

平成 22 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007~2009

課題番号：19592036

研究課題名 (和文) Smad リンカー領域リン酸化の上皮-間葉系移行と線維化での役割の研究

研究課題名 (英文) Investigation of the roles of Smad linker region phosphorylation in epithelial-mesenchymal transition and tissue fibrosis.

研究代表者

雑賀 司珠也 (SAIKA SHIZUYA)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40254544

研究成果の概要 (和文)：培養網膜色素上皮細胞株 ARPE-19とマウス水晶体上皮細胞株 a-TN4において、TGFβ1添加時には、上皮-間葉系移行に伴ってSmad2およびSmad3で、C末端と平行してミドルリンカー領域のリン酸化が増強することが確認できた。しかし、C末端のリン酸化と異なり、平常でもミドルリンカー領域のリン酸化が起こっている可能性が示唆された。それはMAPK系阻害薬で抑制された。免疫組織学的に、臨床材料の後発白内障組織で上皮-間葉系移行を起こした水晶体上皮細胞では、C末端よりも長期にミドルリンカー領域のリン酸化が起こっていることを免疫組織化学で検出できた。C末端リン酸化は、完全に平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞様に変化した水晶体上皮細胞では陽性度は低かった。術後の創傷治癒過程にある水晶体上皮細胞で、上皮形態を維持している部分では、C末端のリン酸化、上皮-間葉系移行を起こしている部分では、C末端とリンカーの両者のリン酸化が検出された。ラットでの実験から、JNK, p38のミドルリンカー領域のリン酸化への関与が示唆された。増殖硝子体網膜症モデルを用いた研究では、上皮-間葉系移行に関係する遺伝子発現がおしなべて観察された。免疫組織化学ではSmadリン酸化が、C末端、ミドルリンカー領域共に検出された。アデノウイルスベクターによるdominant negative-p38MAPKの過剰発現で、ミドルリンカー領域が減弱する傾向を得た。上皮-間葉系移行が関与する眼疾患の動物モデルと臨床材料、および培養細胞のTGFβ処理で、SmadのC末端とミドルリンカー領域のリン酸化が検出され、後者のリン酸化の疾患発症機序への関与が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：In cultures of retinal pigment epithelial cell line, ARPE-19 and mouse lens epithelial cell line, a-TN4, TGFβ1 addition activates phosphorylation of Smad2/3 C-terminal and middle linker region along with epithelial-mesenchymal transition (EMT). Phosphorylation of Smad2/3 middle linker was observed even under TGFβ1-minus condition and seemed to be attenuated with inhibitors of MAPKs. Immunohistochemistry of human samples showed that EMT-lens cells exhibited phosphorylation of Smad3 middle linker region more prominently as compared with its C-terminus phosphorylation. C-terminus phosphorylation was not observed in smooth muscle action-positive cells. Rat lens injury experiments suggested that involvement of JNK and p38 in Smad middle linker region phosphorylation. EMT-related gene expression was overall detected in mouse proliferative vitreoretinopathy (PVR) model. Immunohistochemistry showed both C-terminus and middle linker region phosphorylations of Smad3. Adenoviral overexpression of dominant negative p38 seemed to suppress middle linker region phosphorylation of Smad3. Investigations on human samples and its animal model, as well as cell culture experiments, suggested involvement of Smad3 middle linker region phosphorylation in EMT-related fibrogenic ocular pathologies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：(1) 水晶体上皮細胞 (2) 網膜色素上皮細胞 (3) 線維芽細胞 (4) トランスフォーミング成長因子 (5) Smad (6) リン酸化 (7) 上皮-間葉系移行 (8) 線維化

1. 研究開始当初の背景

臨床的に重要な疾患である網膜剥離後の網膜色素上皮細胞による剥離網膜の線維化（増殖硝子体網膜症）や水晶体損傷後の創傷治癒過程での組織線維化にはそれぞれの上皮細胞の上皮-間葉系移行が大きな役割を担っており、それにはトランスフォーミング成長因子ベータ (TGFβ) による Smad2 および Smad3 の C 末端リン酸化によるシグナルが大きく関与していることが代表研究者らによって解明されていた。しかし、近年、Smad2/3 分子は、C 末端以外に分子中央部のミドルリンカー領域と呼ばれる部分もリン酸化され、Smad2/3 シグナルをさらに精巧に調節していることが近年培養細胞を用いた研究などで報告されつつあった。しかし、Smad ミドルリンカー領域のリン酸化の上皮細胞の上皮-間葉系移行と組織線維化での役割は充分研究されていなかった。

