

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09750

研究課題名（和文）水晶体上皮細胞の上皮間葉系移行における細胞内シグナル伝達機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of Intracellular Signaling Mechanisms in Epithelial-Mesenchymal Transition of Lens Epithelial Cells

研究代表者

黒坂 大次郎（Kurosaka, Daijiro）

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：20215099

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：水晶体上皮細胞におけるEMTにおいてTGF- $\beta$ が重要な因子であるが、この細胞内刺激伝達系にYAP/TAZが関与することが示唆される結果が得られた。さらに、FGF-2がこのEMTを抑制し、この細胞内刺激伝達系にYAP/TAZでない因子が関与する可能性を示唆できた。さらに比較のため行った網膜色素上皮細胞の系でのEMTにおける細胞内刺激伝達系にYAP/TAZが関与すること、これにはCTGFが関与すること、また、YAP/TAZの阻害剤がTGF- $\beta$ によるEMTに対し抑制的な効果を持つことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水晶体上皮細胞のEMTの機序の一端を明らかにしたことは、前嚢下白内障の予防法の開発につながる。さらに網膜色素上皮細胞におけるEMTの機序の一端とその予防薬の候補を提示したことは、失明原因の上位を占める糖尿病網膜症などの新たな治療法の開発の可能性を示唆している。これらは、国内外ともに重要な知見であり、その社会的意義は大きいと思われる。

研究成果の概要（英文）：TGF- $\beta$  is an important factor in EMT in lens epithelial cells, and the results suggest that YAP/TAZ is involved in this intracellular stimulatory pathway. Furthermore, FGF-2 suppresses EMT, suggesting that factors other than YAP/TAZ may be involved in this intracellular stimulatory pathway. In addition, our results showed that YAP/TAZ is involved in the intracellular stimulatory pathway of EMT in the retinal pigment epithelial cell lineage, which involves CTGF, and that inhibitors of YAP/TAZ have an inhibitory effect on TGF- $\beta$ -induced EMT in the retinal pigment epithelial cell lineage.

研究分野：眼科

キーワード：TGF- $\beta$  水晶体上皮細胞 網膜色素上皮細胞 上皮間葉系転換

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

水晶体上皮細胞は、その組織にダメージが加わり創傷治癒機転が働くと筋線維芽細胞(様細胞)に変化(上皮間葉系移行(epithelial-mesenchymal transition :EMT))し、組織の癒痕収縮をもたらす。この変化は、水晶体上皮細胞では白内障術後の前囊収縮や後囊の線維性混濁と前囊下白内障である。これらは、視機能の向上・維持の妨げとなり、その制御が重要と思われる。例えば、白内障術後の前囊収縮は、コントラスト感度の低下や眼内レンズの偏位をもたらす(Fişuş AD, Findl O. Eye, 2020)、さらに最近では、白内障手術に用いる眼内レンズとして、乱視を軽減できるトーリック眼内レンズが使用されるようになってきているが、このレンズの回転に影響を与え、その効果を減弱する。そのため、白内障術後の EMT を予防することが、Quality of Vision の向上において重要だと考えられている。

我々は、この病態の本体である水晶体上皮細胞の EMT の形成には様々な Growth Factor が関与し、その中でも TGF- $\beta$  が主要な働きをし、FGF-2 が抑制的に働くことを報告した(Kurosaka D, et al. IOVS.1995)。その後、TGF- $\beta$  の細胞内シグナル伝達系の解明とその制御機構が盛んに研究され、Smad 系を介するが報告された(Saika S. et al, Prog Retin Eye Res. 2008)。一方、我々は、非 SMAD 系の Rho/Rock/MRTF 系に注目し、これらが重要な役割を担っていること(Urakami C, Kurosaka D, et al. Curr Eye Res. 2012, Okuno T, Kurosaka D, et al. JIMA. 2018)やその阻害剤である前囊下白内障を惹起するマウスに Y-27632 を点眼投与すると前囊下白内障が抑制されること(Imaizumi T, Kurosaka D, et al. Exp Eye Res. 2019)を報告してきた。

