

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462672

研究課題名(和文) 後発白内障における水晶体上皮間葉系移行と水晶体再生制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of epithelial mesenchymal transition and regeneration of lens in posterior capsule opacity after cataract surgery.

研究代表者

久保 江理 (KUBO, Eri)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：10262619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、トロポミオシン(Tpm)1/2が、白内障術後の後囊混濁(PCO)や創傷治癒など上皮間葉系移行(EMT)の発症に関与していることを証明した。本研究では、FGF2によるTpm1/2抑制機序の一つとして、Fibroblast growth factor (FGF)2-MAPK経路の活性化が関与していることを明らかにした。また、Tpm2ヘテロノックアウトマウスを作成し、Tpm2が、LECのEMTや創傷治癒、水晶体混濁に関与していることを証明した。Tpm1/2は、PCOや創傷治癒などEMTの発症に関与しており、Tpm1/2の抑制はその進行予防に有用である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that Tpm1/2 was related to progression of rat PCO after cataract surgery and other processes of EMT such as wound healing. We showed that stress fiber formation in MLEC induced by EMT could be reversed by FGF2 and Tpm1/2 siRNA transfection. Our results revealed involvement of FGF2-MAPK pathway in FGF2-mediated inhibition of Tpm expression. Furthermore, we investigated the role of Tpm2 in PCO, EMT and lens opacity by generating Tpm2 hetero-knock-out mice. Since Tpm2 is involved in the progression of EMT in LEC wound healing its inhibition may suppress PCO.

研究分野：医歯薬学

キーワード：後発白内障 トロポミオシン 上皮間葉系移行 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

白内障術後には、眼内前房水中に、初期には Fibroblast growth factor (FGF)2 が上昇し、遅れて Transforming growth factor (TGF) β が上昇することが知られている。これらが、後発白内障 (後囊混濁: PCO) に関与することが知られている。PCO では、水晶体上皮細胞 (LEC) が、上皮間葉系移行 (EMT) により線維芽細胞様変化をきたし、線維化による白濁及びコラーゲン産生、遊走、水晶体嚢の収縮を示す一方、細胞増殖し水晶体の再生という2方向に変化する。PCO では、TGF β に誘導されるトポミオシン (Tpm) が上昇し、EMT や嚢収縮時間関与している可能性がある。われわれは、ラットに水晶体摘出 (嚢外摘出: ECLE) 手術をし、PCO を *in vivo* で再現することに成功している。このラットの実験にて、術直後の LEC においては、この Tpm の1と2の発現がきわめて低いが、術後1-2週間経過し、EMT により筋線維芽細胞様変化を誘導した LEC において、Tpm の発現が上昇することを確認し、報告している (Kubo E, et al. J Cell Mol Med. 2013)。また、ヒトの白内障術後の前嚢収縮し白濁した水晶体嚢においても、LEC の筋線維芽細胞様変化と同部位における Tpm1/2 が強く発現していることから、ヒト PCO においても Tpm がその発症に強く関与している可能性が示唆される。また、培養水晶体上皮細胞 (LEC) を用いた実験で、Tpm1/2 は、TGF β 2 により発現が上昇し、FGF2 投与により発現が抑制されることも明らかにしているが、Tpm1/2 とこれらサイトカインとの相互作用および PCO 発症における役割は明らかにはなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、PCO の進行に関与する Tpm1/2 の発現に対する FGF2 と TGF β 2 の制御機構を細胞遊走、ストレスファイバー形成、Ras-Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK), Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) 経路の活性化経路を解析し、解明する。さらに、Tpm2 の水晶体における役割を解明するために、CRISPR-Cas9 システムを用いた新しいゲノム編集技術により Tpm2 ノックアウト (KO) マウスを作成し、Tpm2 の白内障発症機構および正常水晶体の上皮から線維細胞への分化のメカニズムを解明する。さらに Tpm を標的とした LEC の EMT 制御と PCO 発症予防の可能性を、PCO モデルである創傷治癒モデルを用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) ラット後発白内障モデルにおける FGF2 と FGF receptor 2 (FGFR2) の発現変化と PCO 抑制の観察

