

ミオカルディン関連転写因子 A シグナル伝達阻害による
網膜色素上皮細胞の上皮間葉系移行に対する抑制効果の検討

氏名 小林 正明

所属 山口大学大学院医学系研究科

情報解析医学系専攻 眼科学分野

平成 31 年 1 月

目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	2
3. 目的	3
4. 方法	3
(1) 対象	3
(2) 方法	3
(3) 解析	7
5. 結果	8
6. 考察	16
7. 結語	19
8. 謝辞	19
9. 関連論文との関係性	19
10. 参考文献	20

要旨

目的 網膜色素上皮(RPE)細胞における上皮間葉転換(EMT)は、黄斑変性症に代表される網膜下線維症の発症及び増悪に関与している。ミオカルディン関連転写因子(MRTF)-A が RPE 細胞の EMT に及ぼす影響を検討した。

方法 培養ヒト RPE-1 細胞の遊走能を Scratch Assay で評価した。RPE-1 細胞における MRTF-A の細胞内分布を免疫蛍光染色法及びウェスタンブロットティング法により解析した。RPE-1 細胞における α 平滑筋アクチン(α -SMA), I 型コラーゲン(COL1), 結合組織成長因子(CTGF), パキシリンについて, ウェスタンブロットティング法または reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction(RT-qPCR)法によって解析した。マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)-2 はゼラチンザイモグラフィーで評価した。マウスモデルにおいて, 網膜光凝固によって誘導した網膜下線維症を蛍光免疫染色法により解析した。

結果 MRTF-A シグナル伝達阻害剤 CCG-1423 は, 濃度依存的に RPE-1 細胞の遊走を抑制した。トランスフォーミング増殖因子(TGF)- β 2 は, RPE-1 細胞における MRTF-A の核内移行を誘導し, CCG-1423 はこれを抑制した。TGF- β 2 は, α -SMA, パキシリン, pro MMP-2 におけるタンパク質量, 及び α -SMA, COL1, CTGF の mRNA 量を増加させ, CCG-1423 はこれを抑制した。CCG-1423 を硝子体腔内投与することで, 網膜光凝固により誘導された網膜下線維症が抑制された。

結論 RPE 細胞の EMT 及び *in vivo* における網膜下線維症の形成に MRTF-A が関与することを示した。

網膜下線維症を有する眼疾患において, MRTF-A が潜在的な治療標的になり得ることが示された。

研究の背景

黄斑変性は、我が国における視覚障害の原因疾患として第4位を占め、¹ 滲出型加齢黄斑変性では、脈絡膜血管新生(CNV)の結果として網膜下線維症による視覚障害を生じる。² 滲出型加齢黄斑変性の治療には、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)阻害剤の硝子体注射、光線力学療法、及び網膜光凝固術がある。³ VEGF阻害剤による滲出型加齢黄斑変性の治療は視機能の維持に寄与するが、網膜下線維症の増悪を招くことがある。⁴ 網膜下線維症は網膜脈絡膜の組織構造を破壊し、視機能を低下させる。² CNVに続発した網膜下線維症は、網膜色素上皮(RPE)細胞の上皮間葉転換(EMT)、炎症細胞浸潤、細胞外マトリックス(ECM)の過剰産生と沈着など、様々な生体機構によって増殖する。^{2,5} EMTは、上皮細胞としての特性の喪失とECM産生を伴った組織侵襲的な変化を特徴とする。^{6,7} また、細胞接着能は細胞移動における重要な機能のひとつであり、パキシリンの活性化は細胞の遊走能だけでなくEMTにも関与する。⁸ EMTは、 α -SMA、COL1、及びフィブロネクチンなどのECMやCTGFなどのタンパク質の発現が亢進する。⁹⁻¹¹ マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)はEMTに関与しており、TGF- β はこれを亢進する。^{7,11-14} RPE細胞のEMTは、滲出型加齢黄斑変性だけでなく、増殖硝子体網膜症や増殖糖尿病網膜症、ぶどう膜炎などの網膜疾患による線維化の増悪にも関与している。^{3,15-17}

MRTF-Aは、生体内にユビキタスに発現する転写因子であり、炎症反応や細胞増殖、外的ストレスなどの様々な要因によって活性化する。^{18,19} 生体内における非活性状態のMRTF-Aは、RPELモチーフを介して単量体(G-)アクチンと複合体を形成し細胞質に局在しており、活性化すると細胞質から核内へ移行して、細胞増殖や細胞収縮、EMTなどを誘導する標的遺伝子の産生を亢進させる。²⁰ MRTF-Aの活性化は、CCG-1423によって阻害される。CCG-1423は、MRTF-Aの核局在化シグナル配列に特異的に結合するこ