代表研究者は、以前に TGFβ 由来の p38 MAP キナーゼをアデノウイルスベクター遺伝子導入による Dominant negative p38 で阻害することがマウス増殖硝子体網膜症に治療効果を発揮し、さらに培養網膜色素上皮細胞でのプロモーターアッセイで検討した結果、Smad 依存性ルシフェラーゼ発現を抑制したという結果を得て、この効果は p38 MAP キナーゼが Smad の機能を調節していると結論付け、さらにそれは p38 による Smad のミドルリンカー領域のリン酸化による可能性があると考えた。一方、眼結膜由来の培養線維芽細胞では、p38 阻害は Smad 依存性ルシフェラーゼ発現に影響しないという結果も得たので、Smad のミドル

リンカー領域のリン酸化による Smad の遺伝子発現制御の調節には細胞特異性があることが予想されていた。

2. 研究の目的

眼組織での創傷治癒過程での組織線維化とそれぞれの上皮細胞の上皮-間葉系移行での Smad ミドルリンカー領域のリン酸化の役割の *in vivo* および *in vitro* での解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 とマウス水晶体上皮細胞株 a-TN4 において、TGFβ1 添加時の Smad2 および Smad3 の C 末端とミドルリンカー領域のリン酸化の時間経過をウエスタンブロットと免疫組織化学で検討した。

(2) TGFβ による Smad ミドルリンカー領域のリン酸化に対する MAP キナーゼ阻害薬 U0126 または PD98059、JNK 阻害薬 JNK inhibitor 1 (CALBIOCHEM: #420116)、p38 MAP キナーゼ阻害薬 SB202190 または SB203580 の影響を検討した。

(3) 単一細胞から構成され、創傷治癒過程での細胞の挙動が最も単純に理解できるマウス水晶体を用いた。以前から用いている 26 ゲージ針による穿孔外傷後の創傷治癒過程での Smad2 および Smad3 の C 末端とミドルリンカー領域のリン酸化の時間経過を蛍光免疫組織化学的に検討した。代表研究者らによって作成された Smad2 または Smad3 のミドルリンカー領域リン酸化に対する特異抗体を使用し

た。C末端リン酸化の経過と比較した。

(4)ラット水晶体の穿孔外傷後の創傷治癒モデルを用いた。dominant negative-p38MAPKのアデノウイルスベクターによる遺伝子導入の水晶体上皮細胞でのSmad2およびSmad3のC末端とミドルリンカー領域のリン酸化の時間経過を免疫組織化学的に検討した。さらに水晶体上皮細胞の線維化で最も重要な現象である上皮-間葉系移行の状態を平滑筋アクチンの発現、上皮-間葉系移行に関与する転写因子であるSnail、各種サイトカインや細胞外マトリックス成分の発現から検討した。免疫組織化学とreal-time RT-PCRを用いた。

(5)増殖硝子体網膜症モデルを用いた研究。既報で報告した方法でマウス眼に増殖硝子体網膜症モデルを作成した。マウス眼で角膜切開、水晶体摘出、硝子体摘出後に網膜にシリコーン針で裂孔を作成し、網膜剥離を誘発した。剥離網膜下の色素上皮層に線維化組織が形成され、同部では、網膜色素上皮細胞に上皮-間葉系移行のマーカーが発現された。剥離網膜組織をウエスタンブロットに供し、Smadミドルリンカー領域とC末端のリン酸化状態を評価した。さらに網膜色素上皮細胞の線維化で最も重要な現象である上皮-間葉系移行の状態を平滑筋アクチンの発現、上皮-間葉系移行に関与する転写因子であるSnail、各種サイトカインや細胞外マトリックス成分の発現を検討した。免疫組織化学、in situ hybridization, real-time RT-PCRを用いた。同モデルでdominant negative-p38MAPKをアデノウイルスベクターで強制発現して得られた結果 (Saika S, et al. Lab Invest 2006) と比較した。

