

機関番号：17501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592050

研究課題名 (和文) TGF- $\beta$  シグナル関連因子阻害による増殖性硝子体網膜症の治療戦略研究課題名 (英文) The treatments of proliferative vitreoretinopathy by inhibition of TGF- $\beta$  signaling

研究代表者

木許 賢一 (KIMOTO KENICHI)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：50315339

研究成果の概要 (和文)：

増殖性硝子体網膜症における病態形成の主役である Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  の細胞内シグナル伝達機構は未だ十分に解明されていない。今回、PI3K/Akt pathway の役割を検討した。網膜色素上皮細胞を TGF- $\beta$ 2 で刺激すると、PI3K/Akt が活性化される。PI3K/Akt 阻害剤は、TGF- $\beta$ 2 で誘導される I 型コラーゲンの産生を、プロモータ、mRNA、タンパクのレベルで抑制した。PI3K/Akt 阻害剤は、Smad 経路の活性化にも影響を与え、Smad3 の転写活性を抑制すると同時に Smad7 の発現を亢進した。I 型コラーゲンプロモーターの Smad 結合部位を変異させたコンストラクトに対しても PI3K/Akt 阻害剤はその活性を減弱させた。PI3K/Akt は増殖性硝子体網膜症治療の標的分子となりえる。

研究成果の概要 (英文)：

Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  is a key mediator of proliferative vitreoretinopathy, but the cellular mechanisms by which TGF- $\beta$  induces extracellular matrix protein (ECM) synthesis are not fully understood. This study examined whether the PI3K/Akt pathway is involved in TGF- $\beta$ 2-induced collagen expression in human retinal pigment epithelial cells. The biochemical blockade of PI3K/Akt activation inhibited TGF- $\beta$ 2-induced type I collagen mRNA expression and type I collagen synthesis. The blockade of PI3K/Akt pathway inhibited the increase in COL1A2 promoter activities when induced by TGF- $\beta$ 2 and reduced TGF- $\beta$ 2 induction of Smad-mut/Luc promoter activity and CAGA12-Luc activity. Moreover, wortmannin increased the TGF- $\beta$ 2-induced Smad7 mRNA expression levels. The PI3K/Akt pathway plays a role in relaying the TGF- $\beta$ 2 signal to induce type I collagen synthesis in the retinal pigment epithelium through Smad-dependent and Smad-independent pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼細胞生物学、網膜色素上皮、増殖性硝子体網膜症、コラーゲン、シグナル伝達、TGF- $\beta$

### 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る病態である。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。新規の治療法の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

PVR の増殖膜の主要な構成細胞である網膜色素上皮細胞内の TGF- $\beta$ 2 シグナル伝達経路に關与する Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 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) を開発すること。

### 3. 研究の方法

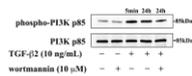
網膜色素上皮細胞において TGF- $\beta$ 2 で誘導される I 型コラーゲンの発現調節に PI3K 阻害剤が与える影響をプロモーター活性、mRNA 発現、タンパク発現を指標に検討し、TGF- $\beta$ 2/Smad 経路とのクロストークに関して解析する。

次に PVR 動物モデルでの各阻害剤の有効性と安全性を、発症予防と手術後の進行、再発抑制の観点から検討する。

### 4. 研究成果

1) RPE を TGF- $\beta$ 2 刺激すると PI3K が活性化し、下流因子の Akt が活性化 (リン酸化) した (Fig. 1)。各々の阻害剤は濃度依存的に TGF- $\beta$ 2 刺激による RPE からの各種コラーゲン mRNA (COL1A1, COL1A2) を抑制した (Fig. 2)。

A)



B)

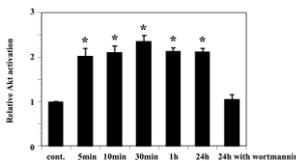


Fig. 1

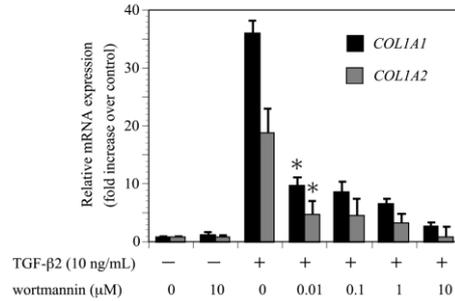


Fig. 2

2) TGF- $\beta$ 2 で誘導される COL1A2 のプロモーター活性を各阻害剤は抑制した。一方、COL3A1 のプロモーター活性に対しては、明確な結果が得られなかった (Fig. 3)。

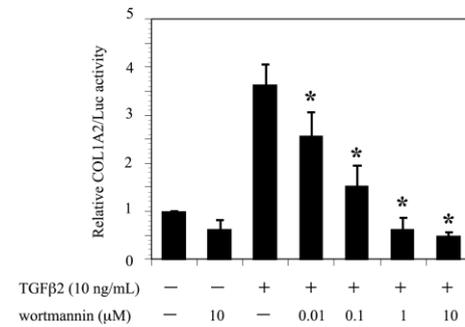


Fig. 3

3) 抗ヒト 1 型コラーゲン抗体を用いた細胞免疫染色で PI3K 阻害剤は TGF- $\beta$ 2 刺激による RPE からの 1 型コラーゲン産生を抑制した (Fig. 4)。

