosphate in EMT-related ocular tissue fibrosis

研究代表者

雑賀 司珠也 (Saika, shizuya)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40254544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞膜スフィンゴ脂質代謝産物のスフィンゴシン・1リン酸(S1P)シグナルが組織線維・瘢痕化で上皮間葉系移行制御に関与しているか否かに着目した。後発白内障モデルとして水晶体穿孔外傷での水晶体上皮細胞のEMTを検討した。同受容体3型欠損マウスでは、EMTマーカーの平滑筋アクチン発現開始が遅延していた。角膜内皮の上皮(内皮)間葉系移行EnMTによる内皮面の線維化を検討した。1規定NaOHでマウス角膜アルカリ外傷を作成すると、角膜内皮細胞のEnMTによって内皮面に線維化病巣が形成された。角膜内皮EnMTと線維化は、野生型マウスとS1P3受容体欠損マウスの間に差異は観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床的に水晶体上皮細胞のEMTは白内障手術で挿入された眼内レンズ周囲の残存水晶体嚢の線維性混濁(後発白内障)による視力低下や眼内レンズの変位の原因である。本研究では後発白内障の発症機序にS1Pシグナルが関与していることが明らかとなった。S1Pシグナル阻害による予防効果が示唆された。一方、角膜内皮細胞のEnMTによる線維性病変の形成は、高度の角膜炎症疾患や炎症に合併する。同病変の形成にはS1PR3シグナルの関与が少ないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on whether the sphingosine monophosphate (S1P) signal, a cell membrane sphingolipid metabolite, is involved in the regulation of epithelial-mesenchymal transition in tissue fibers and scarring. As a model of aftercataract, EMT of lens epithelial cells in lens perforation trauma was examined. In an S1P receptor type 3 deficient mouse, the initiation of smooth muscle actin expression, an EMT marker, was delayed. The endothelium-mesenchymal transition, EnMT, of the corneal endothelium was used to investigate fibrosis of the endothelial surface. When mouse corneal alkaline trauma was created with 1N NaOH, fibrotic lesions were formed on the endothelial surface by EnMT of the endothelial cells. The degree of corneal endothelium EnMT and fibrosis were similar to each other between wild-type and S1P3 receptor-deficient mice.

研究分野：眼科学

キーワード：スフィンゴシン・1リン酸 水晶体上皮細胞 角膜内皮 上皮間葉系移行 線維・瘢痕化 後発白内障 創傷治療 マウス

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、TGF ベータシグナルと他シグナルのクロストークに注目して、眼線維化疾患の新規治療戦略の確立を目的とした研究を展開してきた(1)。例えば、TGF ベータシグナルによって Smad 分子 C 末端リン酸化によるシグナルが活性化されるが、そこに他の増殖因子刺激 (MAK キナーゼ, p38, JNK など) が加わることによって Smad 分子のミドルリンカー領域がリン酸化され、C 末端のリン酸化による遺伝子発現をさらに正または負に調節していることに注目して、線維化研究を行ってきた。具体的には、マウス眼の線維化病変モデルと培養細胞を用い、上皮細胞が間葉系細胞に形質転換し、線維化病変を形成したり、細胞遊走能を増強することが知られている (上皮-間葉系移行: EMT)。我々は自身で Smad2/3 のミドルリンカーリン酸化特異的抗体と各種ウイルスベクターを作成し、研究に用いることで EMT に Smad ミドルリンカー領域のリン酸化がこの正の制御を示すことを解明した。一方、細胞外マトリックス・インテグリンが、TGF ベータシグナルをサポートし、上皮-間葉系移行に関与していることを、テネイシン C、オステオポンチン、ルミカンの 3 種類の遺伝子欠損マウスを用いて解明した。Smad などの TGF ベータシグナルは、炎症や線維・瘢痕疾患や上皮-間葉系移行で中心的役割を担っているにもかかわらず、その制御は極めて複雑であることを情報発信してきた。これらの研究は細胞外界からの刺激に対する受容体を介した制御に焦点を当てたものであるが、本研究課題は細胞内因性の生理活性物質と TGF ベータシグナル・上皮-間葉系移行と眼組織の線維・瘢痕疾患の予防・治療戦略の研究と位置付ける。