最近、EMT 形成の細胞内シグナル伝達には Hippo 系(YAP/TAZ)が関与し Rho/Rock/MRTF 系とのクロストークがなされていることが、腎臓尿細管上皮細胞で明らかになってきている(Speight P, et al. Nature Communications 2016, Miranda MZ, et al. J Biol Chem. 2017, Bialik JF, et al. Sci Rep. 2019)。また、FGF-2 が抑制的な作用には ERK/Elk 系が関与し Rho/Rock/MRTF 系への抑制作用が働くことが膵臓内皮細胞で報告された(Akatsu Y, et al. Mol Oncol. 2019)。水晶体上皮細胞においては、YAP が増殖などに関与しているしていると報告があるのみである(Kumar B et al. IOVS, 2019, Maddala R et al. Sci Rep, 2020)。

水晶体上皮細胞における EMT に Hippo 系(YAP/TAZ)が関与するのかどうか、するとすればどのように関与するか、さらには、抑制的に働く FGF-2 が Rho/Rock/MRTF 系とどのように関与するのかは不明なままである。

### 2. 研究の目的

我々は、TGF- $\beta$  が主要な因子として作用し水晶体上皮細胞が上皮間葉系移行(EMT)し、前囊下白内障や白内障術後の線維性混濁を生じることが報告してきた。さらにその TGF- $\beta$  の細胞内シグナル伝達系として 平滑筋線維アクチンの発現と I 型コラーゲン産生を指標として、非 SMAD 系の Rho/Rock/MRTF 系が重要な働きをすることを明らかにしてきた。最近、この過程に Hippo-YAP/TAZ シグナル伝達系が関与し、SMAD 系や Rho/Rock/MRTF 系とクロストークが行われることが、腎臓尿細管上皮細胞などで明らかになった。本研究では、前囊下白内障を誘発できるマウスモデルと株化されたヒト水晶体上皮細胞を用いて、EMT において Hippo-YAP/TAZ シグナル伝達系や MRTF 系との関りを明らかとし、治療薬の開発に結び付けることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 実験 1 免疫組織学的検討

既報(Ishikawa Y, Kurosaka D. Exp Eye Res. 2012. Imaizumi T, Kurosaka D, et al. Exp Eye Res. 2019)の通りに UV 照射によりマウスに前囊下白内障を惹起させ、水晶体を取り出し、前囊下白内障部分に YAP/TAZ の発現があるか免疫組織化学的に検討を行う。パラフィン切片を用い、抗 TAZ 抗体を用いて検討する

#### 実験 2 水晶体上に細胞における EMT での YAP/TAZ の役割の検討

ヒト水晶体上皮細胞株である HLE-B3 と SRA 01/04 の 2 株の細胞を用いて、TGF- $\beta$  刺激を行い、平滑筋アクチン(SMA)、I 型コラーゲン、さらに EMT に関わるとされる CTGF(Connective tissue growth factor)の発現が上昇することを RT-PCR 法で確認する。さらに、YAP/TAZ の発現を抑えるべく m-RNA をノックダウンさせた場合に、これらの発現に影響が生じるかを検討する。

#### 実験 3 網膜色素上皮細胞における EMT での YAP/TAZ の役割の検討

水晶体上皮細胞での結果にばらつきが生じたため、ヒト網膜色素上皮細胞株である ARPE-19 を用いて、EMT における YAP/TAZ の役割を検討する。ARPE-19 に TGF- $\beta$  を作用させると CTGF(Connective tissue growth factor), fibronectin, YAP/TAZ の発現の上昇が生じるかを RT-PCR にて確認する。さらに、YAP/TAZ を強制発現させた場合に、これらの発現が変化するか、さらには、これらが YAP/TAZ の阻害剤によって抑制されるかを検討する。

#### 実験 4 水晶体上に細胞における EMT での FGF-2 の役割の検討

ヒト水晶体上皮細胞株である SRA 01/04 を用いて、TGF- $\beta$  刺激を行い、平滑筋アクチン(SMA)、I 型コラーゲンの発現が上昇することを RT-PCR 法で確認する。さらに、この系に FGF-

2 を添加した場合、これらの発現が影響を受けるか、さらには、MRTF 系で重要な働きをする SRF を共有する ELK-1 がこれらの変化に関係しているか、ELK-1 をノックダウンして影響があるかを検討する

