

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月12日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591948

研究課題名（和文）インテグリンによる Smad 系の調節を標的とした眼線維化疾患の新規治療戦略の確立

研究課題名（英文）Development of a new strategy for the prevention of ocular tissue fibrosis by targeting integrin-Smad crosstalks

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）： a9インテグリンのリガンドであるオステオポンチン（OPN）またはテネascin（TNC）のノックアウト（KO）マウスでは、コラーゲンI型、TGFβ1、アルファ平滑筋アクチンの発現を減少させた。OPN由来シグナルは、Smad3とp38のリン酸化に直接関与した。TNC-KOは、角膜での癒痕化と血管新生の両者を抑制した。網脈絡膜のレーザー新生血管形成では、OPN欠失またはOPN中和抗体の全身投与は、炎症性サイトカインの発現抑制と同時に、脈絡膜新生血管を抑制した。OPNまたはTNC由来のシグナルの制御が、眼の癒痕あるいは血管新生形成を伴う眼疾患に対する新たな治療戦略になりうることを示す事ができた。

研究成果の概要（英文）：

The expression of extracellular matrix components and fibrotic cytokines in fibroblasts, which were from either osteopontin (OPN) or tenascin C (TNC), both of which are ligands of a9 integrin, knock-out and wild-type mice, were examined. Lacking OPN or TNC decreased the expression of type I collagen, TGF-β1, and alpha-smooth muscle actin. However OPN signaling is directly involved in phosphorylation of Smad3 and p38, the lack of TNC did not affect Smad3 expression levels or phosphorylation. The effects of TNC knock-out on wound healing models, which were scar healing after corneal incision and corneal angiogenesis, were examined. The lack of TNC inhibited both scarring and angiogenesis. The effects of OPN knock-out on another wound healing models associated with angiogenesis, which were angiogenesis and scar tissue formation after laser irradiation on choroid and retina, were examined. The effects of dose of OPN neutralizing antibody were also examined before intraperitoneal administration of a9 integrin neutralizing antibody. Lacking OPN or blocking its signaling induced by systemic administration of an OPN neutralizing antibody suppressed the expression of inflammatory cytokines, choroidal neovascularization and scar tissue formation. Controlling OPN or TNC signaling would be a new treatment strategy for ocular scarring or diseases associated with angiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			

総計	2,900,000	870,000	3,770,000
----	-----------	---------	-----------

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) インテグリン (2) Smad (3) 線維化 (4) 眼 (5) マウス

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

オステオポンチンまたはテネインは、炎症や組織治癒に積極的な役割を果たしている事が近年注目されている。しかし、そのシグナルレベルでの機序解明は不十分である。また、これらの細胞外マトリックスの眼組織での創傷治癒や血管新生での役割は解明されたとは言えない状態であった。予備的にこれらの細胞外マトリックスが、眼で組織癒や血管新生に関与している可能性を示唆するデータを得ていた。共通するインテグリンの介在するシグナル伝達制御も注目すべき研究テーマであった。

2. 研究の目的

a9 インテグリンのリガンドであるオステオポンチンまたはテネインのそれぞれのノックアウトマウスと野生型マウス由来の線維芽細胞を用いて、これらのマトリックス成分の TGFβ1 暴露時のシグナル伝達、各種細胞外マトリックスや線維性サイトカイン発現での役割を検討した。創傷治癒モデルとして、角膜切開後の血管新生を伴わない癒治癒と角膜中央の熱凝固炎症に伴う血管新生、及ぶ血管新生を伴った異なる創傷治癒モデルとして網膜、脈絡膜のレーザー損傷後の新生血管、癒治癒組織形成に対するこれらのマトリックス成分の欠失のまたはオステオポンチン中和抗体の腹腔内投与の効果を検討した。当初の目的であった a9 インテグリンの中和抗体の網膜、脈絡膜のレーザー損傷後の新生血管、癒治癒組織形成への影響（治療効果）の検討は平成 25 年度に持ち越されたが、その基礎データを得る事を目的とした。

3. 研究の方法

1、オステオポンチンまたはテネインのそれぞれのノックアウトマウスと野生型マウスのP1眼球から線維芽細胞をoutgrowthで得た。60ミリシャーレで、継代後に無血清培養でTGFβ1(1.0 ng/ml)添加、24時間でRNAを採取した(Sigma社キット)。TaqMan real-time RT-PCRで、コラーゲンI型、トランスフォーミング成長因子ベータ1、アルファ平滑筋アクチンのmRNA発現を検討した。さらに48時間培養したサンプルでは、ウエスタンブロットでアルファ平滑筋アクチン蛋白質量を検討した。オステオポンチン由来のシグナルは、Smad3とp38のリン酸化に直接関与しているが、テネイン欠損は、Smad3の発現量も、C末端リン酸化にも影響しなかった。