とで核内移行を阻害する薬理作用をもった物質であり,²¹⁻²³ 家兔の緑内障濾過手術モデルにおいて濾過胞の線維化に対する抑制効果を示している。²⁴

目的

RPE 細胞の EMT における MRTF-A の関与, 及び CCG-1423 を用いた MRTF-A 阻害による EMT 抑制効果を検討する。生体内での網膜下線維症における, CCG-1423 を用いた MRTF-A 阻害による線維性増殖に与える影響を検討する。

方法

(1) 対象

10%ウシ胎児血清(FBS)を加えたダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)/D6429(Invitrogen-Gibco, Rockville, メリーランド州)にて培養したヒト培養 RPE 細胞(RPE-1)を用いて, *in vitro* における各検討を行った。RPE-1 は American Type Culture Collection (Manassas, ヴァージニア州)が提供する不死化ヒト RPE 細胞である。*in vivo* の検討には, 日本 SLC(静岡県)が提供する C57BL/6J マウス(雌, 8 週齢)の個体を用いた。

(2) 方法

スクラッチアッセイ

24 ウェルプレートに播種した RPE-1 細胞(4×10^4 cells /well)を 48 時間培養し, 血清を除去して 24 時間培養後, DMEM / D6429 中で 0~3 μ M の CCG-1423 に 30 分間曝露した。次に, 先端部がゴム製のペンを

用いて、プレート上の細胞層に直線的に幅約 1mmの傷を付けた。0.3%FBS または 0.3%FBS に各濃度の CCG-1423(Cayman Chemical, Ann Arbor, マイアミ州)を加えた DMEM/D6429 にて培養し、処置直後および 24 時間後に BZ-X710 蛍光顕微鏡(キーエンス, 大阪)で撮影を行い, ImageJ ソフトウェアバージョン 1.50i(NIH, Bethesda, MD)にて創傷面積を測定した。

細胞増殖アッセイ

24 ウェルプレートに播種した RPE-1 細胞(3×10^4 cells /well)を 48 時間培養し、血清を除去して 24 時間培養後、0.3%FBS または 0.3%FBS に $1\mu\text{M}$ CCG-1423 を加えた DMEM/D6429 に $10\mu\text{M}$ BrdU を添加して 37°C で 1 時間培養した。細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、 37°C で 30 分間 2M HCl に曝露し、0.1M ホウ酸ナトリウムで中和した後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、3%ウシ血清アルブミン(BSA)及び 100 倍希釈した抗プロモデオキシウリジン(BrdU)抗体(BD Bioscience, Franklin Lakes, ニュージャージー州)を加えた PBS で 4°C にて一晚曝露した。標本を PBS で洗浄し、200 倍希釈した Alexa Fluor®-488 結合二次抗体(Invitrogen)を加えた PBS に室温で 1 時間曝露して、再度 PBS で洗浄した後、4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)で染色した。染色した標本は、BZ-X710 蛍光顕微鏡で観察した。

免疫蛍光染色

24 ウェルプレートに 12mmカバーガラスを敷き、カバーガラス上で RPE-1 細胞を 48 時間培養し、血清を除去して 24 時間培養後、無血清の DMEM/D6429 群と TGF- β 2($10\text{ng}/\text{mL}$)を加えた群のそれぞれに、 $1\mu\text{M}$ CCG-1423 または 0.03%ジメチルスルホキシドのいずれかを加えて 24 時間培養した。次に細胞を、4%パラホルムアルデヒドを加えた PBS で 4°C にて 15 分間固定し、室温で 0.1%オクチルフェノールエ

トキシレートに 5 分間曝露してから PBS で 2 回洗浄し, 1%BSA を含む PBS で 100 倍に希釈した抗 MRTF-A 抗体(Abcam, Cambridge, イギリス), 及び 200 倍に希釈した抗 α -SMA 抗体(Sigma-Aldrich, St.Louis, ミズーリ州)に 4°Cで一晩曝露した。その後, 細胞を PBS で洗浄し, 1%BSA を含む PBS でそれぞれ 200 倍に希釈した Alexa Fluor® 488 または Alexa Fluor® 568 結合二次抗体(Invitrogen)と共に室温で 1 時間曝露してから, DAPI を含む封入剤を加え, BZ-X710 蛍光顕微鏡で観察した。

ウェスタンブロッティング

60mm 培養プレート(3×10^5 cells/dish)に RPE-1 細胞を播種し, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaF, 1% Nonidet P-40, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA, 1 mM EGTa, 0.25% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.25% sodium deoxycholate, 及びタンパク質分解酵素阻害剤の混合液にて溶解した。核分画のタンパク質抽出では, 60mm 培養プレート(3×10^5 cells/dish)に播種した RPE-1 細胞を, NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents(Thermo Scientific, Waltham, マサチューセッツ州)を用いて溶解した。溶解物を 7.5%または 10%の SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し, ゲル上のタンパク質をニトロセルロース膜に転移した後, 5%スキムミルクを加えた PBS でブロッキングを行った。その後, ニトロセルロース膜に対して抗 MRTF-A 抗体(Cell Signaling Technology, Danvers, マサチューセッツ州), セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合二次抗体, Enhanced chemiluminescenc (ECL) 試薬(GE Healthcare, Little Chalfont, イギリス)の順に曝露し, 免疫反応によって発現したバンドを観察した。バンドの発現強度は ImageJ ソフトウェアを用いて解析した。

