

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11465

研究課題名（和文）TGF-による水晶体上皮細胞の上皮間葉系移行におけるMRTFの役割

研究課題名（英文）A role of MRTF in epithelial-mesenchymal transition 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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：水晶体上皮細胞が、TGF-βという因子によって上皮細胞から筋芽細胞様に変化して、白内障の一つである前嚢下白内障を生じる。TGF-βの信号が、どのような経路で伝わっていくのかを調べ、そこを止められれば、前嚢下白内障を予防できる可能性がある。

我々は、MRTFとRhoの経路が、これにかかわっていると考え、この経路を止める薬剤などを投与して、細胞の変化を止められることを見出した。さらに、動物モデルで、点眼投与すると白内障が予防できた。

これらの経路は、水晶体上皮細胞以外にも、網膜色素上皮細胞でも働いていることがわかり、白内障以外の重症網膜剥離や加齢黄斑変性の治療につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白内障は、アトピー性皮膚炎患者の約1割に生じ、手術治療が必要となるが、手術を行っても老眼になるなど、十分な視機能は取り戻せず、予防が期待される代表的な白内障である。一方、加齢白内障は、手術により相当の視機能を取り戻すが、術後に後発白内障が2～3割に生じ、視機能が低下する。これらの主な病型に前嚢下白内障や前嚢混濁がある。これは、水晶体を作る水晶体上皮細胞が、異常に変化したために生じるもので、その予防法ができればその意義は高い。

我々は、水晶体上皮細胞内に起こるの経路の一つを解明し、さらにその阻害剤を点眼薬として用いることにより、前嚢下白内障を予防できることを動物実験で証明した。

研究成果の概要（英文）：Lens epithelial cells change from epithelial cells to myofibroblast-like cells by a factor called TGF-β, resulting in anterior subcapsular cataract, which is one of the cataracts. If we investigate how the TGF-β signal is transmitted and block its signal, it may be possible to prevent anterior subcapsular cataract.

We thought that the MRTF and Rho pathways are involved in this, and found that it is possible to stop the changes in lens epithelial cells by administering drugs that block this pathway.

Furthermore, in an animal model, cataract formation could be prevented by topical administration of these drugs.

These pathways are found to work not only in lens epithelial cells but also in retinal pigment epithelial cells, which may lead to treatment of severe retinal detachment and age-related macular degeneration other than cataract.

研究分野：眼科学

キーワード：水晶体上皮細胞 MRTF TGF-β Rock 白内障

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) TGF- β によって水晶体上皮細胞が、筋線維芽細胞に変化する (epithelial-mesenchymal transition :EMT) と、前嚢下白内障や白内障術後の前嚢混濁などの障害をもたらす。その予防のため EMT における 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たが、近年 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。我々は、細胞骨格に重要な働きを持つ Rho に注目し、Rock 阻害剤は EMT に伴うコラーゲン産生などの現象が抑制させることを見出した。この Rho のさら下流には、さまざまな因子の転写に関わる MRTF が存在し、MRTF が乳腺や肺上皮細胞における EMT に関与することが報告されている。前嚢下白内障は、アトピー性皮膚炎を伴う若年者の 10% に生じる白内障の主要な病型である。この年代の患者にたとえ白内障手術を行っても、術後に老視になるなど、視機能の回復には限界があり、予防法が最も望まれる白内障の代表例である。

(2) TGF- β による水晶体上皮細胞の EMT が、網膜色素上皮細胞に生じると、増殖性網膜硝子体症や加齢黄斑変性の一因となる。前者は、網膜剥離を難治性とし、さらに後者は、視細胞を変性させるなどし、重篤な視力障害につながる。後者は、近年の高齢化に伴い患者の増加が著しい疾患であり、一度網膜色素上皮細胞に大きな変化が生じると iPS 細胞などを用いた再生医療での治療法がなく、実際にその臨床応用にはまだハードルが高く、費用も掛かることから、予防できる方法の意義は大きい。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、EMT に伴うさまざまな因子の転写に関わる MRTF に注目し、その水晶体上皮細胞の EMT における役割を明確にし、治療法の開発に結びつることを目的とする。

(2) 水晶体上皮細胞に生じた上記の過程が、網膜色素上皮細胞でも生じるかの確認を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞は、ヒト水晶体上皮細胞株である HLE-B3 および網膜色素上皮細胞株である ARPE-19 を用いた。

(2) MRTF-A の細胞局在の評価は、TGF- β 刺激および MRTF-A 阻害剤である CCG-203971、ROCK 阻害剤(Y-27632)を添加した場合としない場合で、蛍光免疫細胞染色を用いて解析した。さらにそれらの核内、細胞質の局在を統計的に解析した。

