

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462722

研究課題名(和文) Fibronectin ED-A抑制による増殖硝子体網膜症の制御

研究課題名(英文) The inhibition of fibronectin ED-A suppresses the development of proliferative vitreoretinopathy

研究代表者

木許 賢一 (KIMOTO, KENICHI)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：50315339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素上皮細胞をTGF- β 2で刺激すると上皮間葉移行を起こし、I型コラーゲンに代表される細胞外マトリックス産生やfibronectin ED-Aの発現が増加する。抗Fibronectin ED-A抗体はTGF- β 2で誘導される網膜色素上皮細胞の上皮間葉移行を抑制し、I型コラーゲンの産生を著明に抑制した。Fibronectin ED-Aは正常組織ではほとんど発現が見られないため、増殖硝子体網膜症治療の標的分子となる。現在、Smad、p38MAPK、PI3K、PKC- ζ 各因子とfibronectin ED-A間のクロストークについて検討中である。

研究成果の概要(英文)：TGF- β 2 induces epithelial mesenchymal transition (EMT) in retinal pigment epithelium (RPE). Therefore, it has been implicated as the key mediator of proliferative vitreoretinopathy. Type I collagen and fibronectin ED-A production were activated by TGF- β 2 in RPE. Anti-fibronectin ED-A antibody inhibited TGF- β 2-induced type I collagen mRNA expression and type I collagen synthesis. Fibronectin ED-A may be a new therapeutic target for treating proliferative vitreoretinopathy.

研究分野：眼科学

キーワード：増殖硝子体網膜症 TGF- β 2 網膜色素上皮細胞 細胞外マトリックス fibronectin ED-A

1. 研究開始当初の背景

増殖性硝子体網膜症 (proliferative vitreoretinopathy; PVR) は裂孔原性網膜剥離術後の重篤で難治な合併症であり放置すれば失明に至る。PVR は線維性細胞増殖が網膜上、網膜下、硝子体中で生じ、増殖膜の形成とその収縮によって剥離した網膜が牽引固定される病態である。有効な薬物はなく、硝子体手術による増殖膜の切除が唯一の治療法であるが、際限なく再増殖を繰り返す症例も多い。PVR の増殖膜は主に網膜色素上皮細胞で構成され、線維性コラーゲンなどの細胞外マトリックスの蓄積が観察される。PVR 症例の硝子体液中には Transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) が高濃度に存在することから TGF- β 2 が PVR 病態形成の key mediator と考えられているがその分子メカニズムの解明は不十分である。網膜裂孔の形成で眼内のバリアが破綻し、硝子体中に遊走、増殖した網膜色素上皮細胞は TGF- β 2 の刺激により上皮間葉移行をおこし、様々な細胞外マトリックスを産生するようになる。それ故、PVR のさらなる病態解明と有効な治療薬の開発のためには、網膜色素上皮細胞における病的な TGF- β 2 のシグナル伝達経路を明確にする必要がある。我々は、TGF- β 2 が網膜色素上皮細胞における I 型コラーゲンの発現を濃度依存的に増加し、その細胞内シグナル伝達経路には主要な Smad 経路だけではなく、p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK)、Rho-kinase および Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) も関与し、これらの伝達経路を阻害することで I 型コラーゲンの発現が抑制されることを初めて報告した (Kimoto K et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 45,2004, Itoh Y, Kimoto K et al. Exp Eye Res 84,2007, Yokoyama K, Kimoto K et al. Graefes Arch Clin Ophthalmol 250, 2012)。しかしながら、これらの分子は生理的にも重要な機構であるため、**病的な増殖組織のみに発現する分子のみを抑制する戦略が必要である**。Extra domain A を有する fibronectin (fibronectin ED-A) は健全な組織には存在せず病的な増殖組織にのみ発現する分子であり、副作用の観点から有望な標的分子になりえる。**(図 1)** 本研究では fibronectin ED-A の産生機構の解明と抗 fibronectin ED-A 抗体の有効性と安全性を in vivo, in vitro において mRNA、microRNA アレイおよびマルチプレックスアレイを用いて網羅的に解析し、PVR 治療の新たな標的分子となりうるかを検証したい。

2. 研究の目的

網膜色素上皮細胞において TGF- β 2 で誘導され眼内増殖膜に特異的に発現する分子； fibronectin ED-A の産生機構を解明する。結果をもとに fibronectin ED-A の産生を阻

害することで網膜色素上皮細胞の上皮間葉移行を抑制し、増殖性硝子体網膜症 (PVR) の新規治療法 (分子標的治療) を開発する。また、その有効性と安全性を検討するため、抗 fibronectin ED-A 療法前後の網膜色素上皮細胞および PVR モデル動物への影響を mRNA、micro RNA アレイおよびマルチプレックスアレイを用いて遺伝子発現と生理活性物質の発現を網羅的に解析する。

