

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792000

研究課題名（和文）

水晶体上皮細胞の上皮間葉系移行および細胞収縮におけるスタチンの影響

研究課題名（英文） The effect of statin on epithelial-mesenchymal transition and cellular contractility of lens epithelial cells

研究代表者

玉田 邦房 (TAMADA KUNIFUSA)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：20583610

研究成果の概要（和文）：豚の水晶体上皮細胞において TGF- $\beta$  で促進される細胞収縮・上皮間葉系移行・細胞外マトリックスの産生を Lovastatin が抑制することを示した。しかし、高濃度の Lovastatin は正常細胞にも影響を与える可能性が示唆された。また、上皮間葉系移行の機序として他の経路の関与も考えられるが、TGF- $\beta$  作用下において Rho を介したシグナル伝達が重要な要因であることが確認できた。Statin 系薬剤の Lovastatin が白内障術後の合併症に対する新しい予防法となりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study showed that lovastatin inhibits TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition, cellular contraction and the expression of extracellular matrix in porcine lens epithelial cells. However, high concentration lovastatin may affect the normal cellular activities. Moreover, as a mechanism of epithelial-mesenchymal transition, it has confirmed that Rho pathway was an important factor in the effect of TGF- $\beta$ , Although the other pathways may participate. This suggests that lovastatin should be considered as a new agent to prevent postoperative complications of cataract.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：水晶体上皮細胞、上皮間葉系移行、コラーゲン収縮、TGF- $\beta$ 、statin

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 白内障手術は、眼科で行われている最も一般的な手術である。白内障術後の合併症として、前囊収縮および後発白内障が挙げられるが、これらに対する有用な予防法は確立していない。

(2) 前囊収縮および後発白内障は、眼内レンズ挿入術後の創傷治癒過程で残存した水晶体上皮細胞が、線維芽細胞様の細胞(筋線維芽細胞)へ変化(上皮・間葉系移行)し、その

細胞の収縮およびその細胞から産生されるコラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスの沈着による混濁によって起こる。我々は、水晶体上皮細胞によるコラーゲン収縮および上皮・間葉系移行の主なマーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) の発現が、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) により促進されることを報告した。また、一般にこれらの反応には、低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho を介した細胞内シグナル伝達の関与が報告されている。

近年、Rho を介したシグナル伝達を阻害する薬剤として、HMG-CoA 還元酵素阻害剤である Statin 系薬剤の機能が明らかになってきており、ヒトや豚の水晶体上皮細胞に Statin を投与すると、Rho の活性化が抑制され、水晶体上皮細胞の細胞骨格に影響を与え、細胞同士の結合が弱くなり細胞の形態変化を起こすことが報告されている。そこで我々は、Statin 系薬剤の 1 種である Lovastatin が水晶体上皮細胞の形態変化および細胞骨格に影響を与え、TGF- $\beta$  によって促進されるこれらの変化を抑制する可能性について検討してきた。

(3) これまで、Lovastatin が水晶体上皮細胞の収縮能および上皮・間葉系移行に与える影響については知られていない。これらを明らかにすることにより、今後の臨床応用への可能性を示し、前囊収縮や後発白内障の予防法を見出すことは、Quality of Vision の向上において重要だと考えられる。

## 2. 研究の目的

白内障術後の合併症として、前囊収縮や後発白内障が挙げられる。その原因として、水晶体上皮細胞の上皮・間葉系移行および細胞収縮の関与が知られている。しかし、これらに対する有用な予防法は確立していない。

本研究では、培養した豚の水晶体上皮細胞を用いて、上皮・間葉系移行および細胞の収縮を促進する TGF- $\beta$  を投与して、Statin 系薬剤の 1 種である Lovastatin が与える影響について明らかにする。また、Lovastatin によって上皮・間葉系移行および細胞収縮の抑制効果を認めた場合は、その詳細な機序についてさらなる検討を行う。