2、創傷治癒モデルとして、角膜切開後の血管新生を伴わない癒治癒と角膜中央の熱凝固炎症に伴う血管新生に対するテネインノックアウトの影響を検討した。

3、オステオポンチンノックアウトマウスと前日にオステオポンチン中和抗体の腹腔内投与を行った野生型マウスで網膜、脈絡膜のアルゴンレーザー損傷後の新生血管、癒治癒組織形成の程度を検討した。

4. 研究成果

オステオポンチンまたはテネインの欠失は、トランスフォーミング成長因子ベータ1刺激下でのコラーゲンI型、トランスフォーミング成長因子ベータ1、アルファ平滑筋アクチンの発現を減少させた。オステオポンチン由来のシグナルは、Smad3とp38のリン酸化に直接関与しているが、テネイン欠損は、Smad3の発現量も、C末端リン酸化にも影響しなかった。テネイン欠失は、癒治癒と血管新生の両者を抑制した。テネインのトランスフォーミング成長因子ベータ1由来シグナルとのクロストークは解明できなかった。Smad3総タンパク量が減少していたという報告が他者からなされているが、我々の研究では、テネイン欠失細胞のSmad3量は、野生型細胞と差がなかった。オステオポンチン欠失またはオステオポンチン中和抗体の全身投与によるオステオポンチンとテネインに由来するシグナルの阻害は、炎症性サイトカインの発現抑制と同時に、脈絡膜新生血管、癒治癒組織形成を抑制した。a9インテグリンのリガンドであるオステオポンチンまたはテネイン由来のシグナルの制御が、眼の癒治癒あるいは血管新生形成を伴う眼疾患に対する新たな治療戦略になりうることを示す事ができた。当初の目的であるa9インテグリン中和抗体の全身(腹腔内)投与による炎症、線維化、血管新生の抑制実験の有望性を強く示唆するデータが得られ、今後の研究への糸口が得られた。

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15件) **すべて査読有り**

- ①Yang Y, Yang H, Wang Z, Varadaraj K, Kumari SS, Mergler S, Okada Y, Saika S, Kingsley PJ, Marnett LJ, Reinach PS. Cannabinoid receptor 1 suppresses transient receptor potential vanilloid 1-induced inflammatory responses to corneal injury. *Cell Signal*. 2013 Feb;25(2):501-11. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.10.015. Epub 2012 Nov 8.
- ②Sumioka T, Kitano A, Flanders KC, Okada Y, Yamanaka O, Fujita N, Iwanishi H, Kao WW, Saika S. Impaired cornea wound healing in a tenascin C-deficient mouse model. *Lab Invest*. 2013 Feb;93(2):207-17. doi: 10.1038/labinvest.2012.157. Epub 2012 Dec

3.

③ Suzuki K, Yokoyama C, Higashi Y, Daikoku T, Mizoguchi S, Saika S, Yamada G. Wakayama symposium:

epithelial-mesenchymal interaction regulates tissue formation and characteristics: insights for corneal development. *Ocul Surf.* 2012 Oct;10(4):217-20. doi: 10.1016/j.jtos.2012.07.007. Epub 2012 Jul 25

④ Saika S.

Wakayama symposium: current concepts of ocular surface. cell biology. *Ocul Surf.* 2012 Oct;10(4):210-1. doi:

10.1016/j.jtos.2012.07.006. Epub 2012 Jul 25.

⑤ Fujita N, Fujita S, Ogata N, Matsuoka M, Okada Y, Kon S, Uede T, Saika S.

Endogenous osteopontin involvement in laser-induced choroidal

neovascularization in mice. *Invest*

Ophthalmol Vis Sci. 2011 Dec

2;52(13):9310-5. Print 2011

⑥ Terai K, Call MK, Liu H, Saika S, Liu CY, Hayashi Y, Chikama T, Zhang J, Terai N, Kao CW, Kao WW.

Crosstalk between TGF-beta and MAPK signaling during corneal wound healing.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Oct

17;52(11):8208-15. Print 2011 Oct.