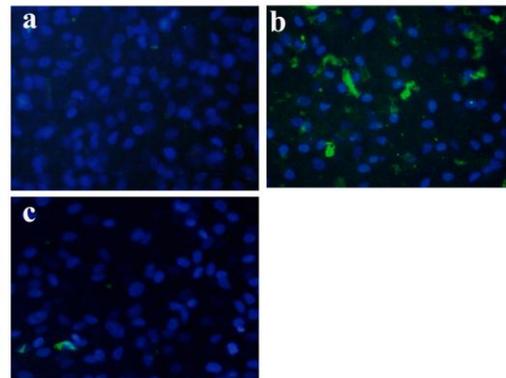


Fig. 4

4) PI3K/Akt経路の解析をさらに進めたところ、COL1A2プロモーターのSmad結合部位を変異させたコンストラクトの活性化をPI3K阻害剤が抑制した (Fig. 5)。

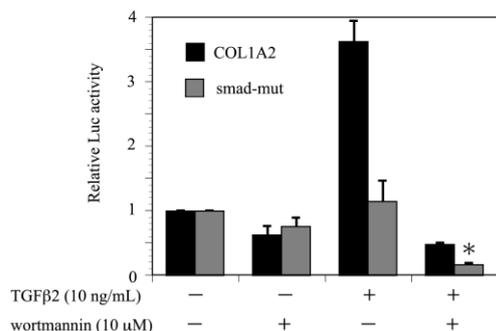


Fig. 5

5) 次にPI3KとSmadとのクロストークをSmad反応性プロモーター：(CAGA)12を用いて検討したところ、PI3K阻害剤ではTGF-β2で誘導される(CAGA)12の活性を抑制した (Fig. 6)。

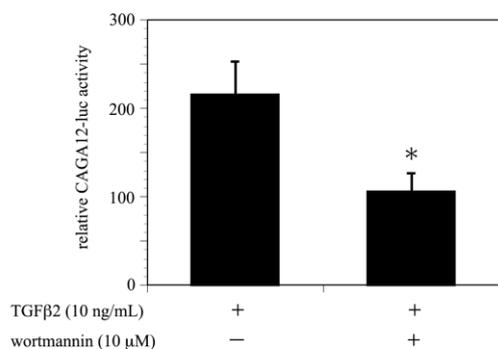


Fig. 6

6) PI3K阻害剤の添加によるSmad7mRNAの発現をreal-time RT-PCRで解析すると、TGF-β2刺激によるRPEからのSmad7の発現をPI3K阻害剤が増加させることがわかった (Fig. 7)。

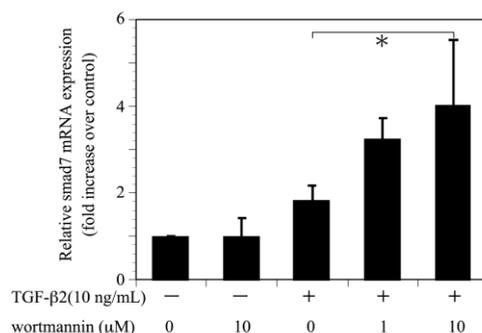


Fig. 7

以上の結果から、PI3Kの活性化を阻害することで、RPEのコラーゲン産生を抑制でき、PVR治療の標的分子として有望であることが示された。また、RPEからのコラーゲン産生に関してTGF-β2/PI3K/Akt経路はSmad依存的な経路と非依存的な経路が存在すると考えられた。

#### 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1件)

- ① Yokoyama K, Kimoto K, Itoh Y, Nakatsuka K, Matsuo N, Yoshioka H, Kubota T. PI3K/Akt mediates the expression of type I collagen induced by TGF-β2 in human retinal pigment epithelium Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, in press.

[学会発表] (計2件)

- ① PI3K/Akt mediates the expression of type I collagen induced by TGF-β2 in human retinal pigment epithelium Yokoyama K, Kimoto K, Kubota T. World Ophthalmology Congress 2010 2010年6月5～9日ベルリン
- ② 横山勝彦、木許賢一 ほか 網膜色素上皮細胞のコラーゲン発現におけるPI3K/Akt経路の関与 第112回日本眼科学会総会 2008年4月18日 横浜

[その他]

ホームページ等  
大分大学眼科ホームページ  
<http://www.med.oita-u.ac.jp/ganka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木許 賢一 (KIMOTO KENICHI)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：50315339

(2) 研究分担者

吉岡 秀克 (YOSHIOKA HIDEKATSU)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00222430

松尾哲孝 (MATSUO NORITAKA)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：10284788