#### 4. 研究成果

(1)培養網膜色素上皮細胞株 ARPE-19とマウス水晶体上皮細胞株a-TN4において、TGFb1添加時のSmad2およびSmad3のC末端とミドルリンカー領域のリン酸化の時間経過をウエスタンブロットと免疫組織化学で検討した。その結果、C末端と平行してミドルリンカー領域のリン酸化が起こることが確認できた。しかし、C末端のリン酸化と異なり、平常でもミドルリンカー領域のリン酸化が起こっている可能性が示唆された。(2)TGFbによるSmadミドルリンカー領域のリン酸化に対するMAPキナーゼ阻害薬 U0126 または PD98059、JNK阻害薬 JNK inhibitor 1(CALBIOCHEM: #420116)、p38MAPキナーゼ阻害薬 SB202190 またはSB203580 の影響を検討した。その結

果、これらの細胞では、おもにMAPキナーゼがミドルリンカー領域のリン酸化に関与しているが、p38とJNKの関与は少ないことが証明された。C末端のリン酸化にはこれらのシグナル伝達経路は関与していないことが示唆された。免疫組織学的に、臨床材料の後発白内障組織で上皮-間葉系移行を起こした水晶体上皮細胞では、C末端よりも長期にミドルリンカー領域のリン酸化が起こっていることを免疫組織化学で検出できた。C末端リン酸化は、完全に平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞様に変化した水晶体上皮細胞では陽性度は低かった。マウス色素上皮由来因子遺伝子を発現するアデノウイルスベクターが作成され、ARPE-19細胞での発現がreal-time RT-PCRとウエスタンブロットで確認でき、in vivoでは、マウス角膜線維化モデルでTGFb/Smadシグナルの抑制効果による抗線維化効果の可能性が免疫組織化学、real-time RT-PCRで示唆された。

(3) in vivoの研究では、ヒト後発白内障組織でのSmad2/3のミドルリンカー領域のリン酸化およびC末端領域のリン酸化を免疫組織学的に検索した。術後ぼ創傷治癒過程にある水晶体上皮細胞で、上皮形態を維持している部分では、C末端のリン酸化、上皮-間葉系移行を起こしている部分では、C末端とリンカーの両者のリン酸化が検出された。

マウス水晶体外傷モデルでは、穿孔部の水晶体上皮細胞でSmad2/3のC末端リン酸化と核内以降は受傷後12時間から観察され、mRNAレベルで3日、蛋白質レベルで5日ごから上皮-間葉系移行のマーカーである平滑筋アクチンの発現が観察された。

(4)ラット水晶体の穿孔外傷後の創傷治癒モデルを用いた。dominant negative-p38MAPKのアデノウイルスベクターによる遺伝子導入の水晶体上皮細胞でのSmad2およびSmad3のC末端とミドルリンカー領域のリン酸化の時間経過を免疫組織化学的に検討した。さらに水晶体上皮細胞の線維化で最も重要な現象である上皮-間葉系移行の状態を平滑筋アクチンの発現、上皮-間葉系移行に関与する転写因子であるSnail、各種サイトカインや細胞外マトリックス成分の発現から検討した。免疫組織化学とreal-time RT-PCRを用いた。上皮-間葉系移行による遺伝子発現はSmadリンカーのリン酸化の抑制と同時に、JNKを阻害しても観察されたという予備の結果を得た。

(5)増殖硝子体網膜症モデルを用いた研究。既報で報告した方法でマウス眼に増殖硝子体網膜症モデルを作成した。免疫組織化学、

in situ hybridization, real-time RT-PCRを用いた。上皮-間葉系移行に関係する遺伝子発現がおしなべて観察された。免疫組織化学ではSmadリン酸化が、C末端、ミドルリンカー領域共に検出された。アデノウイルスベクターによるdominant negative-p38MAPKの過剰発現で、ミドルリンカー領域が減弱する傾向を得た。