⑦ Okada Y, Reinach PS, Shirai K, Kitano A, Kao WW, Flanders KC, Miyajima M, Liu H, Zhang J, Saika S. TRPV1 involvement in inflammatory tissue fibrosis in mice. *Am J Pathol.* 2011 Jun;178(6):2654-64

⑧ Sumioka T, Fujita N, Kitano A, Okada Y, Saika S. Impaired angiogenic response in

the cornea of mice lacking tenascin C.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Apr

16;52(5):2462-7. Print 2011 Apr.

⑨ Saika S.

Tissue fibrosis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2010 Dec 1;10(4):301. No abstract available.

⑩ Kitano A, Okada Y, Yamanka O, Shirai K, Mohan RR, Saika S.

Therapeutic potential of Trichostatin A to control inflammatory and fibrogenic disorders of the ocular surface. *Mol Vis.* 2010 Dec 31;16:2964-73

⑪ Sumioka T, Fujita N, Kitano A, Okada Y, Saika S.

Impaired angiogenic response in the cornea of mice lacking tenascin C. *Invest*

Ophthalmol Vis Sci. 2011 Apr

16;52(5):2462-7. doi:

10.1167/iovs.10-5750.

⑫ Saika S, Yamanaka O, Sumioka T, Okada Y, Miyamoto T, Shirai K, Kitano A, Tanaka S.

Transforming growth factor beta signal transduction: a potential target for maintenance/restoration of transparency of the cornea. *Eye Contact Lens.* 2010 Sep;36(5):286-9. Review.

⑬ Tanaka S, Sumioka T, Fujita N, Kitano A, Okada Y, Yamanaka O, Flanders KC, Miyajima M, Saika S. Suppression of injury-induced epithelial-mesenchymal transition in a mouse lens epithelium lacking tenascin-C. *Mol Vis.* 2010 Jul 1;16:1194-205.

⑭ Okada Y, Reinach PS, Kitano A, Shirai K, Kao WW, Saika S. Neurotrophic keratopathy: its pathophysiology and treatment. *Histol Histopathol.* 2010 Jun;25(6):771-80. Review.

⑮ 雑賀司珠也: 脈絡膜悪性黒色腫の浸潤、遠隔転移での TGF β /Smad2/3 シグナル(C末端およびミドルリンカー領域のリン酸化)と各種 MAP キナーゼ系とのクロストークの役割の探

索とそれに基づいた治療法の研究(原著論文). 上原記念生命科学財団研究報告集. 24巻 Page1-3(2010.12)

[学会発表] (計13件)

①雑賀司珠也: Cornea Endothelium & Stroma. Kyoto Cornea Club. 2012.12. 京都

②Shizuya Saika: EMT in the Corneal Endothelium; Involvement of in Diseases and Its Treatment Strategy. ASIA The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress. 2012. 4. Busan

③雑賀司珠也: イオンチャンネル受容体と実質炎症. 第116回日本眼科学会総会. 2012. 4. 東京

④雑賀司珠也: 実質創傷治癒の制御機構: 実質細胞と炎症細胞. 第32回西中国眼疾患フォーラム. 2011. 11. 山口

⑤Shizuya Saika: Roles of macrophages and fibroblasts in tissue repair of cornea The Ophthalmological Society of Taiwan. 2011. 11. Taiwan

⑥雑賀司珠也: 創傷治癒における線維芽細胞と炎症細胞の役割. 第168回発生研セミナー. 2011. 6. 熊本

⑦Shizuya Saika: Epithelial-Mesenchymal Transition as a Therapeutic Target in Ocular Fibrotic Diseases. St. Mary hospital 定期講演会. 2011. 5. Seoul.

⑧Shizuya Saika: Roles of macrophages and fibroblasts in the tissue repair in cornea St. Mary hospital 定期講演会. 2011. 5. Seoul

⑨Shizuya Saika: Post-operative endophthalmitis: Pathology and treatment University of California Irvine. 2011. 4. Los Angeles

⑩Shizuya Saika: Epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target in

ocular fibrotic diseases. University of California Irvine. 2011. 4. Los Angeles

⑪雑賀司珠也: 眼組織の透明治癒をめざして南燈会講演会. 2011. 1. 和歌山

⑫雑賀司珠也: 上皮-間葉系移行: 線維化疾患の治療標的. 北大遺制研セミナー. 2010. 10. 札幌

⑬雑賀司珠也: 上皮-間葉系移行と眼疾患 関西眼疾患研究会. 2010. 6. 京都

[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

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

白井 久美 (SHIRAI KUMI)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：70326370

宮本 武 (MIYAMOTO TAKESHI)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：20336879

(3)連携研究者

()

研究者番号：