

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462732

研究課題名(和文) TGF- β による水晶体上皮細胞の上皮間葉系移行におけるRhoキナーゼの役割研究課題名(英文) Role of Rho kinase on epithelial mesenchymal transformation of lens epithelial cells induced by TGF- β

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：水晶体上皮細胞の上皮間葉系転換は前嚢下白内障などをもたらす。これには、TGF- β が関与し、その細胞内シグナル伝達系としてRhoが関与することを我々は報告してきた。今回は、Rhoキナーゼを選択的阻害剤(Y-27632)でブロックし、上皮間葉系転換への影響を検討した。

その結果、Y-27632は、I型コラーゲン産生、平滑筋線維アクチン発現、細胞収縮能促進を抑制し、生体内では前嚢下白内障形成を抑制し、Rock 阻害剤が、上皮間葉系転換の抑制薬として可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epithelial mesenchymal transformation (EMT) of lens epithelial cells (LECs) brings about anterior subcapsular cataract (ASC). We have reported that TGF- β plays an important role and Rho is related to its intracellular signal transduction. The effect of Rock inhibitor (Y-27632) on EMT was evaluated.

Y-27632 inhibited production of type I collagen and α -smooth muscle actin, and cellular contactability of LECs in vitro and formation of ASC in vivo. These findings suggested that Rock inhibitor may be a candidate of protective drug of ASC.

研究分野：眼科学

キーワード：Rock inhibitor 上皮間葉系転換 水晶体上皮細胞 前嚢下白内障

1. 研究開始当初の背景

水晶体上皮細胞や網膜色素上皮細胞が、筋線維芽細胞に変化すると (epithelial-mesenchymal transition :EMT)、前嚢収縮や加齢黄斑変性における癒痕形成など重篤な障害をもたらす。これには、TGF- β が重要な働きを持つことが報告されているが、その制御はできていない。これらがコントロールできるようになれば、それらの疾患の治療に結び付くと思われる。

2. 研究の目的

TGF- β によって水晶体上皮細胞や網膜色素上皮細胞が、筋線維芽細胞に変化すると (epithelial-mesenchymal transition :EMT)、前嚢収縮や加齢黄斑変性における癒痕形成など重篤な障害をもたらす。そのため TGF- β の細胞内伝達系の解明が行われ、SMAD 系が重要と考えられてきたが、SMAD 系を抑制しても細胞の収縮力が変化しないなど矛盾点が指摘されてきた。われわれは、細胞骨格に重要な働きを持つ Rho に注目し、これのシグナル伝達系への関与を検討し、重要な働きをしている可能性を見出した。本研究では、さらに他の Rho やその標的阻害薬、SMAD 系の抑制の影響などを用い EMT における Rho の役割を明確にし、治療に結びつけたい。

3. 研究の方法

in vivo における水晶体上皮細胞の EMT を評価する方法は、TGF- β 2 刺激により誘発される I 型コラーゲン産生、平滑筋線維アクチン (α -SMA) 発現、コラーゲンゲル収縮への薬剤の効果の評価すること。in vitro では、前嚢下白内障形成への影響を評価した。さらに、水晶体上皮細胞の遊走に対する効果を検討した。

(1) I 型コラーゲン産生、平滑筋線維アクチン (α -SMA) 発現への Rock 阻害剤 (Y-27632) の効果

人水晶体上皮細胞の培養株である HLEB-3 を培養し、TGF- β 2 または、TGF- β 2 にて刺激し、Y-27632 を添加し培養後、PCR 法にて I 型コラーゲン産生、 α -SMA 発現への Y-27632 の効果を検討した。

(2) コラーゲンゲル収縮への Y-27632 の効果

ブタ水晶体上皮細胞をコラーゲンゲル内で培養し、Y-27632 を投与した。その後、TGF- β 2 を投与しコラーゲンゲルの収縮を刺激し、Control 群 (C 群)、TGF- β 2 添加群 (T 群)、Rock 阻害剤添加群 (Y 群)、TGF- β 2/Rock 阻害剤添加群 (Y/T 群) でその面積を比較した。