ラット後発白内障モデルの、発症時期 (Day0, 1W, 2W)、病態変化での FGF2, FGF-R2 と Tpm1 と 2 の発現変化を免疫組織化学染色にて観察する。

(2) LEC の EMT 変化と細胞遊走能、ストレスファイバー形成機序の解明

培養 LEC では、TGF β 投与により Tpm の発現が上昇し、EMT が誘導され、FGF2 投与により Tpm の発現が抑制される。よって培養マウス LEC (MLEC) をもちいて、TGF β 2 および FGF2 投与による、ストレスファイバー形成と細胞遊走能への関与を観察する。また、siRNA により Tpm1/2 発現抑制し、ストレスファイバー形成を観察する。

(3) FGF2 の Tpm1/2 発現抑制機構の解明

培養マウス LEC とヒト LEC をもちい、FGF2 刺激 (0-10ng/mL) による Ras-Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK), Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) 経路の活性化を抗 ERK, p-ERK 抗体を用いたプロテインブロット法により確認する。FGFR antagonist (SU5402: SU) and MECK inhibitor (PD98059: PD) による Tpm 発現抑制効果を、プロテインブロット法にて確認する。

(4) Tpm2-KO マウスの作製

今回、Tpm2 の水晶体における役割を解明するために、CRISPR-Cas9 システムを用いた新しいゲノム編集技術により Tpm2 KO マウスを作成し、水晶体における Tpm2 の役割を解析した。Tpm2 KO は、ホモ (Tpm2^{-/-}) では胎生致死となり水晶体特異的なコンディショナル KO でも心拡大などが報告され、作製が困難である。よって、Tpm2 ヘテロ KO マウス (Tpm2^{+/-}) を作製の後、後発白内障モデルとして、27 ゲージ針刺入による水晶体創傷治癒モデルマウスを作成する。

4. 研究成果

(1) ラット後発白内障モデルにおける FGF2 と FGFR2 の発現変化と PCO 抑制の観察

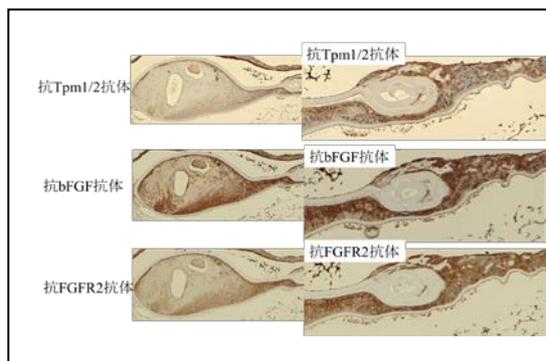


図1: ラット PCO モデル免疫染色像: ECLE 術後、2週間 (W) 目の赤道部 Lens Capsule

図1に示すように、PCO 組織中での Tpm, FGF2, FGFR2 の発現をみると、FGF と FGFR2 は再生水晶体線維内や中央に遊走していく LEC に強く発現しており、Tpm1/2 は再生水晶体にはほとんど発現がない代わりに、筋線維芽細胞様変化を生じた LEC に強く発現し

