

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861640

研究課題名(和文) TGF- $\beta$  および炎症性サイトカインシグナルを分子基盤とした房水流出機構の解析

研究課題名(英文) Investigation of regulatory mechanisms of aqueous outflow based on molecular signalings of TGF-beta and proinflammatory cytokines.

研究代表者

井上 みゆき (INOUE, MIYUKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任助教

研究者番号：20631766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は房水流出調節メカニズムを探るため、緑内障患者房水内で高値のTGF- $\beta$ 2とTGF- $\beta$ 2に誘導されるサイトカインに着目した。始めにヒト線維柱帯細胞内におけるTGF- $\beta$ 2の効果調べた結果、TGF- $\beta$ 2はアクチン重合やコラーゲン産生を誘導していた。誘導されたアクチン重合は房水流出を促すROCK阻害剤によって抑制され、コラーゲン産生はp38阻害剤により有意に抑制された。さらにTGF- $\beta$ 2はサイトカインであるIL-6、IL-8産生を促し、TGF- $\beta$ 2によって産生される $\alpha$ -SMA発現はIL-6シグナルの活性化により抑制されていた。このシグナルの相互作用が房水流出調節に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the regulatory mechanisms of aqueous outflow, we assessed the cross talk between TGF- $\beta$ 2 and proinflammatory cytokines in human trabecular meshwork cells, because those levels in aqueous humor were elevated in glaucoma patients. We examined the effect of TGF- $\beta$ 2 on the expression of extracellular matrix. TGF- $\beta$ 2 induced the production of type I collagen, and the effect was significantly inhibited by p38 inhibitor but not by ROCK inhibitor. Additionally, we found that TGF- $\beta$ 2 induced the production of IL-6 and IL-8 from trabecular meshwork cells. Furthermore, TGF- $\beta$ 2 increased the expression of  $\alpha$ -SMA, and the induction was inhibited by treatment with IL-6 in a dose-dependent manner. These data suggest that the crosstalk between TGF- $\beta$ 2 and cytokine signalings may relate to the regulation of aqueous outflow. We are going to examine the molecular mechanisms of this cross talk between TGF- $\beta$ 2 and proinflammatory cytokines more closely in human trabecular meshwork cells.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 線維柱帯細胞 TGF- $\beta$ 2 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

緑内障は世界で約 6-8 千万人が罹患し (Quigley and Broman. *Br J Ophthalmol* 2006) 我が国においても 40 歳以上の緑内障有病率は約 5%と高率で (Iwase et al. *Ophthalmology* 2004) 失明原因の上位を占める。緑内障の最大の危険因子である眼圧上昇は房水流出抵抗上昇が主な原因であるが、その主座は線維柱帯・シュレム管経路の異常にあると考えられている。したがって線維柱帯細胞およびシュレム管内皮細胞における房水流出調節メカニズムを解明することは緑内障治療において重要な意味を持つ。房水中に含まれる生理活性物質のうち、TGF-β2、炎症性サイトカインの濃度は緑内障患者において非緑内障患者と比較して高値であることが申請者の研究室から報告されており (Inatani et al. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001; Inoue et al. *J Cat Refract Surg* 2012) これらの物質が線維柱帯細胞、シュレム管内皮細胞に作用し、房水流出抵抗を変化させることを申請者らは見出している (Tsuboi et al. *IOVS* 2012) 。したがって生理活性物質が房水流出路に及ぼす影響が緑内障病態に重要であり、単独の生理活性物質が線維柱帯細胞やシュレム管内皮細胞に与える影響についてはこれまで多く検討されている。例えば TGF-β は線維柱帯細胞に作用し、細胞外マトリクス産生を促すことで房水流出抵抗を上昇させる作用がある (Li et al. *IOVS* 1998; Gottanka et al. *IOVS* 2004) 。申請者らの研究室では ROCK 阻害剤は単独でも線維柱帯細胞およびシュレム管内皮細胞に作用し房水流出率を上昇させることを明らかにしており (Honjo et al. *IOVS* 2001; Kameda et al. *IOVS* 2012) 、申請者も TGF-β2 が細胞外マトリクスの一つである型コラーゲンの産生誘導を ROCK 阻害剤が抑制していることを見出した。生体の房水においては複数の生理活性物質が同時に存在し房水流出路に作用している可能性を考え合わせると、線維柱帯細胞におけるシグナル間のクロストークを解析することでより生体に近い環境を再現することが可能と考えられるため、緑内障病態を理解するにあたって房水中生理活性物質の相互作用を解析することが重要な意義を持つと考えられる。