(3) TGF- β による平滑筋線維アクチンの発現、I 型コラーゲン産性増加に対する MRTF-A 阻害剤である CCG-203971、ROCK 阻害剤(Y-27632)の影響は、それぞれの添加による平滑筋線維アクチン、I 型コラーゲンの mRNA 発現の増減を、PCR 法にて評価した。

(4) UV 照射によるマウスでの前嚢下白内障に対する ROCK 阻害剤(Y-27632)の影響では、3 週間 UV 照射と生理食塩水の点眼または UV 照射と ROCK 阻害剤(Y-27632)の 1 日 2 回点眼投与した群で、前嚢下白内障の生じた面積を計測し比較した。また、それらの混濁が EMT によるものであることを検証する目的で、混濁部の平滑筋線維アクチン、I 型コラーゲンたんぱく質の存在を免疫組織化学的に調べた。

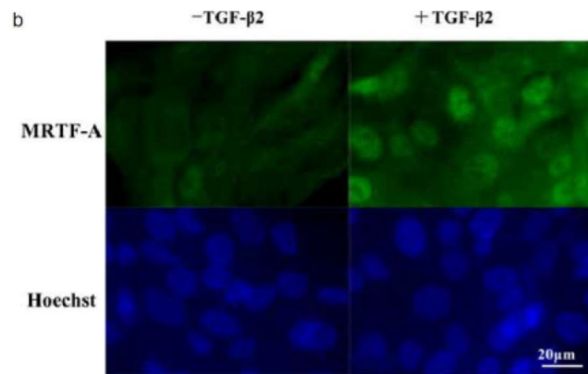


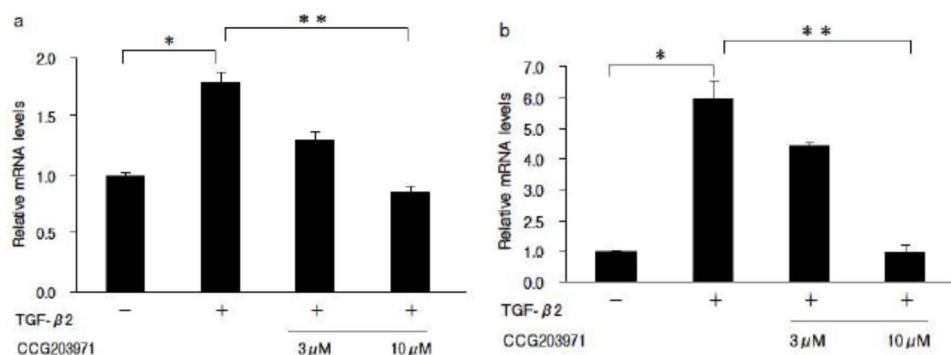
図 1 MRTF-A の局在

4. 研究成果

(1) 水晶体上皮細胞における MRTF の役割

MRTF-A の核内移行への MRTF-A 阻害剤 CCG-203971 の効果を検討したものは、ヒト水晶体上皮細胞株である HLE-B3 において TGF- β は MRTF-A を核内移行させたが、MRTF-A 阻害剤 CCG-203971 は、それを抑制した (図 1)。

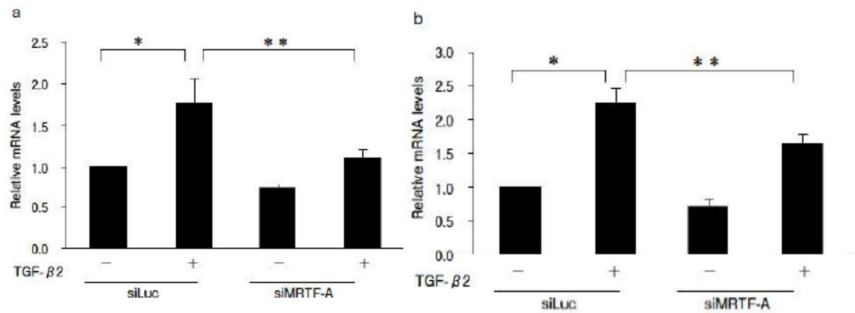
MRTF-A 阻害剤である CCG-203971 を用いて、ヒト水晶体上皮細胞株である HLE-B3 における TGF- β 刺激への影響を検討したものは、TGF- β は、平滑筋線維アクチン



(図 2) a: -SMA b: I 型 collagen の発現

の発現(-SMA)、I型コラーゲン産性を増加させたが、CCG-203971は、この増加を抑制した(図2)

siRNAによりMRTF-Aをknock downさせた際の影響を検討したものは、MRTF-Aに選択的なsiRNAを設計し、HLE-B3においてMRTF-Aをknock downできることをまず検証した。このsiRNAによりMRTF-Aをknock downさせた際のTGF- β 刺激によるHLE-B3の-SMA発現、I型コラーゲン産生の増加に対する影響を検討したが、MRTF-Aのknock downによりこれらの増加は有意に抑制された(図3)

