

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462716

研究課題名(和文) 角膜実質癒痕形成における実質細胞分化転換誘導因子とアクチン重合関連タンパクの検討

研究課題名(英文) Palladin relates scar formation in the corneal stroma.

研究代表者

森重 直行 (MORISHIGE, Naoyuki)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40346565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン重合関連タンパク質Palladinの角膜実質における発現について検討した。Palladinは、癒痕形成性疾患や角膜実質の創傷治癒過程において、平滑筋アクチン(α-SMA)と共発現していた。培養角膜実質細胞をTGFβで刺激すると、サブタイプである140 kDa Palladinが濃度依存性に発現し、またTGFβのシグナル伝達を阻害することによりその発現が抑制された。RNA干渉現象を用いてPalladinの発現を抑制した角膜実質細胞株において、TGFβ刺激によるα-SMAの発現も抑制され、その収縮も抑制された。Palladinは、角膜実質における癒痕形成に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression of Palladin in corneal stroma. Palladin was expressed in the scar-forming diseased corneas and stromal wound healing process, and it co-localised with alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA). TGFβ stimulation on human corneal fibroblasts (CFb) increased 140 kDa Palladin in dose-dependent manner. The inhibition of TGFβ signaling decreased expression of palladin. Palladin RNA interference CFb decreased the expression of alpha-SMA by TGFβ stimulation. Also, Gel contraction assay for Palladin RNA interference CFb revealed the decreased shrinkage of collagen gel by the stimulation of TGFβ. Our data indicated that palladin was closely related to the scar formation, indicating that palladin may be a candidate molecule to regulate corneal scarring.

研究分野：眼科学

キーワード：Palladin 角膜実質 癒痕形成 平滑筋アクチン TGF

1. 研究開始当初の背景

角膜実質細胞は、種々の刺激により線維芽細胞または筋線維芽細胞へとその表現型を変化させ、アクチン重合を進め分化転換を行う。特に、角膜実質内に癒痕形成が生じる際に、病変部に筋線維芽細胞が発現する事が知られており、この筋線維芽細胞の発現を制御する事が角膜実質癒痕形成の制御につながると考えられる。角膜実質細胞から筋線維芽細胞に分化転換する際に、アクチンの重合が進み、また筋線維芽細胞のマーカーのひとつであるアルファ平滑筋アクチン (α -SMA) の発現が見られる。近年、アクチン重合に関与するタンパク質の一つである Palladin が、種々の疾患において重要な役割を果たしている事が報告されており、角膜の癒痕形成においても Palladin が関与していると考えられていた。

2. 研究の目的

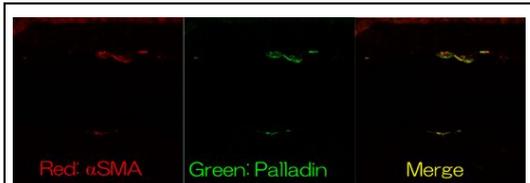
本研究では、角膜実質における Palladin の発現について、動物モデルおよびヒト疾患検体角膜および培養ヒト角膜実質細胞における Palladin の発現及びその役割について検討した。

3. 研究の方法

組織内における Palladin の発現を評価するために、正常ラットの角膜切創モデルおよび角膜移植時に得られた疾患角膜 (水疱性角膜症 4 眼, 角膜白斑 5 眼, 円錐角膜 1 眼) における Palladin の発現および α -SMA との共局在を検討した。また、正常ヒト角膜実質より採取した培養ヒト角膜実質細胞 (hCFb) および siRNA で Palladin の発現を抑制した細胞株 (siRNA-Palladin hCFb) を対象とし、TGF β 刺激および TGF β シグナルの阻害剤による Palladin の発現の濃度依存性変化、経時的変化をウェスタンブロッティング法で評価した。また、siRNA-Palladin hCFb をコラーゲンゲル中に培養し、TGF β 刺激によるゲル収縮も検討した。

4. 研究成果

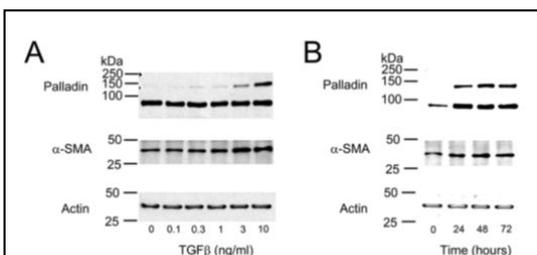
正常ラット角膜切創モデルにおいて、切創作成後 72 時間ごろより Palladin が発現し、同部位に α -SMA も発現していた。その発現は切創作成 1 週間ごろまで見られ、2 週間ごろには消失していた。癒痕形成をきたす疾患角膜において、水疱性角膜症で 4 眼中 3 眼 (75%)、角膜白斑で 5 眼中 3 眼 (60%)、円錐角膜で 1



水疱性角膜症角膜における α -SMA (赤) および palladin (緑) の発現。角膜実質内では、 α -SMA と palladin が共局在している。