#### 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 21 件)

- ①藤田周子、宮本武、白井久美、雑賀司珠也、網膜厚変化を観察したPurtscher外傷性網膜症の1例、眼科臨床紀要、査読有り、2、2009、501-504
- ②中田元子、岡田由香、山中修、宮崎賢一、雑賀司珠也、眼内レンズ二次逢着(片側逢着)術成績の検討、IOL&RS、査読有り、23、2009、67-69
- ③Fujita N, Fujita S, Okada Y, Fujita K, Kitano A, Yamanaka O, Miyamoto T, Kon S, Uede T, Rittling SR, Denhardt DT, Saika S. Impaired angiogenic response in the corneas of mice lacking osteopontin. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有り、51、2009、790-4
- ④Okada Y, Saika S, Shirai K, Yamanaka O, Kitano A, Wang Z, Yang H, Reinach P. JNK MAPK signaling contributes in vivo to injury-induced corneal epithelial migration. Ophthalmic Res. 査読有り、42、2009、185-92
- ⑤Shinozaki M, Okada Y, Kitano A, Ikeda K, Saika S, Shinozaki M. Impaired cutaneous wound healing with excess granulation tissue formation in TNFalpha-null mice. Arch Dermatol Res. 査読有り、2009、301、2009、531-7
- ⑥Saika S, Yamanaka O, Okada Y, Tanaka S, Miyamoto T, Sumioka T, Kitano A, Shirai K, Ikeda K. TGF beta in fibroproliferative diseases in the eye. Front Biosci. 査読有り、1、2009、376-90
- ⑦Fujita K, Miyamoto T, Saika S. Sonic hedgehog: its expression in a healing cornea and its role in neovascularization. Mol Vis. 査読有り、15、2009、1036-44
- ⑧Saika S. A journey for overcoming ischemic retinal diseases. Nippon Ganka Gakkai Zasshi. 査読無し、113、2009、3-4
- ⑨Sumioka T, Ikeda K, Okada Y, Yamanaka O, Kitano A, Saika S. Inhibitory effect of blocking TGF-beta/Smad signal on injury-induced fibrosis of corneal

endothelium. Mol Vis. 査読有り、14、2008、2272-81

- ⑩Saika S, Matsunaga T, Ogawa T, Ichinohe S. Gelatin particle agglutination (PA) antibody: comparison to neutralizing antibody (NT) and hemagglutination inhibition (HI) antibody and relationship to IgG avidity. Kansenshogaku Zasshi. 査読無し、82、2008、310-6
- ⑪Fujita K, Miyamoto T, Okada Y, Ishikawa N, Saika S. Expression pattern of sonic hedgehog and effect of topical mitomycin C on its expression in human ocular surface neoplasms. Jpn J Ophthalmol. 査読有り、52、2008、190-4
- ⑫Yamanaka O, Miyazaki K, Kitano A, Saika S, Nakajima Y, Ikeda K. Suppression of injury-induced conjunctiva scarring by peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene transfer in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有り、50、2008、187-93
- ⑬Kitano A, Yamanaka O, Ikeda K, Ishida-Nishikawa I, Okada Y, Shirai K, Saika S. Tetrandrine suppresses activation of human subconjunctival fibroblasts in vitro. Curr Eye Res. 査読有り、33、2008、559-65
- ⑭Saika S, Yamanaka O, Flanders KC, Okada Y, Miyamoto T, Sumioka T, Shirai K, Kitano A, Miyazaki K, Tanaka S, Ikeda K. Epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target for prevention of ocular tissue fibrosis. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 査読無し、8、2008、69-76
- ⑮Yamanaka O, Saika S, Ikeda K, Miyazaki K, Kitano A, Ohnishi Y. Connective tissue growth factor modulates extracellular matrix production in human subconjunctival fibroblasts and their proliferation and migration in vitro. Jpn J Ophthalmol. 査読有り、52、2008、8-15
- ⑯Okada Y, Senba E, Shirai K, Ueyama T, Reinach P, Saika S. Perturbed intraepithelial differentiation of corneal epithelium in c-Fos-null mice. Jpn J Ophthalmol. 査読有り、52、2008、1-7
- ⑰Saika S, Yamanaka O, Sumioka T, Miyamoto T, Miyazaki K, Okada Y, Kitano A, Shirai K, Tanaka S, Ikeda K. Fibrotic disorders in the eye: targets of gene therapy. Prog Retin Eye Res. 査読有り、27、2008、177-96
- ⑱Kao WW, Xia Y, Liu CY, Saika S. Signaling pathways in morphogenesis of cornea and eyelid. Ocul Surf. 査読無し、6、2008、9-23
- ⑲Yamanaka O, Saika S, Ohnishi Y,

Kim-Mitsuyama S, Kamaraju AK, Ikeda K. Inhibition of p38MAP kinase suppresses fibrogenic reaction in conjunctiva in mice. Mol Vis. 査読有り、13、2007、1428-35

⑩ Saika S. Yin and yang in cytokine regulation of corneal wound healing: roles of TNF-alpha. Cornea. 査読無し、26、2007、70-4

⑪ Kitano A, Saika S, Yamanaka O, Ikeda K, Okada Y, Shirai K, Reinach PS. Emodin suppression of ocular surface inflammatory reaction. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有り、48、2007、5013-22

