

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09934

研究課題名(和文)線維柱帯細胞とシュレム管内皮細胞の相互作用による房水流出機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of aqueous humor outflow mechanism by interaction between trabecular meshwork cells and Schlemm's canal endothelial 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：房水流出におけるシュレム管内皮細胞の影響の理解のため、線維柱帯細胞との相互作用の解明を目的として検討を行った。特に、開放隅角緑内障患者の房水中で発現が増加しているTGF- β 2の影響を中心に検討を行った。TGF- β 2はシュレム管内皮細胞の透過性を低下させ、HDAC阻害剤のSAHAはこの透過性低下を抑制した。シュレム管内皮細胞および線維柱帯細胞においてTGF- β 2刺激により α -SMAやフィブロネクチン、Snailの発現亢進が認められ、内皮間葉転換および上皮間葉転換の誘導が示唆された。SAHAは α -SMAやフィブロネクチンの発現亢進を抑制し、シュレム管内皮細胞ではSnailの発現も有意に抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TGF- β 2がシュレム管内皮細胞に対しても直接的に影響を与え、房水流出抵抗に悪影響を与えることが本検討から明らかとなった。また、エピジェネティクス薬が眼圧下降薬として有用である可能性も示された。さらに、シュレム管内皮細胞がTGF- β 2により内皮間葉転換を誘導されている可能性も示された。それに対しSAHAやROCK阻害剤のような眼圧下降を示す薬剤が、内皮間葉転換を抑制する結果を示したことから、内皮間葉転換を抑制する薬剤による新たな眼圧調節治療薬の可能性も示すことができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the interaction between trabecular meshwork cells and Schlemm's canal endothelial cells. We focused on the effect of TGF- β 2, whose expression is increased in the aqueous humor of patients with open-angle glaucoma. TGF- β 2 reduced the permeability of Schlemm's canal endothelial cells, and the HDAC inhibitor SAHA suppressed this reduction in permeability. TGF- β 2 stimulation increased the expression of α -SMA, fibronectin, and Snail in Schlemm's canal endothelial cells and trabecular meshwork cells, suggesting the induction of endothelial and epithelial mesenchymal transition. SAHA suppressed the expression of α -SMA and fibronectin by TGF- β 2, and significantly suppressed the expression of Snail in Schlemm's canal endothelial cells. These results were suggested that SAHA suppresses the endothelial-mesenchymal transition of Schlemm's canal endothelial cells by TGF- β 2.

研究分野：薬理学、生理学、眼科疾患、緑内障

キーワード：シュレム管内皮細胞 線維柱帯細胞 緑内障 TGF- β 2 HDAC阻害剤 ROCK阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障は日本における中途失明原因の第一位の疾患であり、40 歳以上の有病率は 5%と高い。緑内障の治療は眼圧を下降させることで視野障害の進行を抑制するものであり、その方法は点眼薬等の薬物治療と外科的手術療法である。近年、房水流出の主経路といわれる線維柱帯-シュレム管経路に直接作用し眼圧を下降させる ROCK 阻害剤が臨床応用され、また手術療法においても種々の新しいデバイスの開発や、手術手技の改良により低リスクで効果の高い治療が可能となってきた。しかし、現状の治療法では視野障害の進行が抑制できず失明へ至るケースが少なくないため、緑内障病態のさらなる解明とそれに基づいた新規治療法の開発が求められている。

緑内障患者の房水中 TGF- β 2 濃度が上昇していることが複数のグループより報告され眼圧への影響が検討されている。線維柱帯細胞での検討により TGF- β 2 はアクチン細胞骨格変化、細胞外マトリクスの産生亢進、connective tissue growth factor (CTGF)、endothelin-1 (ET-1)、thrombospondin-1 (TSP-1) 等の生理活性物質の分泌増加が示された。組織レベルでの検討において、TGF- β 2 による線維柱帯への細胞外マトリクス異常沈着が報告されており、TGF- β 2 が緑内障病態に重要な因子であることを示唆している。しかし、シュレム管内皮に対しては TGF- β 2 の影響について細胞レベルで検討した報告はない。線維柱帯細胞により産生された生理活性物質は TGF- β 2 等の房水中の生理活性物質と共に近傍のシュレム管内皮に高濃度に暴露されるものと考えられる。そのため、流出抵抗形成の全容を理解するためには線維柱帯-シュレム管経路の局所における細胞間相互作用の理解が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は TGF- β 2 刺激時の線維柱帯細胞とシュレム管内皮細胞の相互作用の点からシュレム管内皮細胞の生理的役割について理解することである。我々は、ヒトに極めて近いサル眼球より線維柱帯細胞およびシュレム管内皮細胞を単離培養する方法を確立し保有している。そこで、本研究では主にサルシュレム管内皮細胞およびサル線維柱帯細胞を用い、両細胞に対する TGF- β 2 の影響について検討を行い、エピジェネティクス薬の HDAC 阻害剤や ROCK 阻害剤の影響について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 主経路に対する HDAC 阻害剤の影響