本研究課題は、細胞膜の脂質性分から合成されるスフィンゴ脂質代謝産物で、細胞質に蓄積されるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) 由来シグナルが炎症や組織線維・瘢痕化で TGF ベータシグナルと協調し、上皮-間葉系移行制御に関与しているか否かに着目した研究であった。S1P シグナルと MAP キナーゼなどとのクロストークがすでに報告されているので、Smad シグナルでも影響していることは容易に想像できる。S1P は、ABC トランスポーターやスピンスター 2 (Spns2) トランスポーターを通して、細胞外に汲み出され、他の細胞に発現される特異的受容体ファミリーに結合し、その細胞のシグナル伝達を活性化させる。S1P 受容体には複数のサブファミリー (1 から 5 型) が知られている。本研究目的で S1P 受容体 2 (S1PR2) と受容体 3 (S1PR3) のノックアウトマウスを導入した。

本研究では、まず、後発白内障モデルとして申請者の所属で用いている水晶体穿孔外傷での水晶体上皮細胞の EMT を検討した。水晶体は生体内で隔絶した組織なので、周囲の組織からの線維眼細胞の混入なく、in vivo での EMT に関与するシグナルの研究を行うのに適している。他に EMT と線維化形成が病態に関与する眼疾患として、角膜内皮の線維・瘢痕化に注目した。

### 2. 研究の目的

本研究では S1P による TGF ベータシグナルの調節機序解明と、それを標的として、上皮-間葉系移行を基盤とする眼線維化疾患の新規予防・治療戦略の確立を目的とした。具体的には S1PR3 欠損マウスを用いた。S1PR2 欠損マウスは予備的研究で S1PR3 欠損マウスとは異なる表現型である可能性が示唆されたため、S1PR3 欠損マウスでの研究に重点を置き

た。上記の目的について、以下の実験で野生型マウスと S1P3 受容体欠損マウスの表現型を比較した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 水晶体上皮細胞の EMT における S1PR3 遺伝子の影響

水晶体上皮細胞が生体内で隔絶組織であるため、シグナルと上皮-間葉系移行の関係が検討しやすいことを考慮し、後発白内障モデルとして穿孔水晶体外傷後の水晶体上皮の EMT を検討した。代表研究者の既報 (2) に従って、マウス水晶体前嚢に穿孔外傷を作成した。経時的に組織学的、免疫組織科学的に穿孔部周囲の水晶体上皮細胞を観察した。

#### (2) 角膜内皮の上皮 (内皮) -間葉系移行 EnMT による内皮面の線維化

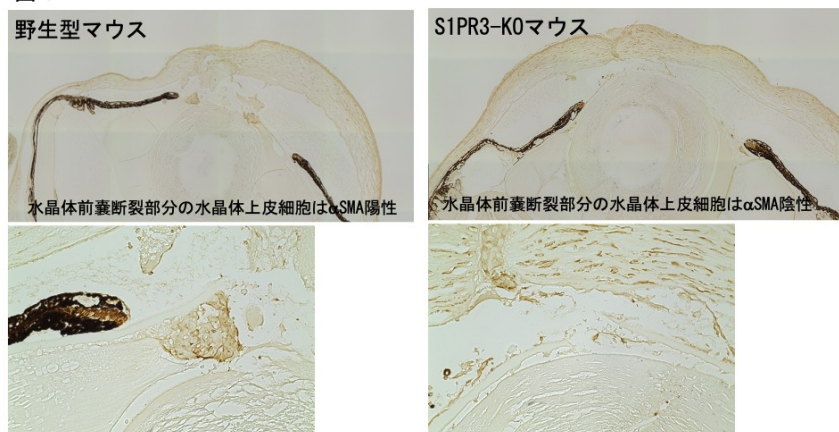
1 規定水酸化ナトリウム 3  $\mu$ L を滴下してマウス角膜アルカリ外傷を作成すると、角膜内皮細胞の間葉系移行によって内皮面に線維・癒痕病巣が形成されることを申請者は報告している (3)。マウスにこれを作成し、組織病理、免疫組織化学を中心に、Smad シグナルと線維・癒痕病巣の程度を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 水晶体上皮細胞の EMT における S1PR3 遺伝子の影響 (図 1)