(3) 水晶体上皮細胞の遊走に対する Y-27632 の効果

水晶体上皮細胞を培養しサブコンクラフトの状態にて wound healing assay を用い、遊走能を評価した。継代した細胞が

ほぼコンフルエントの状態にて 200 μ ピペット先端にて線状に擦過し、10%血清のみ (コントロール群 (C 群))、5ng/ml TGF- β 2 (T 群)、10 μ M Y-27632 (Y 群)、TGF- β と Y-27632 (T+Y 群) を添加した培養液を加え、擦過部への水晶体上皮細胞の遊走を経時的に比較した。

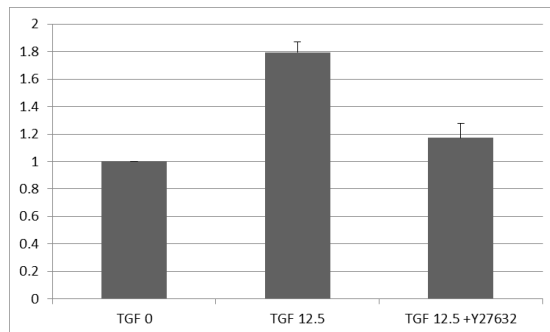
(4) in vitro における Y-27632 の点眼投与による前嚢下白内障形成に与える影響

マウスに対し、UV-B を照射し、前嚢下白内障を誘導した。コントロールでは、生食を点眼投与し、Y-27632 を点眼投与した群と、前嚢下白内障の形成状況を混濁面積の定量的解析にて行った。

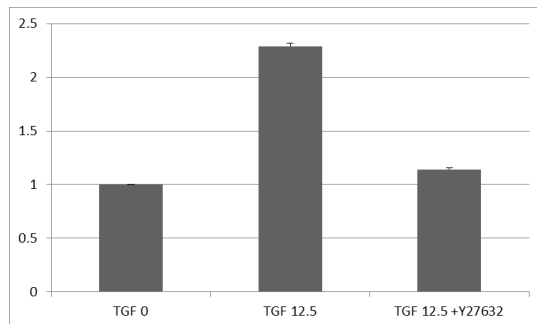
4. 研究成果

(1) Y-27632 は、TGF- β に誘導される水晶体上皮細胞の I 型コラーゲン産生、 α -SMA 発現を抑制する。

I 型コラーゲン産生は、12.5ng/ml TGF- β 2 により、1.79 倍に増加したが、Y-27632 投与により、1.17 倍に低下した。このことより、Y-27632 は、TGF- β に誘導される水晶体上皮細胞の I 型コラーゲン産生を抑制すると思われた。



一方、 α -SMA 発現に関しては、12.5ng/ml TGF- β 2 により、2.28 倍に増加したが、Y-27632 投与により、1.14 倍に低下した。このことより、Y-27632 は、TGF- β に誘導される水晶体上皮細胞の α -SMA 産生を抑制すると思われた。

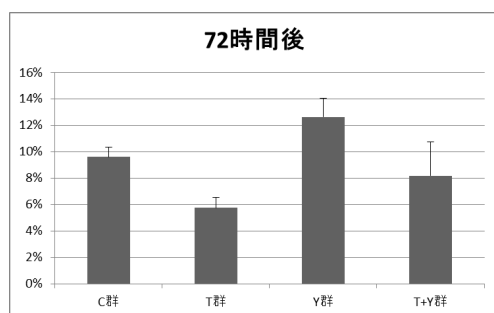


TGF- β は、水晶体上皮細胞の I 型コラーゲン産生、 α -SMA 発現を促進するが、この促進が、Rock 阻害剤である Y-27632 投与により抑制されたことは、TGF- β の EMT における細胞内伝達経路に Rho が関与していることを示唆している。

-SMA 発現は、EMTのマーカーとされているので、EMTを抑制することを示唆するが、実際に白内障の混濁を形成するのは、I型コラーゲンの沈着である。今回のデータによって、このI型コラーゲン産生が抑制されたことは、前嚢下白内障、白内障術後の前嚢混濁に対して、Rock 阻害剤の臨床的な効果の可能性を示唆するものと思われた。

(2) TGF- β によって促進されるコラーゲンゲル収縮を Y-27632 が抑制する

72 時間後にはコントロール (C) 群で、培養 0 時間目の $9.8 \pm 0.6\%$ まで収縮するが、TGF- β 群では $5.7 \pm 0.7\%$ に促進し、Y-27632 群では、 $12.6 \pm 1.4\%$ 、T+Y 群では $8.2 \pm 0.7\%$ となり、Y-27632 を投与している群がしていない群よりも収縮を抑制していた。



このことから、EMTによってもたらされる細胞収縮能に対しても Rock 阻害剤である Y-27632 は、抑制効果があることが考えられた。Rho は、アクチン重合に関与する因子であり、細胞が収縮する際には、アクチン重合やストレスファイバー形成が重要な働きを持つと考えられており、水晶体上皮細胞の EMT においても、Rho 経路の重要性が示された。

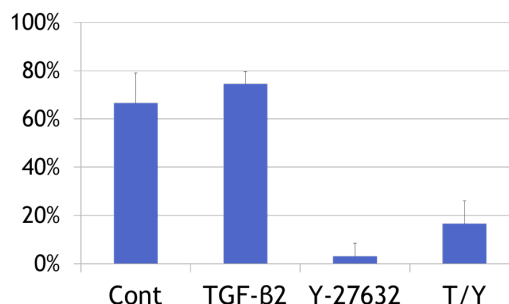
また、水晶体上皮細胞の EMT に伴って生じる細胞の収縮力の増加は、白内障術後の前嚢収縮や IOL 偏位と密接な関係が知られている。従って、多焦点眼内レンズなどの術後成績を安定させ、合併症を予防するための Rock 阻害剤の可能性を示唆するものと思われた。

(3) 水晶体上皮細胞の遊走に対する Y-27632 の効果

Rho は、ストレスファイバー形成に関与し、細胞の遊走に関与することが知られている。従って、Y-27632 は、水晶体上皮細胞の遊走能に影響を与える可能性が考えられる。

そこで、水晶体上皮細胞の遊走能に対する Y-27632 の効果を検討した。サブコンフルエントになった水晶体上皮細胞に対し、ピペット先端で細胞を剥離し、同部への細胞遊走を促し、剥離部の縮小状況を調べる wound healing assay を行った。この結果、6 時間後の創傷部の面積は、0 時間を 100% とすると

コントロール (C) 群で、 $66.6 \pm 12.3\%$ まで縮小するが、TGF- β 群では $74.5 \pm 5.2\%$ と遅延し、Y-27632 群では、 $3.1 \pm 5.3\%$ 、T+Y 群では $16.6 \pm 9.3\%$ となり、Y-27632 を投与している群がしていない群よりも創傷治癒が促進されていた。



一般に、Rho は、ストレスファイバー形成や遊走に関与するため、その阻害は、遊走を阻害すると思われるので、今回の結果と矛盾する。そこで、創傷部以外のシート状になっている部分を検討した。

その結果、Y-27632 群では、シート状部分の細胞密度の低下や、位相差顕微鏡所見で、敷石状の細胞配列の乱れが認められた。

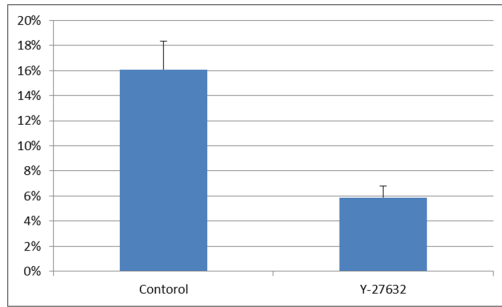
このことは、Y-27632 投与により、敷石状の部分の細胞間接着が弱まり、シート状の細胞全体が動き出したために、創傷治癒部の早期の減少につながった可能性が考えられた。