そして、前囊収縮および後発白内障のような白内障術後合併症に対して Statin 系薬剤を用いた新しい予防法への可能性について検討する。

## 3. 研究の方法

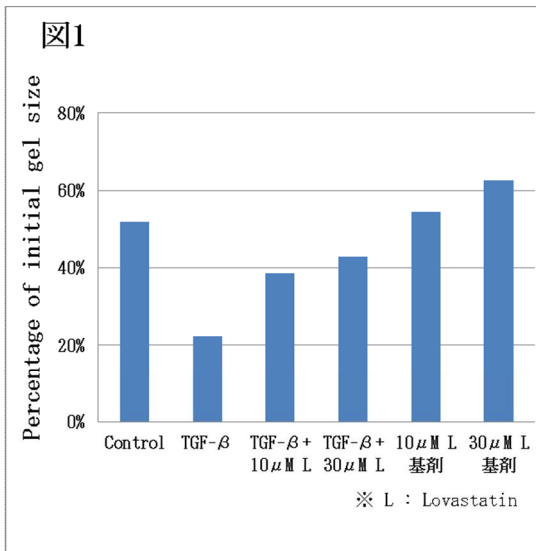
(1) TGF- $\beta$  により促進される細胞の収縮が、Lovastatin によって抑制されるか検討した。豚眼から水晶体上皮を摘出し、水晶体上皮細胞を培養・抽出した。抽出した水晶体上皮細胞をコラーゲンゲル内で培養し、Lovastatin (10  $\mu$ M または 30  $\mu$ M) および Lovastatin 基剤を投与した。投与 18 時間後に、TGF- $\beta$  (5ng/ml) を投与することによりコラーゲンゲルの収縮を刺激した。そして 24 時間後に、コラーゲンゲルの収縮率を比較した。収縮率は、各コラーゲンゲルの最長および最短の直径を測定した。

(2) Lovastatin が上皮・間葉系移行に与える影響について検討した。前述した方法により抽出した水晶体上皮細胞に、同様に Lovastatin (10  $\mu$ M)、Lovastatin 基剤および TGF- $\beta$  (5ng/ml) を投与し、上皮・間葉系移行の主なマーカーである  $\alpha$ -SMA を指標とし、 $\alpha$ -SMA の mRNA およびタンパクの発現量を測定した。 $\alpha$ -SMA の遺伝子発現は、real time-reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて解析を行い、内在性コントロール遺伝子として、GAPDH を使用して比較した。タンパク発現量の測定は、Western blot 法を用いて行った。また、上皮・間葉系移行への影響が Lovastatin による Rho 活性化の抑制によるものか検討するため、Lovastatin および TGF- $\beta$  にメバロネート (500  $\mu$ M) を投与して  $\alpha$ -SMA の mRNA 発現量を測定した。

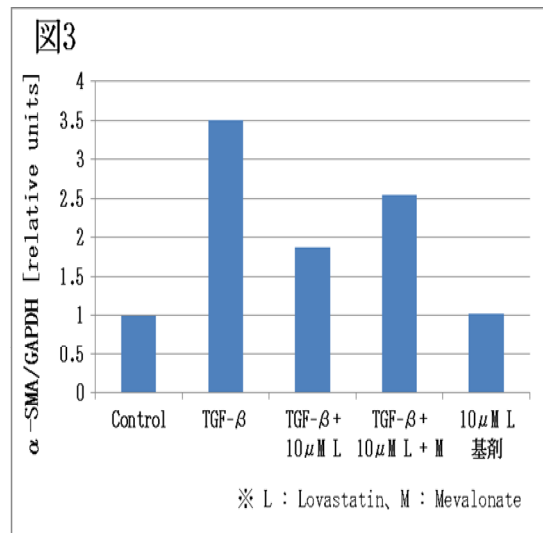
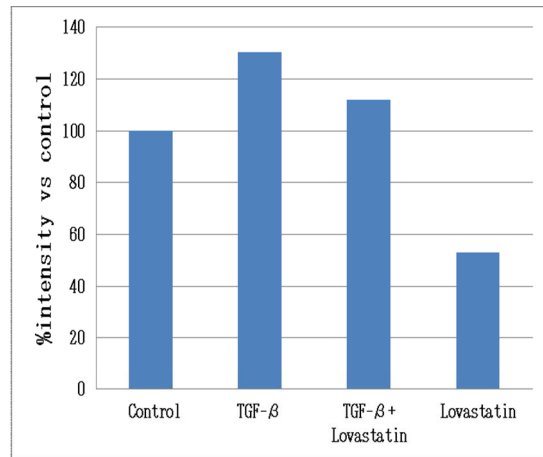
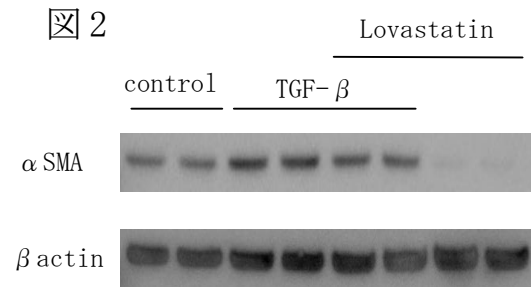
(3) 細胞外マトリックスの沈着が Lovastatin により抑制されるか検討した。(2) と同様な方法で、細胞外マトリックスの 1 つであるコラーゲン I の mRNA 発現量を測定した。