#### 4. 研究成果

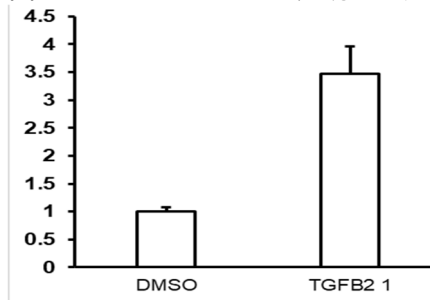
##### 実験 1 免疫組織学的検討

UV 照射を行って誘発させた前嚢下白内障の部分に一致して、TAZ の発現が確認された。

##### 実験 2 水晶体上に細胞における EMT での YAP/TAZ の役割の検討

水晶体上皮細胞に TGF- $\beta$  を作用させると図 1 のごとく SMA, I 型コラーゲンの発現が上昇した。HLE-B3 と SRA 01/04 の 2 株の細胞を用いて確認された。

図 1 I 型コラーゲンの発現が上昇



YAP/TAZ を特異的にノックダウンさせる siRNA では、YAP/TAZ の発現が抑制された。このモデルを用いて、SMA, I 型コラーゲンの発現を検討したが、その効果が不安定であった（抑制が認められる場合と認められない場合があった）。

この原因を探るため、様々に条件を変えて行い、その結果、SMA, I 型コラーゲンの発現ではその発現が不安定であったが、EMT に関わる CTGF の発現は抑制されることがわかった。これらの成果を踏まえ、CTGF の発現が抑制される系を確立するために、眼内で EMT を起こすとされる網膜色素

上皮細胞の系で確認を行うこととした。

##### 実験 3 網膜色素上皮細胞における EMT での YAP/TAZ の役割の検討

ARPE-19 に YAP/TAZ を強制発現させるために plasmid を用いて行った。その結果 YAP/TAZ の発現が上昇した（図 2）。

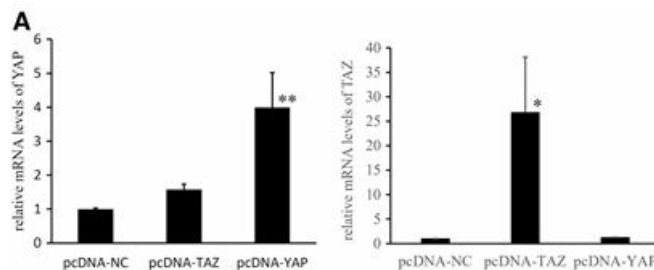


図 2 YAP/TAZ を挿入した細胞では、YAP/TAZ の発現上昇が認められた。

これらの強制発現させた細胞では、CTGF 発現上昇が認められた（図 3）。そこで CTGF の発現を指標として、YAP/TAZ の阻害剤である k-975 並びにルテオリンを投与し、CTGF の発現が抑制されるか検討したところ抑制された（図 4）。

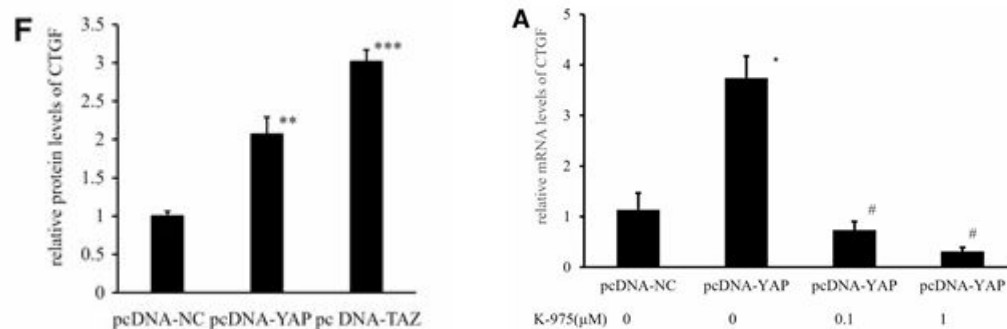


図 3

図 4

次に ARPE-19 に TGF- $\beta$  を作用させると、CTGF、フィブロネクチンの発現上昇が認められたが、これらが、k-975 並びにルテオリンにより抑制されるかを検討したが、抑制された（図 5）。

以上の結果より、ARPE-19 では、YAP/TAZ が EMT を促進し、その一部は CTGF を介すること、TGF- $\beta$  においても YAP/TAZ の経路を介して CTGF を産生し、これが EMT に関与していることが明らかとなった。