2. 研究の目的

緑内障危険因子である眼圧上昇に影響する因子として、緑内障房水中の TGF-β2 とサイトカインの濃度が非緑内障房水と比較して高値であることが報告されているが、房水流出路における両者の相互作用は不明である。本研究の目的はこれまで未解明であった包括的・総合的な房水生理活性物質の作用に着目し、これらの相互作用が房水流出路に与える影響を生体に近い環境で解析することである。本研究によって新たな緑内障病態の知見が得られ、当研究室に蓄積されたデータ

と組み合わせることで将来的な緑内障治療のシーズを見出す端緒となることが期待される。

3. 研究の方法

ヒト線維柱帯細胞はアメリカ ScienCell 社より購入した。線維柱帯細胞内において TGF-β2 単独刺激、または阻害剤の影響を検討するため、アクチン重合、タイプ I コラーゲンのタンパク発現は Western blot 法を用い調べた。また mRNA の発現変化については real-time RT-PCR を用い、転写活性化の検討についてはルシフェラーゼアッセイ法を用い検討を行った。TGF-β2 シグナルの影響については転写因子 Smad2 の活性化を示すリン酸化抗体を用いて Western blot 法によって調べた。阻害剤はアクチン重合に関わる Rho-ROCK シグナルを阻害する ROCK 阻害剤 (Y27632) と細胞内ストレス時に活性化される p38 を阻害する SB203580 を用いた。TGF-β2 によって誘導されるサイトカイン分泌は multiplex immunoassay によって定量した。さらにオートクリン作用を確認するために線維柱帯細胞内における TGF-β2 シグナルと分泌増加が認められたサイトカインシグナルのクロストークを Western blot 法、real-time RT-PCR 法を用いて調べた。

4. 研究成果

(1) TGF-β2 単独刺激によるアクチン重合および細胞外マトリクスへの影響

まず始めに線維柱帯細胞における TGF-β2 シグナルの活性化を確認するため、アクチン重合および細胞外マトリクスへの影響について調べた。TGF-β2 刺激によりアクチン重合を促進する Rho の活性化および MLC2 のリン酸化が認められた。さらに型コラーゲンの産生を有意に誘導することを確認した。次に、他の細胞種で確認されているアクチン重合のシグナルを阻害する ROCK 阻害剤、および細胞内の炎症やストレスに反応して活性化される

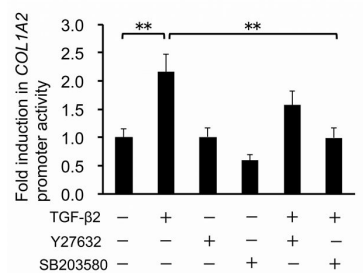


図1 TGF-β2 刺激による1型コラーゲン転写活性化に対する ROCK 阻害剤、p38 阻害剤の効果

p38MAPキナーゼを阻害する p38 阻害剤 (SB203580) が TGF-β2 刺激による効果を阻害するかどうか検討した。その結果、ROCK 阻害剤はアクチン重合については阻害したが、型コラーゲンの転写活性化、mRNA 発現、タンパク発現誘導に関しては有意な抑制効果は見られなかった。p38 阻害剤

に関してはアクチン重合に対する抑制効果は見られなかったが、型コラーゲン発現誘導に関しては有意に抑制効果が見られた。細胞外マトリックスであるファイブロンectinに対しても同様の効果が確認できた。ROCK 阻害剤は眼圧下降薬として認識されているが、主にその効果は細胞外マトリックスに対してよりもアクチン重合阻害によって眼圧下降に寄与している可能性が示唆された。また p38 阻害剤によってはアクチン重合よりも細胞外マトリックスに対する抑制効果が見られ、TGF-β2 刺激による p38 を介した細胞外マトリックスの産生によっても房水流出抵抗が増大している可能性が示唆された。

### (2) TGF-β2 下流シグナルに対する阻害剤の影響

TGF-β2 によって活性化される転写因子 Smad2 がコラーゲンの産生を誘導することが他の細胞種において知られている。そこで線維柱帯細胞における TGF-β2 刺激による Smad2 活性化に対する ROCK 阻害剤、p38 阻害剤の効果について検討を行った。その結果、型コラーゲンの発現誘導に対する効果と同様に ROCK 阻害剤は有意に Smad2 活