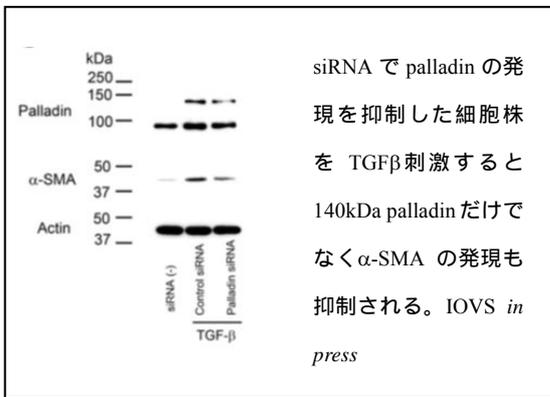
眼中 1 眼に Palladin が発現していた。Palladin が発現していた 7 眼のうち、5 眼で Palladin は α -SMA と共発現していた。

細胞培養系での hCFb において 90kDa の Palladin が発現していたが、TGF β 刺激により 90kDa に加え 140kDa の Palladin が発現した。TGF β の濃度依存性に 140kDa の Palladin の発現が亢進し、その発現は平滑筋アクチン (α -SMA) の発現が亢進する 24 時間ごろより

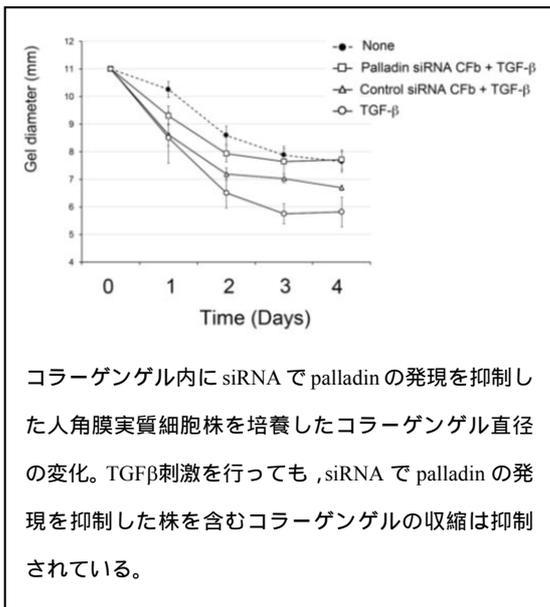


A: TGF β 刺激による 140kDa palladin および α -SMA の発現が濃度依存性に亢進している。B: TGF β 刺激 24 時間後ごろより 140kDa palladin の発現が亢進している。IOVS *in press*

みられた。TGF β のシグナル伝達系の Smad2/3, MEK1, p38 および JNK を阻害した hCFb 培養系を TGF β で刺激すると、140kDa Palladin 及び α -SMA の発現は低下した。



siRNA-Palladin hCFb の発現を抑制すると、



TGFβ 刺激下において 140kDa Palladin および αSMA の発現は抑制された。siRNA-Palladin hCFb をコラーゲングル内に培養し TGFβ で刺激すると対象細胞株と比較してそのゲル収縮は抑制された。

本研究において、(1) Palladin は創傷治癒過程や癒痕形成性角膜疾患において αSMA と共発現すること、(2) TGFβ 刺激により αSMA 発現と同様に 140kDa Palladin の発現が亢進すること、(3) TGFβ シグナル伝達系を阻害する事によって 140kDa Palladin の発現が抑制されること、(4) RNA 干渉現象を用いて hCFb における palladin の発現を抑制すると αSMA の発現およびゲル収縮が抑制されること、が明らかとなった。TGFβ 刺激及び αSMA の発現は角膜実質における癒痕形成に重要な役割を占めており、Palladin の発現が TGFβ 刺激によ

て変化し、また Palladin 自身の発現の抑制が αSMA の動態に影響していることは、Palladin の制御が角膜実質の癒痕形成の制御につながることを示唆していると考えられる。Palladin が α-actinin と共同して actin の重合を行い、さらに α-SMA の発現に関与することは、Palladin の繊細な制御が、角膜実質の創傷治癒を促進したり、逆に過度の創傷治癒の結果である角膜実質の癒痕形成をコントロールしたりするなど、透明な角膜実質の維持に寄与できる可能性を示唆している。将来的には、140kDa Palladin に着目し、角膜実質の癒痕形成のメカニズムの解明や角膜実質癒痕形成の制御方法の開発につなげて行きたいと考えている。

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 1 件)

Morishige N, Murata S, Nakamura Y, Azumi H, Shin-gyou-uchi R, Oki K, Morita Y, Sonoda KH. Coordinated Regulation of Palladin and α-Smooth Muscle Actin by Transforming Growth Factor-β in Human Corneal Fibroblasts. Invest Ophthalmol Vis Sci, in press, 2016, 査読有
doi:なし

〔学会発表〕(計 2 件)

森重 直行, 守田 裕希子, 木村 和博, 園田 康平: 角膜実質細胞におけるアクチン重合関連タンパク質 Palladin の発現. 第 119 回日本眼科学会総会 2015/04/16, ロイトン札幌 (北海道・札幌市)
Morishige N, Murata S, Azumi R, Shin-gyou-uchi Y, Morita Y, Kimura K, Sonoda KH: Coordinated Regulation of Palladin and α-Smooth Muscle Actin by Transforming Growth Factor-β in Human Corneal Fibroblast. ARVO 2015,

2015/05/04 , Denver (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森重 直行 (MORISHIGE , Naoyuki)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号 : 4 0 3 4 6 5 6 5