

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861470

研究課題名(和文) 眼内増殖疾患の病態解析および抑制

研究課題名(英文) Pathogenesis of proliferative intraocular disease

研究代表者

馬詰 和比古 (Umazume, Kazuhiko)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：80532209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：増殖硝子体網膜症の増殖膜の構成細胞の一つであるミュラー細胞の関与をin vitroしたて確認した。豚培養muller細胞を25%硝子体液を含有した培養液で継代したところ、線維芽細胞および筋線維芽細胞様に形質変化を来し、in vitro collagen matrix contraction assayで収縮を来すことを確認した。また、チロシンキナーゼ阻害薬であるDasatinibで増殖硝子体網膜症の病態の中心である細胞の遊走、増殖、収縮をミュラー細胞においても抑制を来すことを確認した。

研究成果の概要(英文)：We investigated pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy using muller cells. Muller cell could change phenotype as fibroblast/myofibroblast in 25 vitreous-DMEM as well as RPE cells. Dasatinib, a tyrosine kinase inhibitor, inhibited migration, proliferation and contraction in muller cells.

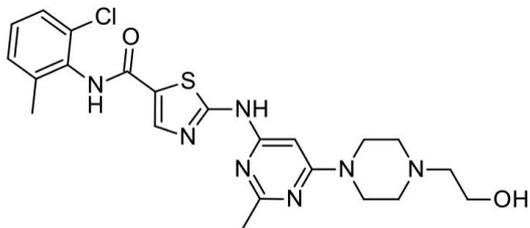
研究分野：眼科 網膜疾患

キーワード：増殖硝子体網膜症 チロシンキナーゼ阻害薬 ミュラー細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は豚培養網膜色素上皮細胞を用いた増殖硝子体網膜症モデルでチロシンキナーゼ阻害薬であるダサチニブが線維性増殖膜の収縮抑制を来すことを報告してきた。ヒト増殖硝子体網膜症の増殖膜の構成細胞は網膜色素上皮細胞、グリア細胞、マクロファージ、線維芽細胞、筋線維芽細胞であることは確認をされている。これまでに確立した *in vivo* 増殖硝子体網膜症モデルでは、グリア細胞を除く細胞の関与を証明したが、グリア細胞の関連に関しては不明な点が多かった。そこで豚ミューラー細胞を用いた *in vitro* 増殖硝子体網膜症モデルで Src family kinase (SFK), Focal adhesion kinase のリン酸化に着目して検討することとした。



#### ・ Focal adhesion kinase

Focal adhesion kinase (FAK) は 125kD の non-receptor チロシンキナーゼであり、Y397、Y576/577 のリン酸化部位を有している。FAK のサブファミリーは PYK2 であり、FAK および PYK2 の阻害薬は PF573228 (FAK のみ) と PF431396 (FAK/PYK2 相互阻害薬) である。

### 2. 研究の目的

豚培養ミューラー細胞を使用した *in vitro* PVR モデルにおいてチロシンキナーゼ阻害薬であるダサチニブの増殖膜収縮抑制機序に FAK などの下流タンパクがどのように関与しているか検討する。

### 3. 研究の方法

#### In vitro contractile membrane formation Assay

24well のプレートに 2.5mg/dl のコラーゲンを 400  $\mu$ l ずつ注入

培養ミューラー細胞を  $1.0 \times 10^5$ /well を播種

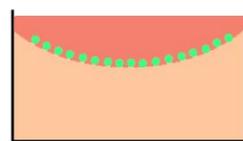
25%豚硝子体含有の DMEM 培養液で細胞培養。

3 日後にコラーゲンを培養プレートから剥離させる。

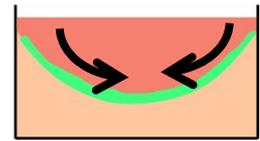
4 時間後に剥離したゲルを撮像、image J を用いてゲルの収縮率を測

定する。

$$\frac{[(\text{size of well}) - (\text{size of gel})]}{(\text{size of well})} \times 100$$