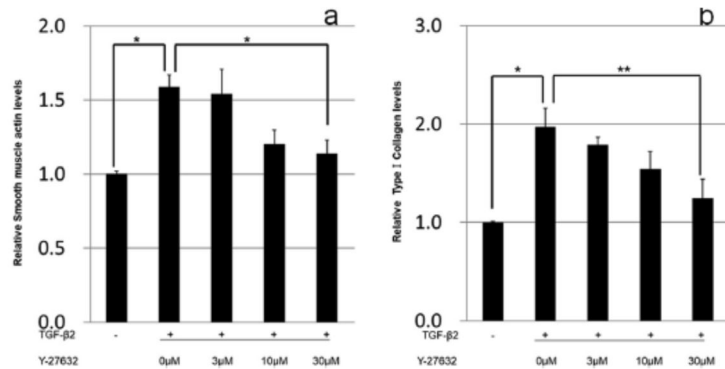


(図3) a: -SMA b: I型collagenの発現

以上より、MRTF-Aが、水晶体上皮細胞における上皮間葉系移行(EMT)、I型コラーゲン産生において重要役割を担っていることが示唆された。

(2) 水晶体上皮細胞のEMTにおけるROCK阻害剤の治療薬としての可能性の検討

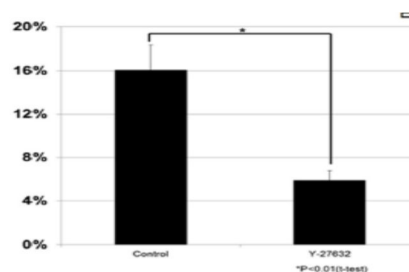
培養ヒト水晶体上皮細胞株におけるTGF- β 2およびROCK阻害剤(Y-27632)のI型コラーゲンの発現への影響を調べた。その結果、TGF- β 2は、I型コラーゲンmRNA発現を増加させたが、Y-27632は用量依存的にその増加を阻害した(図4)



(図4) a: I型collagen b: -SMAの発現

in vivoにおける前嚢下白内障形成に対するY-27632の影響を検討した。

初めに、紫外線(UVR)-Bによりマウス前嚢下に白濁を誘導したが、免疫組織学的に、同部には-平滑筋アクチンおよびI型コラーゲンが発現しており、前嚢下白内障が形成されたことが実証された。このモデルを用いて、Y-27632点眼投与前嚢下白内障形成に対する影響を調べた。照射に誘導されていた水晶体の混濁面積は、Y-27632点眼投与前群の方が少なく、この前嚢下白内障形成はY-27632の1日2回投与により有意に抑制された(図5)



(図5) 白内障程度

これらの結果より、ROCK阻害剤の点眼投与は前嚢下白内障の形成を予防する可能性を示唆した。

(3) 網膜色素上皮細胞におけるMRTF-A及びROCK阻害剤の影響の検討

MRTF-Aの核内移行へのMRTF-A阻害剤CCG-203971の効果を検討したものは、ヒト網膜色素上皮細胞においてTGF- β はMRTF-Aを核内移行させたが、MRTF-A阻害剤CCG-203971は、それを抑制した。

MRTF-A阻害剤であるCCG-203971を用いて、ヒト網膜色素上皮細胞におけるTGF- β 刺激への影響を検

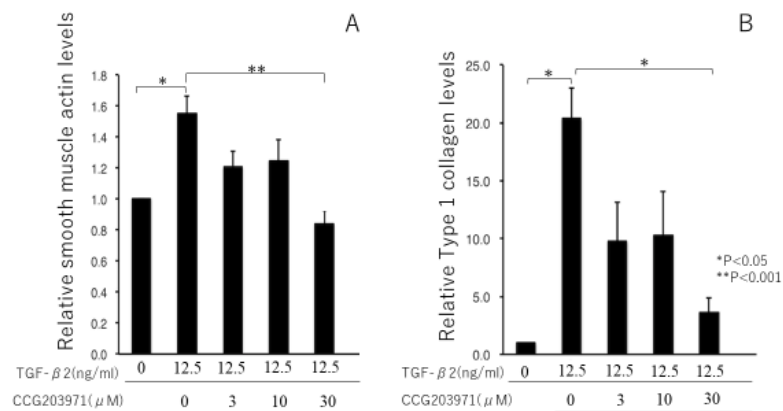


図6 TGF- β による α -SMA、COL1発現におけるCCG203971の影響(網膜色素上皮細胞)

討したものでは、TGF- β は、平滑筋線維アクトチンの発現(α -SMA)、I型コラーゲン産性を増加させたが、CCG-203971 は、この増加を抑制した(図6)。