[学会発表] (計 17 件)

① 雑賀司珠也、TGF $\beta$  Signal Transduction, a Potential Target to Maintain/Restore Corneal Transparency. 山口国際シンポジウム. 2010. 3. 20. 山口

② 雑賀司珠也、白内障手術合併症の傾向と対策. 第 75 回東京医大眼科臨床懇話会. 2010.3.18.東京

③ Shizuya Saika. Gordon Research Conferences. (Biology & pathobiology of The Cornea). Modulation of TGF beta/Smad signals by tenascin C and osteopontin in corneal wound healing and fibrosis. 2010. 3. 9Ventura. CA

④ 雑賀司珠也、白内障手術術後眼内炎の現状と対策. 第 15 回北陸眼疾患シンポジウム. 2010. 2. 27. 石川

⑤ 雑賀司珠也、TGF beta-Smad シグナルのアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入による干渉での眼組織の癒痕、線維化抑制. 産業医科大学大学院生体情報系病態情報部門生体情報概論Ⅱ. 2009. 9. 24. 北九州

⑥ 雑賀司珠也、non-VEGF 因子による血管新生制御. 第 19 回脳血管シンポジウム細胞外マトリックスと血管病: 基礎から臨床へ. 2009. 9. 12. 東京

⑦ 雑賀司珠也、創傷治癒と線維化疾患: 新たな治療戦略へ. 第 5 回 Pfizer Ophthalmics Award Japan 受賞記念講演. 2009. 9. 4. 福岡

⑧ 雑賀司珠也、白内障手術合併症の基礎と臨床. 大阪医科大学眼科オープンカンファレンス. 2009. 7. 16. 大阪

⑨ 雑賀司珠也、線維化疾患の治療標的としての EMT. 第 114 回日本解剖学学会. 2009. 3. 29. 岡山

⑩ 雑賀司珠也、白内障手術合併症の傾向と対策. 奈良県眼科医会学術定例会・第 23 回集談会. 2008. 11. 23. 奈良

⑪ 雑賀司珠也、白内障手術合併症の傾向と対策. 第 96 回南大阪眼科勉強会. 2008. 11. 22. 大阪

⑫ Shizuya Saika, Susan R. Rittling, David T. Denhardt, Chia-Yang Liu, and Winston Kao: Extracellular Matrix Components, Osteopontin and Tenascin C, Modulate Smad Signal and Attenuate Epithelial-mesenchymal Transition In Vivo. TGF- $\beta$ : Discovery and Promise, 2008. 9. 19. Bethesda, Maryland, USA.

⑬ Kathleen Flanders, Chuxia Deng, Gillian Ashcroft, Shizuya Saika, Misako Sato, Akira Ooshima, James Mitchell, and Anita Roberts. Smad3 Mediates the Fibrotic Response Induced by TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$ : Discovery and Promise, 2008. 9. 19. Bethesda, Maryland, USA.

⑭ 雑賀司珠也、緑内障濾過手術後の癒痕化対策の現状と課題. 第 25 回阪南眼科勉強会. 2008. 7. 19. 大阪

⑮ 雑賀司珠也、網膜色素変成症に合併する白内障手術の注意点. 医療講演会. 2008. 5. 25. 和歌山

⑯ 雑賀司珠也、眼科手術と生体反応. 第 112 回日本眼科学会総会シンポジウム. 2008. 4. 19. 神奈川

⑰ Saika S, Ikeda K, Kon S, Ueda T, Rittling SR, Denhardt DT, Kao WWY. Modulation of TGFbeta signal by extracellular matrix components: Loss of Iumican or osteopontin attenuates Smad signal, epithelial-mesenchymal transition

and fibroblast activation. Kaystone  
Symposia(TGF- $\beta$  family in homeostasis and  
disease) 2008. 2. 4. Santa Fe, New Mexico, USA

〔図書〕(計1件)

① Saika S.、Humana Press、Transforming  
Growth factor- $\beta$  in Cancer Therapy、2008、  
775

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

雑賀 司珠也 (SAIKA SHIZUYA)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40254544

### (2) 研究分担者

岡田 由香 (OKADA YUKA)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50264891

山中 修 (YAMANAKA OSAMU)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50254545

池田 一雄 (IKEDA KAZUO)

大阪市立大学医学部・大学院・准教授

研究者番号：80275247

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：