< 剥離前 >



< 4 時間後 >



#### Dasatinib affects cell morphology and actomyosin stress fibers

4well の Chamber slide 上にコラーゲン 1 でコートしたものに 4 回継代した豚培養ミューラー細胞を 25%豚硝子体含有 DMEM で培養し、24 時間までの間に経時的に 4%PFA で固定。それを phalloidin によりアクチン染色しストレスファイバーの変化を確認する。

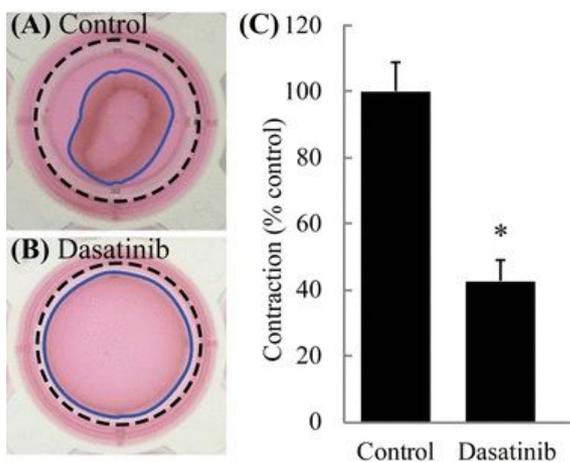
#### ウェスタンブロット法

豚ミューラー細胞をコラーゲン でコートした 35mm dish に 25%豚硝子体含有培養液の中で 3 日間培養。ダサチニブは最後の 24 時間で添加。細胞は RIPA buffer で溶解し、タンパク濃度は BCA assay にて決定した。

ウエスタンブロット法は、一次抗体として rabbit polyclonal anti-PY397-FAK Ab, anti-PY576-FAK Ab, anti-PY402-PYK2 Ab, and anti-PY580-PYK2 Ab, and mouse monoclonal anti-FAK Ab and anti-PYK2 Ab を使用した。

#### 4. 研究成果

##### ミューラー細胞を使用した増殖膜収縮解析



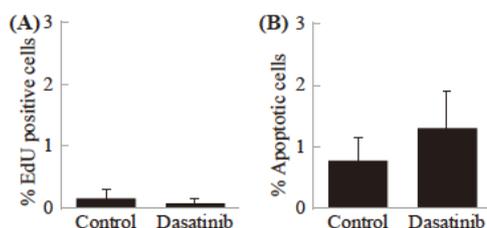
ダサチニブはミューラー細胞由来の増殖膜の収縮を抑制した。

A) コントロール群 (DMSO のみ) B) ダサチニブ付加群

C) ダサチニブ付加により有意差を持ってコラーゲンゲルの収縮が抑制されている。

p<0.05

##### コラーゲンゲル上での増殖能解析とアポトーシス解析

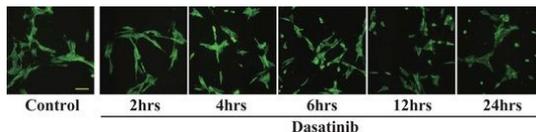


A) コラーゲン上で増殖能を示す Edu 陽性細胞数はコントロール群とダサチニブ群で有

意差はなかった。

B) TUNEL 染色で確認したアポトーシス解析において、両群間に有意差は見られなかった。

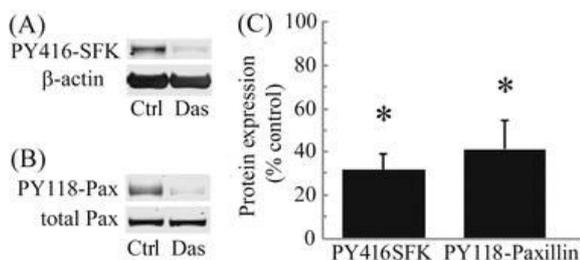
##### Dasatinib affects cell morphology and actomyosin stress fibers