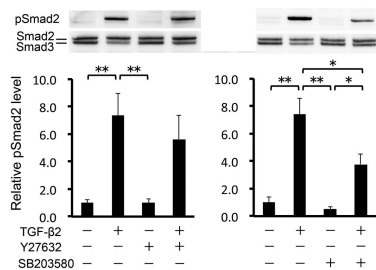


図2. TGF-β2 刺激による Smad2 タンパク発現誘導に対する ROCK 阻害剤、p38 阻害剤の効果

性を抑制しなかったが、p38 阻害剤は有意に Smad2 活性化を抑制した。このことから、房水流出抵抗に Rho-ROCK シグナルの他にコラーゲン誘導を促進する p38 を介する経路も関与していることが示唆された。以上の結果から、線維柱帯細胞において TGF-β2 が様々なシグナルと協調し、アクチン重合および細胞外マトリックス産生に影響を及ぼしていることが示唆された。

### (3) TGF-β2 と協調的に機能するサイトカインの探索

TGF-β2 によって誘導されるサイトカインについて検討を行った。その結果、IL-6、IL-8、PDGF-AA の上昇が確認された。まず始めに線維柱帯細胞における IL-6

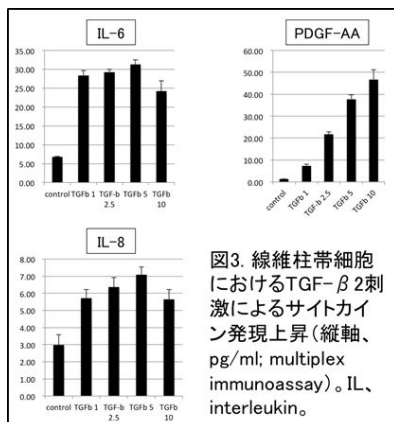


図3. 線維柱帯細胞における TGF-β2 刺激によるサイトカイン発現上昇 (縦軸、pg/ml; multiplex immunoassay)。IL、interleukin。

刺激による転写因子 STAT3 の活性化を確認した。STAT3 は他の細胞種で細胞増殖因子として機能していることが知られている。線維柱帯細胞においても IL-6 刺激により STAT3 の活性化が見られ、IL-6 シグナルが機能していることが確認された。さらに TGF-β2 と IL-6 刺激による相互作用についての検討を行った。まず、創傷治癒や線維化などに関わる SMA 発現に対する効果について調べた。TGF-β2 によって SMA 発現は誘導されるが、その効果は IL-6 刺激濃度依存的に抑制傾向にあった。この結果に関しては現在検討中であり、さらに両者の細胞内相互作用については調べていく必要がある。

以上の結果より、線維柱帯細胞において TGF-β2 シグナルは Rho-ROCK シグナルを活性化しアクチン重合を促進し、またストレスや炎症によって活性化される p38 を介する MAP キナーゼシグナルを活性化して細胞外マトリックス産生を誘導すること、さらにはサイトカインの一つである IL-6 等を誘導し、筋線維芽細胞分化に関わる SMA 等の産生において相互作用している可能性が示唆された。これらのシグナルの相互作用

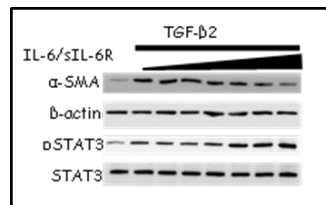


図4. TGF-β2 刺激によって誘導される SMA 発現に対する IL-6/sIL-6R 刺激の効果

が房水流出機構のメカニズムにどの

ように関与しているかを今後の課題として、検討していきたい。

### 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)

- Miyuki Inoue-Mochita, Toshihiro Inoue, Tomokazu Fujimoto, Takanori-Kameda, Nanako Awai-Kasaoka, Naoki Otsu, Kenichi Kimoto, Hidenobu Tanihara. p38 MAP kinase inhibitor suppresses Transforming Growth Factor -2 induced type 1 collagen production in trabecular meshwork cells, PLOS ONE, 査読あり、March 23, 2015, 1-13. DOI: 10.1371/journal.pone.0120774

[学会発表](計 2 件)

- 井上みゆき、線維柱帯細胞内 TGF-β2 シグナルに対する ROCK 阻害剤および p38 阻害剤の影響、日本眼科学会、2014 年 4 月 2 日~6 日、帝国ホテル(東京)
- Miyuki Inoue-Mochita, Effect of p38 inhibitor on TGF-β2 signal in trabecular meshwork cells, ARVO (The association

for research in Vision and  
Ophthalmology)2014年5月4日~5月8  
日、Orland, FL, USA.

〔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：  
出願年月日：  
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

井上 みゆき (Inoue Miyuki)

熊本大学 大学院生命科学研究科 特任  
助教

研究者番号：20631766

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：