## 4. 研究成果

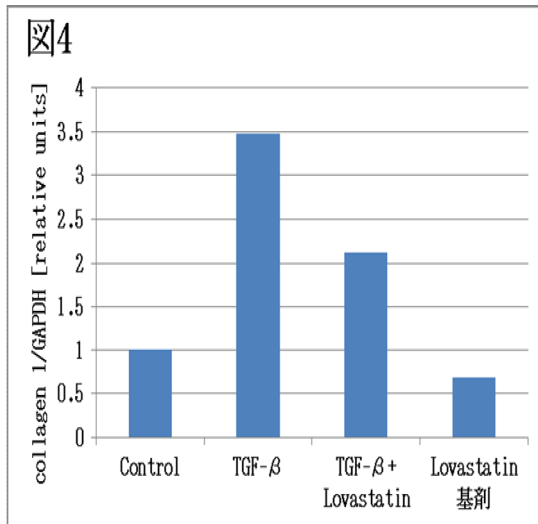
(1) 豚の水晶体上皮細胞をコラーゲンゲル内で培養し、TGF- $\beta$  によって促進される細胞収縮が Lovastatin により抑制されるか検討した。コントロール群および 10  $\mu$ M Lovastatin 基剤投与群において、コラーゲンゲルの収縮率は 51.9% および 54.4% であった。TGF- $\beta$  投与群のコラーゲンゲル収縮率は 22.3% で、コントロール群と比較し、強い収縮を認めた。一方、TGF- $\beta$  + 10  $\mu$ M Lovastatin 投与群の収縮率は、38.6% で TGF- $\beta$  投与群と比較し、有意にコラーゲンゲルの収縮は抑制された。30  $\mu$ M Lovastatin 基剤投与群のコラーゲンゲルの収縮率は 62.5% で、TGF- $\beta$  + 30  $\mu$ M Lovastatin 投与群の収縮率は 42.9% だった。高濃度 Lovastatin によってコラーゲンゲル収縮はより抑制されたが、30  $\mu$ M Lovastatin 基剤群ではコントロール群よりも収縮が抑制された(図 1)。これより、豚の水晶体上皮細胞において TGF- $\beta$  で促進される細胞収縮を Lovastatin が抑制することを示した。しかし、高濃度では正常細胞にも影響を与える可能性が示唆された。



(2) 豚の水晶体上皮細胞に Lovastatin および TGF-β を投与し、Lovastatin が上皮・間葉系移行に与える影響について検討した。TGF-β 投与群は、α-SMA の mRNA およびタンパク発現量ともコントロール群より有意に増加を示した。一方、TGF-β + Lovastatin 投与群では、それらの発現量の増加が有意に抑制された(図 2, 3)。TGF-β + Lovastatin + メバロネート投与群では、TGF-β + Lovastatin 投与群より α-SMA の mRNA 発現量は増加したが、TGF-β 投与群より増加は抑制された(図 3)。これより、豚の水晶体上皮細胞において TGF-β で促進される上皮間葉系移行を Lovastatin が抑制することを示した。また、上皮間葉系移行の機序として他の経路の関与も考えられるが、TGF-β 作用下において Rho を介した細胞内シグナル伝達が重要な要因であることが確認できた。



(3) 主にコラーゲン I からなる細胞外マトリックスの沈着について検討した。TGF- $\beta$  投与群において、コラーゲン I の mRNA はコントロール群より有意に増加を示したが、TGF- $\beta$ +Lovastatin 投与群では、その mRNA 発現量は有意に抑制された(図 4)。これより、豚の水晶体上皮細胞において TGF- $\beta$  で促進される細胞外マトリックスの産生を Lovastatin が抑制することを示した。



(4) 本研究では、豚の水晶体上皮細胞において TGF- $\beta$  で促進される細胞収縮・上皮間葉系移行・細胞外マトリックス産生を Lovastatin が抑制することを示した。しかし、高濃度では正常細胞にも影響を与える可能性が示唆された。また、上皮間葉系移行の機序として他の経路の関与も考えられるが、TGF- $\beta$  作用下において Rho を介した細胞内シグナル伝達が重要な要因であることも確認できた。Statin 系薬剤である Lovastatin が、白内障術後の合併症である前囊収縮や後発白内障に対する新しい予防法となりうると考えられた。

今後は、他の Statin 系薬剤でも抑制効果があるのか検討する。さらにヒトの水晶体上皮細胞を用いて同様に研究を行うことにより、臨床応用への可能性を検討する必要があると考えられる。

## 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) 浦上千佳子、黒坂大次郎、玉田邦房、岸本成史、手塚優、西郡秀夫、Lovastatin alters TGF- $\beta$  -induced epithelial-mesenchymal transition in porcine lens epithelial cells、Current Eye Research、査読有、37 (6)、2012、479-485

DOI:10.3109/02713683.2012.665121

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 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

玉田 邦房 (TAMADA KUNIFUSA)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20583610

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