ている傾向が観察された。しかし、組織染色では Tpm と FGF2 発現部位が明確に分かれてはいなかった。

(2) LEC の EMT 変化と細胞遊走能、ストレスファイバー形成機序の解明

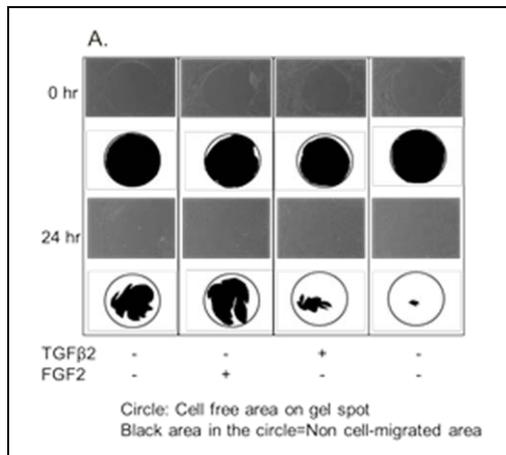


図 2: TGF β 2, FGF2 投与における細胞遊走率

培養 MLEC に対し、TGF β 2 投与により細胞の遊走は上昇したが、TGF β 2 ± FGF2 投与では、細胞の遊走能がより亢進していた(図 2)。よって FGF2 による、Tpm1/2 の抑制が遊走亢進に関与している可能性が示唆された。

通常の培養 MLEC では、細胞内のストレスファイバー形成は見られないが、MLEC への TGF β 2 投与により細胞内にストレスファイバーが形成された。これは細胞の EMT 変化を誘導している。しかし、FGF2 の同時投与によりストレスファイバー形成が有意に減少した。さらに、Tpm の Tpm1/2 siRNA を MLEC にトランスフェクションさせると TGF β 2 により誘導される、ストレスファイバー形成が抑制されていた。これらの結果より、TGF β 2 投与により細胞内に形成されるストレスファイバーは、Tpm1/2 誘導されており、FGF2 による Tpm1/2 発現抑制により、ストレスファイバー形成も抑制されたことが明らかになった。つまり、EMT により生じるストレスファイバー形成には Tpm1/2 が重要な役割を担っていることが明らかになった。

(3) FGF2 の Tpm1/2 発現抑制機構の解明

MLEC への FGF 投与により、MAPK の活性化が生じているか、Erk のリン酸化をプロテインブロット法にて確認した。培養 MLEC に、FGF2 を投与後、リン酸化された Erk の発現が上昇しており、Erk のリン酸化つまり MAPK の活性化が生じていた。一方 TGF β 2 を単独投与しても Erk のリン酸化はみられなかった(図 3)。

しかし、MAPK 活性化阻害剤の PD098059 (PD)

と FGF 受容体拮抗薬 SU5402 (SU) を投与すると、FGF2 に誘導される Tpm1 の発現抑制が阻害された(図 4)。

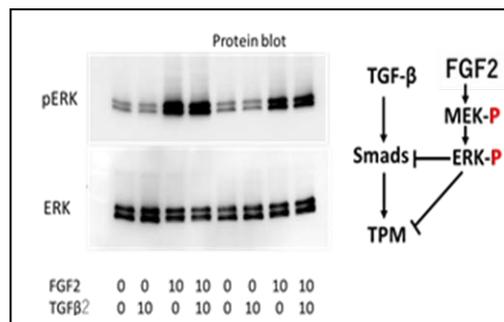


図 3: FGF2 投与による MAPK の活性化

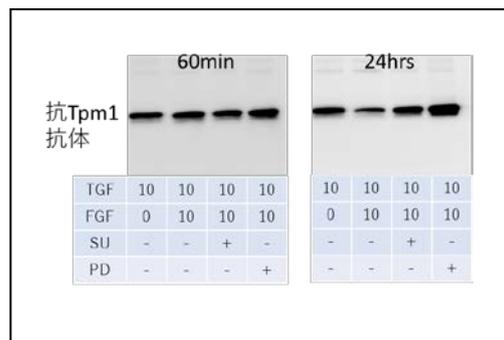


図 4: ERK のリン酸化の抑制と Tpm 発現変化

これらの結果より、MAPK/ERK 経路の活性化により、FGF は Tpm の発現を抑制していることが明らかになった。MAPK 阻害薬は、LEC において EMT、細胞遊走などを抑制するため、PCO 抑制効果も期待できるかもしれない。