コラーゲンゲル上でのダサチニブ付加による細胞形態変化を時間経過とともに解析した。

6 時間程度で著しいアクチンストレスファイバーの変化が確認された。

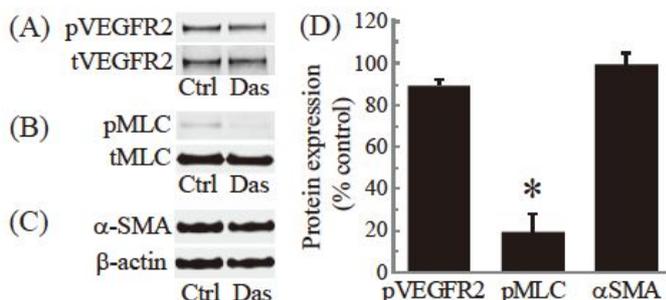
##### Dasatinib alters phosphorylation status of focal adhesion proteins



A) ウエスタンブロット法において Src Family kinase のリン酸化が (PY416-SFK) ダサチニブにより低下していることが確認された。

B) ウエスタンブロット法において Paxillin のリン酸化 (PY118-Pax) がダサチニブにより低下していることが確認された。

##### Effect of dasatinib on the proteins involved in contraction



ミューラー細胞由来の増殖膜においてダサチ

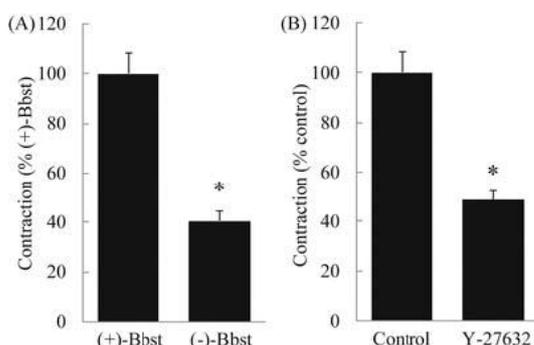
ニブの効用が主にどこに作用しているかを検討。

A)phospho-VEGFRとVEGFR2の間にはダサチニブ付加により明らかな有意差はなかった。

B) 一方で phospho-MLC と total MLC の間にはダサチニブ付加により明らかな有意差が生じた。

C) Dasatinib の付加により SMA の発現には有意差はなかった。

### Effect of inhibitors of ROCK and myosin on matrix contraction by Müller cells



MLC(myosin light chain)がミュラー細胞由来の収縮に関与していることが判明したので、さらに上流の ROCK inhibitor による変化を検討した。

A)Myosin inhibitor の阻害薬である Bebbistatin に収縮が強く生じた

B)ROCK inhibitor である Y-27632 により収縮抑制が生じた。

ミュラー細胞由来の増殖膜の収縮にはダサチニブが MLC、SFK および Paxillin のリン酸化を阻害しており、これらのタンパクが収縮機構に大きく関与していることが判明した。今後、これらのタンパクを選択的に阻害する薬剤が増殖硝子体網膜症の治療保護薬として期待される。

#### 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. Dasatinib affects focal adhesion and myosin regulation to inhibit matrix

contraction by Müller cells.

Tsukahara R, Umazume K, Yamakawa N, McDonald K, Kaplan HJ, Tamiya S.

Exp Eye Res. 2015 Oct;139:90-6. doi:

10.1016/j.exer.2015.07.019. Epub 2015 Aug

1 査読有り

〔学会発表〕(計 1件)

1. ARVO 2016

The role of FAK in fibrotic matrix contraction contraction by differentiated Muller cells.

R.Tsukahara, K.Umazume, N.Yamakawa,

T.Iwasaki, H.J.Kaplan, H.Goto

〔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〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

馬詰 和比古 (Umazume, Kazuhiko)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80532209

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )