

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791862

研究課題名(和文) PKC デルタを標的とした増殖硝子体網膜症の治療

研究課題名(英文) PKC-delta targeted treatment of proliferative vitreoretinopathy

## 研究代表者

横山 勝彦 (Yokoyama, Katsuhiko)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：90464461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：増殖性硝子体網膜症は、裂孔原性網膜剥離術後の重篤な合併症で、コラーゲンを含む線維性の増殖膜が網膜下および硝子体中に形成されることで生じるとされており、現在、網膜色素上皮細胞が増殖膜形成に関与しているといわれている。今回、眼内増殖膜に特異的に発現するPKC- に着目し、網膜色素上皮細胞のI型コラーゲン産生機構における役割について解析し、ヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE-19)を用いた培養実験によって、PKC- はARPE-19における I型コラーゲンの産生を促進する働きがあることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Proliferative vitreoretinopathy (PVR) is severe complication after surgery of rhegmatogenous retinal detachment. Proliferative membrane, which is formed in the vitreous cavity and on the inner or outer surfaces of the neural retina, causes of PVR. It is thought that retinal pigment epithelium (RPE) cells could contribute to formation of proliferative membrane through production of collagen. In this study, we focused on PKC- which specifically express in proliferative membrane and analyzed about role of PKC- on collagen production system in RPE cells. For in vitro experiment, human RPE cell line (ARPE-19) was used. As results, we clarified that PKC- increase the type collagen production in ARPE-19 cells. We expect that our findings contribute to development of novel therapeutic medicine targeting PKC- for PVR.

研究分野：眼科学

キーワード：増殖硝子体網膜症 PKC TGF- RPE I型コラーゲン

## 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た病態である。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で構成され、線維性コラーゲン (主に、I 型コラーゲン) 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- 2 (TGF- 2) が高濃度に存在することから TGF- 2 が PVR 病態形成の Keymediator と考えられているが、その分子メカニズムの解明はまだ不十分である。

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- 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 TGF- 2 のシグナル伝達経路に關与する分子を明確にする必要がある。

我々は、TGF- 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することを示し、その細胞内シグナル伝達経路には主要な Smad 経路だけでなく、p38mitogen-activatedprotein kinase(p38MAPK)や Rho-kinase も關与し、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報告した。さらに上記経路に加え、Phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)の關与も報告した (Yokoyama K, Kimoto K, et al.Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.. 2011)。

## 2. 研究の目的

今回、眼内増殖膜に特異的に発現する PKC- に着目し、網膜色素上皮細胞の I 型コラーゲン産生機構における役割について解析し、ヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE-19)を用いた培養実験によって、PKC- を阻害することで、増殖性硝子体網膜症の新規治療法 (分子標的治療) の新たな標的分子となりうるかを検証した。

## 3. 研究の方法

以下についての検討を行った。

1) 培養網膜色素上皮細胞において、TGF- 2 で誘導される線維性コラーゲン (I 型コラーゲン) の発現が、PKC- 阻害剤によって抑制できるか否かを I 型コラーゲンのプロモーター活性や mRNA 発現およびタンパク産生を指標に検討する。

2) I 型のプロモーター領域に結合する TGF- 2 関連転写因子を解析し、よりピンポイントな標的因子を同定する。

TGF- 2 の主要なシグナル伝達経路は Smad 系と考えられている。それ故、PKC- と Smad とのクロストークを解析する必要がある。各阻害剤の Smad2/3 のリン酸化に与える影響や Smad4 の核内移行に与える影響を Western blot 法で調べ、PKC- と Smad とのクロストークを検討する。さらに Smad の DNA 結合エレメント: (CAGA) を 12 個連続させた Smad 反応性プロモーター: (CAGA)12 をルシフェラーゼ遺伝子の上流につないだプラスミド (作成済み) を用いて Smad の転写活性に対する各阻害剤の影響を解析する。次に Smad のリンカー部位のリン酸化に与える影響を

各種リン酸化抗体を使用して Western blot 法で確認する。

#### 4. 研究成果

結果を示す。網膜色素上皮細胞内の TGF- $\beta$ 2 シグナル伝達経路で誘導される I 型コラーゲンの発現調節に PKC- $\delta$  阻害剤が与える影響を検討した。

培養網膜色素上皮細胞を TGF- $\beta$ 2 で刺激すると、PKC- $\delta$  が活性化されることを抗リン酸化 PKC- $\delta$  抗体を用いた Western blot 法で確認した。一方、総 PKC- $\delta$  タンパク質発現量には顕著な変化は確認されなかった。

I 型コラーゲン 2 鎖の変動を real-time RT-PCR 法で比較検討したところ、それぞれの mRNA の発現は PKC- $\delta$  阻害剤によって抑制された。

抗ヒト I 型コラーゲン抗体を用いた免疫細胞染色を用いて PKC- $\delta$  阻害剤のタンパク質産生への影響を検討したところ、TGF- $\beta$ 2 添加により増加した I 型コラーゲンタンパク質発現は PKC- $\delta$  阻害剤により抑制された。

ルシフェラーゼレポーターアッセイによって検討したところ、TGF- $\beta$ 2 で誘導される I 型コラーゲン 2 鎖の転写活性は PKC- $\delta$  阻害剤によって抑制された。さらに、TGF- $\beta$ 2 の主要なシグナル伝達経路である Smad 系と PKC- $\delta$  とのクロストークを解析するため、Smad 結合エレメント (CAGA) を 12 個連結させた Smad 反応性プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に連結したプラスミドを用いて、Smad の転写活性化能に対する PKC- $\delta$  阻害剤の影響を解析した。

その結果、PKC- $\delta$  阻害剤によるルシフェラーゼ活性の低下は認められなかった。

以上の結果から TGF- $\beta$ 2 によって刺激された培養網膜色素上皮細胞において、PKC- $\delta$  は Smad 非依存的に I 型コラーゲン 2 鎖のプロモーター活性に関与する可能性が示唆された。

今回、眼内増殖膜に特異的に発現する PKC- $\delta$  に着目し、網膜色素上皮細胞の I 型コラーゲン産生機構における役割について解析し、ヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) を用いた培養実験によって、PKC- $\delta$  は ARPE-19 における I 型コラーゲンの産生を促進する働きがあることが明らかとなった。

PKC- $\delta$  は、増殖性硝子体網膜症の新規治療法 (分子標的治療) の新たな標的分子となりうる。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
出願年月日：  
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  
横山 勝彦 (Yokoyama, Katsuhiko)  
大分大学・医学部・助教

研究者番号：90464461

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：