導入した S1PR2 欠損マウスと S1PR3 欠損マウスを C57BL/6N にバッククロス施行した。研究代表者の既報に準じて水晶体穿孔外傷を作成し、水晶体上皮細胞の上皮-間葉系移行の評価の目的で組織病理と EMT 関連蛋白質を対象とした免疫組織化学的検討を行った。研究代表者は既報で野生型 C57BL/6N マウスにおいて、この障害では 3 日で Samd2/3 の核内移行が始まり、EMT の結果、3 から 5 日以内にアルファ平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞が水晶体内に出現すると報告した。同受容体 3 型欠損マウスでは、免疫組織科学的に EMT が減弱していると思われたものの組織学的、免疫組織化学的に EMT や嚢組織線維化が Smad3 欠損同等に強く抑制されているという所見は得られなかった。しかし、平滑筋アクチン発現開始が遅延していた。同受容体 2 型欠損マウスでは野生型と差異の無い治癒過程であった。白内障・眼内レンズ手術合併症の一つである過剰な嚢収縮による眼内レンズの位置異常が特に予想されるハイリスク症例を対象とした治療戦略において、同受容体 3 型が標的となり得ると考えた。今後は阻害薬を用いた研究が望まれる。

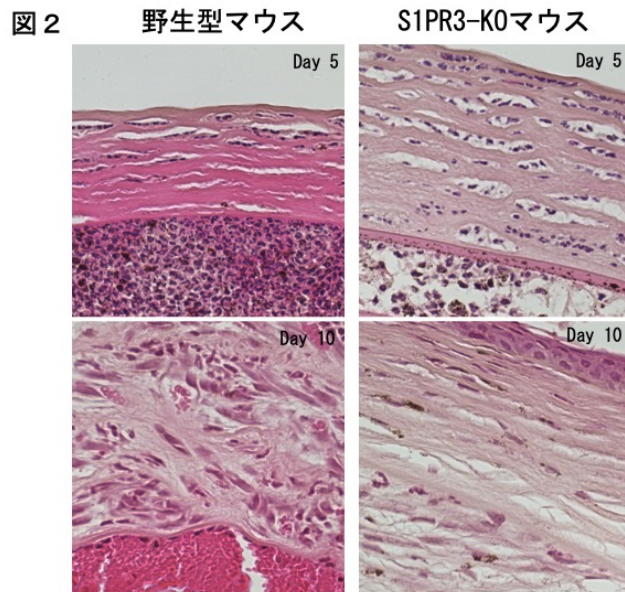
図 1



#### (2) 角膜内皮の上皮 (内皮) -間葉系移行 EnMT による内皮面の線維化 (図 2)

マウス角膜アルカリ外傷 (1 規定水酸化ナトリウム 3  $\mu$ L 点眼) では、角膜上皮の脱落と再

上皮化、実質の炎症とそれに続く線維・瘢痕化、角膜内皮の間葉形移行による線維化が観察されることを以前から報告してきた。観察期間 10 日まででは、角膜内皮面での EnMT と線維化は、野生型マウスと S1PR3 欠損マウスの上に差異は観察されなかった。



臨床的には水晶体上皮細胞の EMT は白内障手術で挿入された眼内レンズ周囲の残存水晶体囊の線維性混濁（後発白内障）の原因である。今研究では後発白内障の発症機序に S1P シグナルが関与していることが明らかとなり、S1P シグナル阻害による予防効果が示唆された。一方、角膜内皮細胞の EnMT による線維性病変の形成は、高度の角膜炎症疾患が外傷に合併するが、同病変の形成には S1PR3 シグナルの関与が少ないことが示唆された。

1. **Saika S**, Yamanaka O, Okada Y, Tanaka S, Miyamoto T, Sumioka T, Kitano A, Shirai K, Ikeda K. TGF beta in fibroproliferative diseases in the eye. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2009 Jun 1;1:376-9

2. **Saika S**, Shirai K, Yamanaka O, Miyazaki K, Okada Y, Kitano A, Flanders KC, Kon S, Uede T, Kao WW, Rittling SR, Denhardt DT, Ohnishi Y. Loss of osteopontin perturbs the epithelial-mesenchymal transition in an injured mouse **lens epithelium**. *Lab Invest*. 2007 Feb;87(2):130-8.