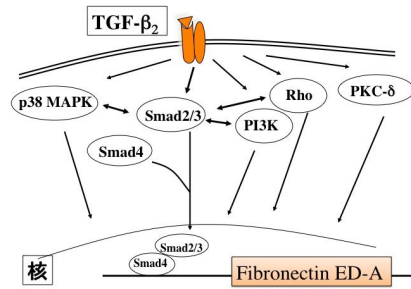


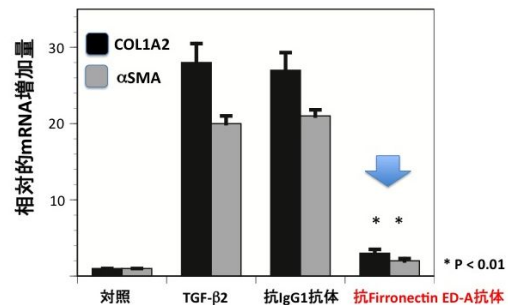
図 1

3. 研究の方法

初代培養ヒト網膜色素上皮細胞 (RPE) における fibronectin ED-A の発現調節機構について検討した。正常および TGF- β 2 刺激下での fibronectin ED-A の産生を mRNA とタンパク産生を real-time PCR およびウエスタンブロットで調べた。TGF- β 2 刺激前に抗 fibronectin ED-A 抗体を添加することで、 α SMA や各種細胞外マトリックスの産生変動を検討した。

4. 研究成果

初代培養ヒト網膜色素上皮細胞 (RPE) において、正常状態では fibronectin ED-A の発現はほとんど見られず、TGF- β 2 刺激下で著明に産生が増加した。抗 fibronectin ED-A 抗体を添加することで type I collagen の産生は極端に低下し、上皮間葉移行の指標となる α SMA の発現も抑制されていた。



5 . 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計5件)

One-year Outcomes Following Intravitreal Aflibercept for Polypoidal Choroidal Vasculopathy in Japanese Patients:The APOLLO Study

Oshima Y, Kimoto K, Yoshida N, Fujisawa K, Sonoda S, Kubota T, Murata T, Sakamoto T, Yoshida S, Sonoda KH, Ishibashi T. 査読あり
Ophthalmologica (in press)

Foveal hypoplasia in patients with stickler syndrome.

Matsushita I, Nagata T, Hayashi T, Kimoto K, Kubota T, Ohji M, Kusaka S, Kondo H.

査読あり。

Ophthalmology.2017 Jun;124 (6):896-902.
doi: 10.1016/j.ophtha.2017.01.046.

A Japanese family with autosomal dominant oculocutaneous albinism type4.

Oki R, Yamada K, Nakano S, Kimoto K, Yamamoto K, Kondo H, Kubota T.

Invest Ophthalmol Vis Sci.

2017. 58(2):1008-1016. 査読あり。

doi: 10.1167/iovs.16-20612.

Mitomycin C modulates the circadian oscillation of clock gene period 2 expression through attenuating the glucocorticoid signaling in mouse fibroblasts.

Kusunose N, Matsunaga N, Kimoto K, Akamine T, Hamamura K, Koyanagi S, Ohdo S, Kubota T.

Biochem Biophys Res Commun. 2015 Nov 6;467(1):157-63. 査読あり。

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.086.

p38 MAP kinase inhibitor suppresses transforming growth factor-b2-induced type 1 collagen production in trabecular meshwork cells.

Inoue-Mochita M, Inoue T, Fujimoto T,

Kameda T, Awai-Kasaoka N, Ohtsu N, Kimoto K, Tanihara H.

PLoS One. 2015 Mar 23;10(3):e0120774.

doi:10.1371/journal.pone.0120774.

eCollection 2015.査読あり。

〔学会発表〕(計4件)

木許賢一 他

病的近視の黄斑円孔および黄斑円孔網膜剥離に対する内境界膜翻転法術後の中心窩形態 第55回日本網膜硝子体学会, ベルサール渋谷ガーデン(東京都, 渋谷区)2016.12.2-4

Kenichi Kimoto et al.

Focal choroidal excavation accompanied by age-related macular degeneration.

World Ophthalmology Congress of international council of ophthalmology 2014, Tokyo, 2014.4.2-6

Koichiro Tamura, Kenichi Kimoto et al.

Vitrectomy without gas tamponade for optic disc pit maculopathy.

World Ophthalmology Congress of international council of ophthalmology 2014, Tokyo, 2014.4.2-6

木許賢一 他

内境界膜関連の手術-翻転、中心窩回避、移植- 第30回大分大学眼科研究会 平成26年2月22日 全労済ソレイユ(大分県、大分市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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〕
大分大学眼科ホームページ
<https://www.med.oita-u.ac.jp/ganka/>

6．研究組織

(1)研究代表者

木許 賢一 (KIMOTO Kenichi)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号：50315339

(2)研究分担者

久保田 敏昭 (KUBOTA Toshiaki)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号：30205140

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

横山 勝彦 (YOKOYAMA Katsuhiko)