白内障術後の前嚢収縮の抑制を考えると、細胞の遊走が促進されることは、Y-27632 投与により水晶体上皮細胞の EMT が抑制されても、細胞の遊走が促進されることで、Elschnig 真珠などの後発白内障が増加してしまう可能性が考えられる。1) 2) の結果から、コラーゲン産生や収縮が抑制されても、水晶体上皮細胞の遊走が促進された場合他の合併症が生じる可能性が示唆されたわけであり、今後の重要な検討課題と思われた。(4) *in vitro* における Y-27632 の点眼投与による前嚢下白内障形成に与える影響

上記の結果を受け、Y-27632 は、水晶体上皮細胞の EMT を抑制する可能性が考えられた。そこで、生体内で EMT を抑制するかを検討する目的で、マウスの前嚢下白内障モデルで、Y-27632 の点眼投与の効果を検討した。

マウス片眼に UV 1200mV を 6 回に分けて照射し、前嚢下白内障を誘発した。この際に、コントロール群では、生理食塩水を点眼し、Y-27632 群では、Y-27632 を点眼投与した。

その結果、UV によって誘発された前嚢下白内障の面積は、Y-27632 の方が有意に少ない結果となった。



このことは、生体内でも Y-27632 が水晶体上皮細胞の EMT を抑制する可能性を示唆する。

前嚢下白内障は、アトピー性皮膚炎患者に伴う白内障や外傷性白内障に多く認められる病型であり、これらの予防薬としての Rock 阻害剤の可能性が考えられた。特に Rock 阻害薬は、別の製剤がすでに点眼薬として市販されており、その安全性が確かめられており臨床応用の可能性が考えられる。

ただ、今回の点眼投与実験では、短期的な投与であったためか、細胞の遊走への明らかな影響は認められなかった。しかしながら、水晶体上皮細胞は、前嚢下では敷石状に配列されており、もし(3)で示されたような現象が生じ、その配列が乱れ遊走が促進した場合には、皮質白内障や後嚢下白内障などを来す可能性も考えられ、長期投与による検討が必要と思われた。

また、近年の研究により、Rho の下流には MRTF などが関与することが知られている。これらの阻害剤もすでに一部開発されており、これらによりさらに選択的にコラーゲン産生などを抑制できるかもしれない。今後の検討課題と思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

黒坂大次郎 他、TGF- β による水晶体上皮細胞の収縮能亢進への Rho キナーゼ阻害剤の影響、2014 年 9 月 27 日、TKP ガーデンシティ品川 (東京、品川)

黒坂大次郎 他、TGF- β による水晶体上皮細胞のコラーゲン収縮への MRTF 阻害剤の影響、2015 年 4 月 16 日から 19 日、ロイトン札幌 (北海道、札幌)

黒坂大次郎 他、豚水晶体上皮細胞遊走に対する TGF- β と MRTF 阻害剤の影響、2016 年 4 月 7 日から 10 日、仙台国際センター (宮城、仙台)

〔図書〕(計 1 件)

Daijiro Kurosaka, Spribger, Cataract surgery: Maximizing outcomes through research, 2014, 127

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒坂 大次郎 (KUROSAKA, Daijiro)
岩手医科大学・眼科学・教授
研究者番号：20215099

(2) 研究分担者

橋爪 公平 (HASHIDUME, Kouhei)
岩手医科大学・眼科学・助教
研究者番号：50407095
玉田 邦房 (TAMADA, Kunifusa)
岩手医科大学・眼科学・助教
研究者番号：20583610

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

今泉利康 (IMAZUMI, Toshiyasu)