ヒト網膜色素上皮細胞におけるTGF- β 2 およびROCK 阻害剤(Y-27632)の平滑筋線維アクトチンの発現(α -SMA)、I型コラーゲンの発現への影響を調べた。その結果、TGF- β 2 は、I型コラーゲン mRNA 発現を増加させたが、Y-27632 は用量依存的にその増加を阻害した(図7)。

MRTF-A の核内移行へのROCK 阻害剤(Y-27632)の効果を検討したものは、ヒト網膜色素上皮細胞においてTGF- β はMRTF-A を核内移行させたが、ROCK 阻害剤(Y-27632)は、それを抑制した(図8)。

以上の結果から、ROCK 阻害剤は、TGF- β による α -SMA、I型コラーゲンの発現の増加を抑制したが、同時にMRTF-A の核内移行を抑制していた。

これらのことは、水晶体上皮細胞だけでなく網膜色素上皮細胞においてもROCK/MRTF の系がEMTには重要と思われた。前嚢下白内障は、ROCK 阻害剤の点眼投与により抑制されたことから、網膜にいても、ROCK 阻害剤などの投与により治療が可能な可能性が示唆された。

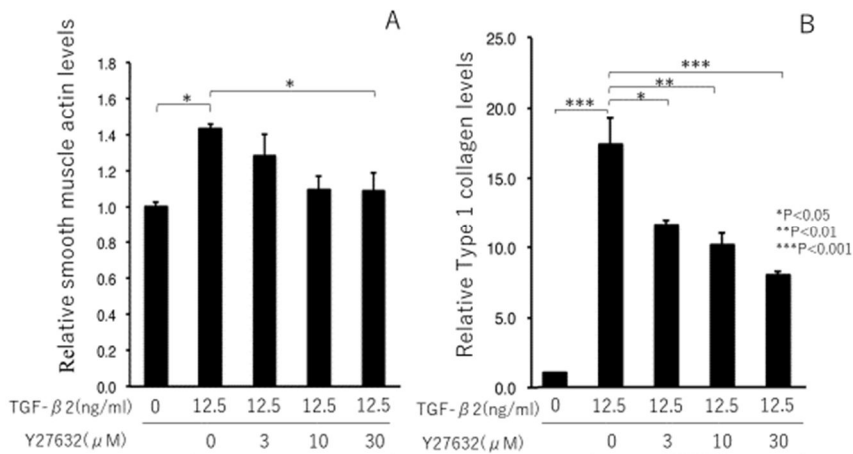


図7、TGF- β による α -SMA、COL1発現におけるY27632の影響

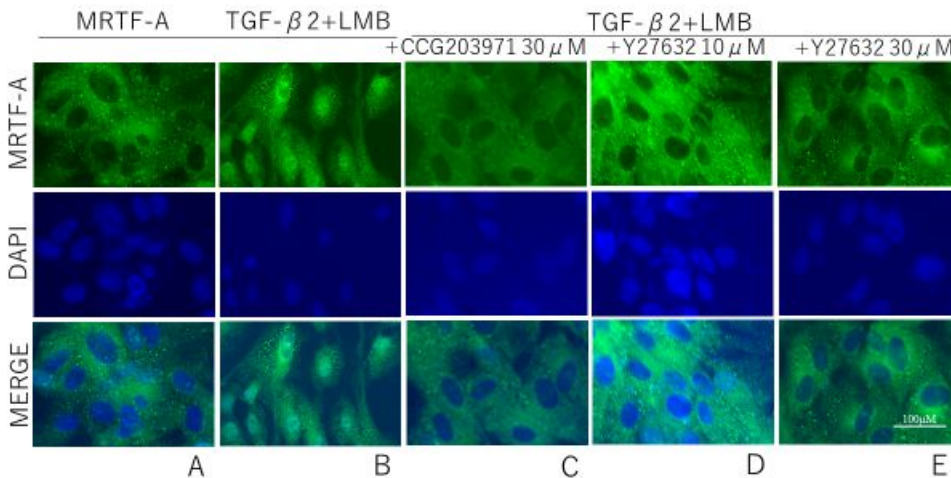


図8、TGF- β によるMRTF-Aの核内移行と、CCG203971、Y27632の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Imaizumi Toshiyasu, Kurosaka Daijiro, Tanaka Umi, Sakai Daisuke, Fukuda Kazuhiro, Sanbe Atsushi	4. 巻 181
2. 論文標題 Topical administration of a ROCK inhibitor prevents anterior subcapsular cataract induced by UV-B irradiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 145 ~ 149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2019.01.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒坂大次郎
2. 発表標題 水晶体上皮細胞のI型コラーゲン産生とTGF-
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	橋爪 公平 (Hashizume Kohe) (50407095)	岩手医科大学・医学部・特任准教授 (31201)	