これらの結果をもとに、水晶体上皮細胞でも検討を加え、水晶体上皮細胞における TGF- $\beta$  による CTGF の発現には、YAP/TAZ が関与することが確かめられた。

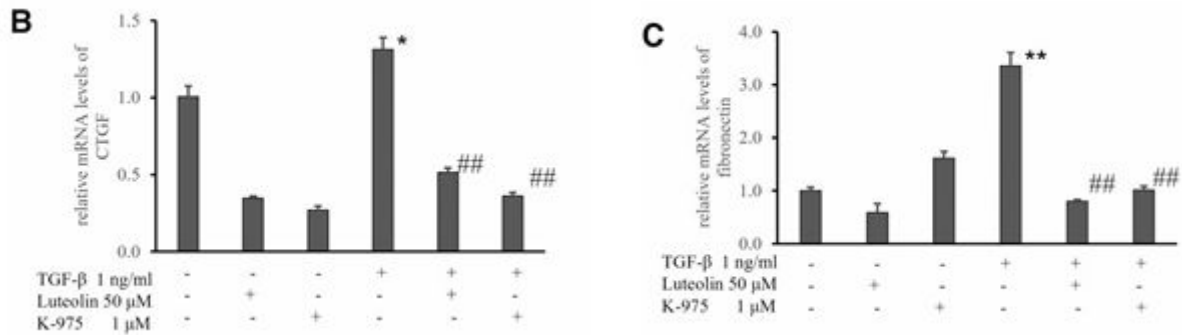


図5 右CTGF 左フィブロネクチンに対する TGF-β と k-975、ルテオリンの効果

実験4 水晶体上に細胞における EMT での FGF-2 の役割の検討

SRA-01/04 に TGF-β を添加すると SMA 並びに I 型コラーゲンの産生が増加したが、これに FGF-2 を添加すると、濃度依存性にその発現を抑制した (図6)

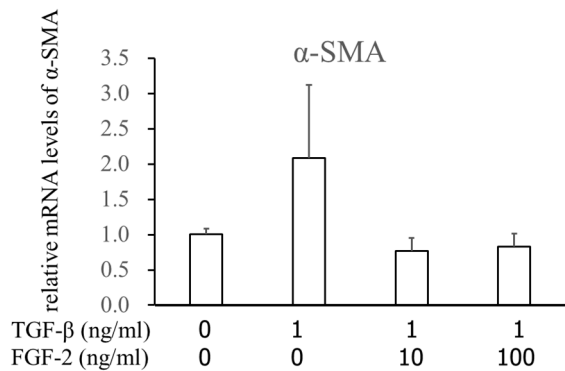


図6

これらの知見は、国内外的にも重要なものと思われる。

SRA-01/04 で、ELK-1 を抑制すると TGF-β による増加がさらに増加することより、ELK-1 が関与することが考えられた。

以上の実験 1-4 の研究成果より、前嚢下白内障で生じる、水晶体上皮細胞の EMT において、YAP/TAZ や FGF-2 が関与していること、さらには、これらの阻害剤を投与することで、EMT を減少させられる可能性が示唆された。

これらの知見は、白内障の新たな予防法の開発につながる。さらに本研究では、網膜色素上皮細胞における EMT においても PDGF が重要な働きをし、さらにこれらの抑制につな

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murakami Yoko, Imaizumi Toshiyasu, Hashizume Kouhei, Tezuka Yu, Oku Yusuke, Nishiya Naoyuki, Sanbe Atsushi, Kurosaka Daijiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Inhibition of Connective Tissue Growth Factor Expression in Adult Retinal Pigment Epithelial-19 Cells by Blocking Yes-Associated Protein/Transcriptional Coactivator with PDZ-Binding Motif Activity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 246 - 252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/jop.2023.0141	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 黒坂 大次郎, 板持 雅知, 亀井 翔太, 今泉 利康, 橋爪 公平
2. 発表標題 水晶体上皮細胞のI型コラーゲン産生に対する線維芽細胞増殖因子の影響
3. 学会等名 第128回日本眼科学会総会
4. 発表年 2024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	橋爪 公平  (Hashizume Kouhei)  (50407095)	岩手医科大学・医学部・特任准教授   (31201)	
研究分担者	木澤 純也  (kizawa junya)  (40433487)	岩手医科大学・医学部・講師   (31201)	

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