(4) Tpm2^{+/-}における水晶体組織変化と創傷治癒への影響

7 週齢の Tpm2^{+/-}では、白内障の混濁や組織変化が生じていなかったが、24 週齢の Tpm2^{+/-}では、水晶体中央に前囊下混濁様変化や水晶体皮質浅層にリング状の混濁を認めた。WT では、7、24 週齢ともに水晶体に変化は見られなかった。マウスにおける Tpm2 のノックアウトは、加齢による白内障を発症していた。この結果より、Tpm2 は水晶体線維の分化に重要な働きをしている可能性が示唆された。

PCO モデルとして、水晶体創傷治癒モデルを用いた。Tpm2^{+/-}とコントロールのワイルドタイプマウス (WT) に角膜より針刺し、水晶体に穿孔創を作成し、創傷治癒変化を観察した。創傷治癒に伴う EMT の組織変化である線維芽様組織変化 (赤で囲んだ部分) が、WT に比較して Tpm2^{+/-}では、明らかに少なく、Tpm2 は、LEC の EMT や白内障術後の後発白内障発症に関与していることを証明した(図 5)。

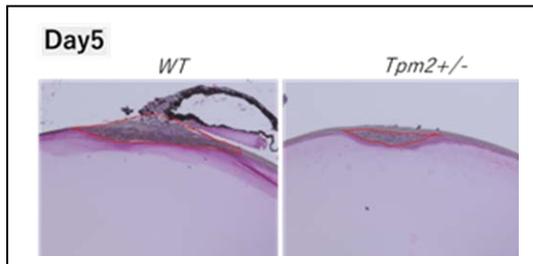


図5：マウス創傷治癒モデルにおける組織変化

これらの結果より、Tpm2の抑制によりPCOやEMTが予防できる可能性がある。また、Tpm2のノックアウトは水晶体混濁を誘発していたことより、Tpm2は正常の水晶体上皮の線維細胞への分化などに重要な働きをしている可能性が示唆されるが、さらなる機能解析が必要と思われた。

<引用文献>

① Kubo E, Hasanova N, Fatma N, et al. Elevated tropomyosin expression is associated with epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells. *J Cell Mol Med*. 査読有 2013; 17(1):212-21

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 Kubo E, Shibata S, Shibata T, Kiyokawa E, Sasaki H, Singh DP.、FGF2 antagonizes aberrant TGF β regulation of Tropomyosin: Role for posterior capsule opacity.、*J Cell Mol Med*、査読有、21(5)、2017、916-928. doi: 10.1111/jcmm13030.

[学会発表] (計 5件)

① Eri Kubo. Tropomyosin2: Its relationship with age-related-cataract and posterior capsular opacification. XXII Biennial Meeting of the International Society of Eye Research. 2016/9/25-9/29, 京王プラザホテル(東京都新宿区).

② Eri Kubo, Tepei Shibata, Shinsuke Shibata, Hiroshi Sasaki, Etsuko Kiyokawa, Masahito Ikawa, Dharendra P Singh. Knock-Down of Tropomyosin 2 Created By CRISPR-CAS9 in Mouse Induces Age-Related-Cataract. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2016. 2016/5/1-5/5. Washington State Convention Center, Seattle, USA.

③ Eri Kubo. Tropomyosin and its relationship with posterior capsular opacity. 日本眼科学会総会. 2016/4/7-4/10. 仙台国際センター・東北大学百周年記念会館(宮城県, 仙台市).

④ Eri Kubo, Shinsuke Shibata, Noko Shibata, Tepei Shibata, Etsuko Kiyokawa,

Hiroshi Sasaki, Dharendra P Singh. Gene Expression Profiling of Lens Epithelial Cells in Rat Posterior Capsular Opacity Model in Vivo. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2015. 2015/5/3-5/7. Colorado Convention Center, Denver, USA.

⑤ Eri Kubo. Regulation of Epithelial-mesenchymal Transition (EMT): Suppression of Posterior Capsular Opacification (PCO). Asia- Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2015/2/19-2/19. パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 江理 (KUBO, Eri)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：10262619

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

吉野 綾香 (YOSHINO, Ayaka)

落合 香奈 (OCHIAI, Kana)