3. Sumioka T, Ikeda K, Okada Y, Yamanaka O, Kitano A, **Saika S**. Inhibitory effect of blocking TGF-beta/Smad signal on injury-induced fibrosis of corneal **endothelium**. *Mol Vis*. 2008;14:2272-81.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kana Ichikawa , Sai-Ichi Tanaka , Masayasu Miyajima , Yuka Okada , Shizuya Saika	4. 巻 10(2)
2. 論文標題 Inhibition of Rho kinase suppresses capsular contraction following lens injury in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Taiwan J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 100-105.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/tjo.tjo_80_19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ai Izutani-Kitano , Yuka Okada , Kana Ichikawa , Peter Sol Reinach , Shizuya Saika	4. 巻 10(2)
2. 論文標題 Alteration of expression pattern of transient receptor potential vanilloid 2 and transient receptor potential vanilloid 3 in ocular surface neoplasm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Taiwan J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 106-110.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/tjo.tjo_12_20.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takada Y, Yamanaka O, Okada Y, Sumioka T, Reinach PS, Saika S.	4. 巻 39(2)
2. 論文標題 Effects of a prostaglandin F2alpha derivative glaucoma drug on EGF expression and E-cadherin expression in a corneal epithelial cell line	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cutan Ocul Toxicol.	6. 最初と最後の頁 75-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15569527.2020.1722152.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shizuya Saika	4. 巻 10(2)
2. 論文標題 Transient receptor potential ion channel family has come on to the front stage in the eye research field	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Taiwan J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 77-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/tjo.tjo_14_20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shingo Yasuda , Takayoshi Sumioka , Hiroki Iwanishi , Yuka Okada , Masayasu Miyajima , Kana Ichikawa , Peter S Reinach , Shizuya Saika	4. 巻 101(2)
2. 論文標題 Loss of sphingosine 1-phosphate receptor 3 gene function impairs injury-induced stromal angiogenesis in mouse cornea	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lab Invest.	6. 最初と最後の頁 245-257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-020-00505-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takada Y, Sumioka T, Ishikawa N, Yasuda S, Komori R, Saika S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Case of Repeating Transient Increase in Intraocular Pressure by Instability of an Intraocular Lens Implanted in the Capsular Bag.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Rep Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 60-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000505597.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kokado M, Miyajima M, Okada Y, Ichikawa K, Yamanaka O, Liu CY, Kao WW, Shou W, Saika S.	4. 巻 98(11)
2. 論文標題 Lack of plakoglobin impairs integrity and wound healing in corneal epithelium in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lab Invest.	6. 最初と最後の頁 1375-1383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-018-0082-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nidegawa-Saitoh Y, Sumioka T, Okada Y, Reinach PS, Flanders KC, Liu CY, Yamanaka O, Kao WW, Saika S.	4. 巻 374(2)
2. 論文標題 Impaired healing of cornea incision injury in a TRPV1-deficient mouse.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 329-338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-018-2878-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okada Y, Sumioka T, Ichikawa K, Sano H, Nambu A, Kobayashi K, Uchida K, Suzuki Y, Tominaga M, Reinach PS, Hirai SI, Jester JV, Miyajima M, Shirai K, Iwanishi H, Kao WW, Liu CY, Saika S.	4. 巻 99(2)
2. 論文標題 Sensory nerve supports epithelial stem cell function in healing of corneal epithelium in mice: the role of trigeminal nerve transient receptor potential vanilloid 4.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lab Invest.	6. 最初と最後の頁 210-230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-018-0118-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Usui-Kusumoto K, Iwanishi H, Ichikawa K, Okada Y, Sumioka T, Miyajima M, Liu CY, Reinach PS, Saika S.	4. 巻 181
2. 論文標題 Suppression of neovascularization in corneal stroma in a TRPA1-null mouse.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exp Eye Res.	6. 最初と最後の頁 90-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2019.01.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森井智也、住岡孝吉、宮嶋正康、望月直樹、雑賀司珠也
2. 発表標題 スフィンゴシン-1-リン酸トランスポーターSpns2ノックアウトマウスでの眼瞼形成不全
3. 学会等名 第121回日本眼科学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	住岡 孝吉  (Sumioka Takayoshi)  (40433362)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授    (24701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	田中 オー  (Tanaka saiichi)  (60316106)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授     (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関