本検討では主にサル眼球より単離、培養した線維柱帯 (MTM) 細胞およびシュレム管内皮 (MSC) 細胞を使用した。また、ヒトとの類似性の確認のため ScienCell 社より購入したヒト線維柱帯 (HTM) 細胞での検討を実施した。TGF- β 2 で線維柱帯細胞およびシュレム管内皮細胞を刺激し、HDAC 阻害剤ボリノスタット (SAHA) の効果について検討を行った。細胞外マトリクスの発現、細胞内シグナルの解析はウエスタンブロットおよびリアルタイム PCR により実施した。細胞単層の透過性の検討はトランスウェルチャンバーを用いた電気抵抗の測定を実施した。Ex vivo の房水流出に対する影響の検討は、ブタ摘出眼球を使用した組織培養灌流系を使用した。眼球の前眼部を自作チャンバーへセットし、CO₂ インキュベータ内で培養しながら一定流速で培養液を灌流し、眼球内圧をモニターすることで房水流出率の変化を評価した。また、白色家兎の TGF- β 2 誘発高眼圧モデルを使用し、in vivo での眼圧へのボリノスタットの効果を検討した。

(2) シュレム管内皮細胞の内皮間葉転換に対する ROCK 阻害剤の影響

MSC 細胞の TGF- β 2 誘発内皮間葉転換 (End-MT) に対する ROCK 阻害剤の影響について検討を行った。ROCK 阻害剤は Y-27632 を使用した。TGF- β 2 刺激により誘導される End-MT に対する Y-27632 の効果をウエスタンブロットおよびリアルタイム PCR により検討を行った。

4. 研究成果

(1) 主経路に対する HDAC 阻害剤の影響

房水流出抵抗への影響を検討するため、トランスウェルチャンバーを用い電気抵抗測定を行ったところ、MTM および MSC 細胞ともに TGF- β 2 による抵抗増加が SAHA 添加により有意に抑制される結果を得た。また、ex vivo のブタ眼球組織培養灌流系にて検討した結果、TGF- β 2 単独では灌流 72 時間後に有意な房水流出率の低下が認められたが、SAHA と TGF- β 2 を同時に灌流した眼球では房水流出率の低下は認められなかった。さらに、白色家兎の TGF- β 2 誘発高眼圧モデルを用いた検討において、SAHA は有意な眼圧下降作用を示した。細胞外マトリクスおよび細胞骨格タンパクへの影響に対して検討を行った結果、MTM 細胞へ TGF- β 2 刺激を行うと、HTM 細胞と同様に fibronectin、collagen type1 等の細胞外マトリクスの産生が亢進し、F-actin の増加、 α -smooth muscle actin (α -SMA) 陽性細胞の増加が認められた。SAHA は、TGF- β 2 による fibronectin、collagen type1 の発現亢進や F-actin の増加、 α -SMA 陽性細胞

の増加を抑制した。MSC 細胞への影響についても同様に検討を行ったところ、TGF- β 2 刺激により fibronectin、collagen type4 の発現亢進、F-actin の増加、 α -SMA 発現亢進が認められ、SAHA は fibronectin、collagen type4 の発現を有意に抑制し、F-actin や α -SMA も低下させた。さらに、MSC 細胞では TGF- β 2 による End-MT 誘導因子である Snail の発現亢進を SAHA が有意に抑制した。TGF- β 2 の細胞内シグナルの面から解析したところ、TGF- β 2 により活性化される Smad2/3 のリン酸化や核内移行に対して SAHA は影響を与えなかった。それに対し、TGF- β 2 で誘導される Akt および Erk のリン酸化は SAHA により MTM および MSC 細胞ともに有意に抑制されていた。特に Akt のリン酸化の抑制は顕著であった。そこで PI3/Akt 経路に関して検討を行ったところ、SAHA による PTEN の発現亢進を確認した。また、SAHA 処置した HTM および MSC 細胞で有意な BMP7 の mRNA 発現亢進が認められた。これらの結果から、SAHA は PI3/Akt 経路の抑制と、TGF- β 2 の内因性阻害剤である BMP7 の発現誘導により TGF- β 2 による細胞外マトリクスの発現亢進や、MSC 細胞の End-MT の抑制を示すことが示唆された。

(2) シュレム管内皮細胞の内皮間葉転換に対する ROCK 阻害剤の影響

TGF- β 2 刺激 72 時間後の α -SMA、fibronectin、および N-cadherin の発現は、control と比べ有意な上昇を認め、Y-27632 の同時添加により TGF- β 2 単独と比べて有意に低下した。内皮細胞マーカーの Tie2 は TGF- β 2 刺激 72 時間後有意に発現が低下し、Y-27632 の同時添加で発現低下を抑制した。End-MT 誘導因子である Snail タンパクおよび mRNA (SNAI1) の発現量は TGF- β 2 刺激 24 時間後に、それぞれ 26.7 倍、18.1 倍と有意に増加し、Y-27632 の同時添加によりそれぞれ 8.5 倍、7.8 倍と有意に抑制された。以上の結果より、ROCK 阻害剤である Y-27632 は TGF- β 2 によるシュレム管内皮細胞の End-MT 様変化を抑制することが明らかとなった。

本検討により、TGF- β 2 がシュレム管内皮細胞に対しても直接的に影響を与え、房水流出抵抗に悪影響を与えることが明らかとなった。また、エピジェネティクス薬が眼圧下降薬として有用である可能性も示された。さらに、シュレム管内皮細胞が TGF- β 2 により End-MT を誘導されている可能性も示された。それに対し SAHA や ROCK 阻害剤のような眼圧下降を示す薬剤が、End-MT を抑制する結果を示したことから、End-MT を抑制する薬剤による新たな眼圧調節治療薬の可能性も示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujimoto Tomokazu, Inoue-Mochita Miyuki, Iraha Satoshi, Tanihara Hidenobu, Inoue Toshihiro	4. 巻 297
2. 論文標題 Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) inhibits transforming growth factor-beta 2-induced increases in aqueous humor outflow resistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101070 ~ 101070
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101070	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 Takahashi Eri, Saruwatari Junji, Fujimoto Tomokazu, Tanoue Yuki, Fukuda Takaichi, Inoue Toshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 The effects of exosomes derived from trabecular meshwork cells on Schlemm's canal endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01450-9	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 Fujimoto T., Sato-Ohira S., Tanihara H., Inoue T.	4. 巻 46
2. 論文標題 RhoA Activation Decreases Phagocytosis of Trabecular Meshwork Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Eye Research	6. 最初と最後の頁 496-503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/02713683.2020.1815791	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤本智和、井上みゆき、井上俊洋
2. 発表標題 シュレム管内皮細胞におけるTGF- β 2誘発EndMT様変化に対するROCK阻害剤の影響
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤本智和、伊良波聡、井上みゆき、谷原秀信、井上俊洋
2. 発表標題 線維柱帯細胞におけるTGF- β 2誘発EMT様変化に対するSAHAの影響
3. 学会等名 第32回日本緑内障学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本智和
2. 発表標題 線維柱帯細胞・シュレム管内皮細胞の機能と緑内障病態
3. 学会等名 第31回日本緑内障学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本智和、谷原秀信、井上俊洋
2. 発表標題 TGF- β 2誘発房水流出抵抗増加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
3. 学会等名 第30回日本緑内障学会
4. 発表年 2019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	井上 俊洋 (Inoue Toshihiro) (00317025)	熊本大学・大学院生命科学研究部 (医)・教授 (17401)	

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
---------	---------