ゼラチンゼイモグラフィー

100mm培養プレートにて培養した RPE-1 細胞から調製した溶解物を, 非還元 SDS サンプル緩衝液 (125mM Tris-HCl [pH6.8], 20%グリセロール, 2%SDS, 0.002%ブromoフェノールブルー)と混合し, 得られた混合物は, 0.1%ゼラチンを含んだ 10%SDS-ポリアクリルアミドゲル上で 4°Cにて電気泳動した. ゲルを 2.5%Triton X-100 で 1 時間洗浄した後, 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM CaCl₂, および 1%Triton X-100 を含んだ混合溶液に 37°Cで 18 時間曝露した. ゲルはクマシーブリリアントブルーにて染色後に観察した.

RT-qPCR

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, オランダ)を用いて 60 mm 培養プレートで培養した細胞から RNA を単離し, ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡, 大阪)を用いて逆転写を行った. 得られた cDNA は, SYBR Green reagents(Life Technologies, Carlsbad, カリフォルニア州)及び StepOnePlus™リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems, Foster City, カリフォルニア州)を用いて qPCR 分析を行った. 各 mRNA 量は, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の mRNA 量によって補正した. 使用したプライマーの配列は以下の通り.

5'-GAATCCTGTGAAGCAGCTCCA-3', 5'-CCACGTAGCTGTCTTTTTGTCC-3' (ACTA2, NM_001141945)
5'-GAGGGCCAAGACGAAGACATCC-3', 5'-CACAGATCACGTCATCGCACAAAC-3' (COL1A1, NM_000088.3)
5'-GACCTGGAAGAGAACATTAAGAAG-3', 5'-CCACAGAATTTAGCTCGGTATG-3' (CTGF, NM_001901.2)
5'-AGCCTCAAGATCATCAGCAAT-3', 5'-CCTTCCACGATACCAAAGTTGT-3' (GAPDH, NM_002046.5)

マウスモデルにおける CNV 及び網膜下線維化

本研究における動物実験は, 山口大学医学部動物実験指針, 及び the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research を遵守して施行した. 各マウスに網膜光凝固 (波長 532 nm; 時

間 0.1 秒; スポットサイズ 75 μ m; 出力 200 mW) を施し, PBS に溶解した濃度別の CCG-1423 を 1 μ L ずつ硝子体腔に注射した. CNV 評価は硝子体腔注射を光凝固直後に行い, 7 日後に安楽死させて眼球を摘出した. 網膜下線維化評価は硝子体腔注射を光凝固直後及び 7 日後に行い, 21 日後に安楽死させて眼球を摘出した. 摘出後に, PBS で希釈した 4%ホルムアルデヒドで氷上にて 2 時間固定し, 脈絡膜フラットマウントを作成した後, 100%メタノールで 4 $^{\circ}$ Cにて 20 分間固定した. 5%スキムミルクを加えた PBS で室温にて 1 時間ブロッキングし, CNV 群は 100 倍希釈した Alexa Fluor 488-conjugated isolectin GS-IB4(Invitrogen), 網膜下線維化群は 100 倍希釈した抗 COL1 抗体に, それぞれ 4 $^{\circ}$ Cにて 24 時間曝露した. COL1 は 1000 倍希釈した Alexa Fluor 568 結合二次抗体に室温で 90 分間曝露した. 抗体曝露後は PBS で洗い, それぞれ PBS で希釈した 50%グリセロールで封入した標本を, BZ-X710 蛍光顕微鏡で観察し, ImageJ で解析した.

(3) 解析

定量化したデータはダネット多重比較検定で解析したものを平均値 \pm 標準誤差で表記した. $P < 0.05$ を統計的に有意とした.

結果

RPE-1 細胞の遊走における MRTF-A 阻害の効果

RPE-1 細胞の遊走能に対する MRTF-A シグナル阻害剤 CCG-1423 の影響を *in vitro* におけるスクラッチアッセイで検討した。処置から 24 時間後の創傷面積はコントロール群で顕著に縮小した一方で、CCG-1423 投与群では 1 μ M 及び 3 μ M 群において濃度依存的に面積の縮小率が小さくなり、細胞遊走が抑制された(図 1A,B)。

RPE-1 細胞の増殖における MRTF-A 阻害の効果

RPE-1 細胞の増殖能に対する MRTF-A シグナル阻害剤 CCG-1423 の影響を、BrdU の取り込み率から検討した。各群の BrdU 取り込み率は 0.93% から 1.32% であり、各群間に有意差は認めなかった(図 1C)。

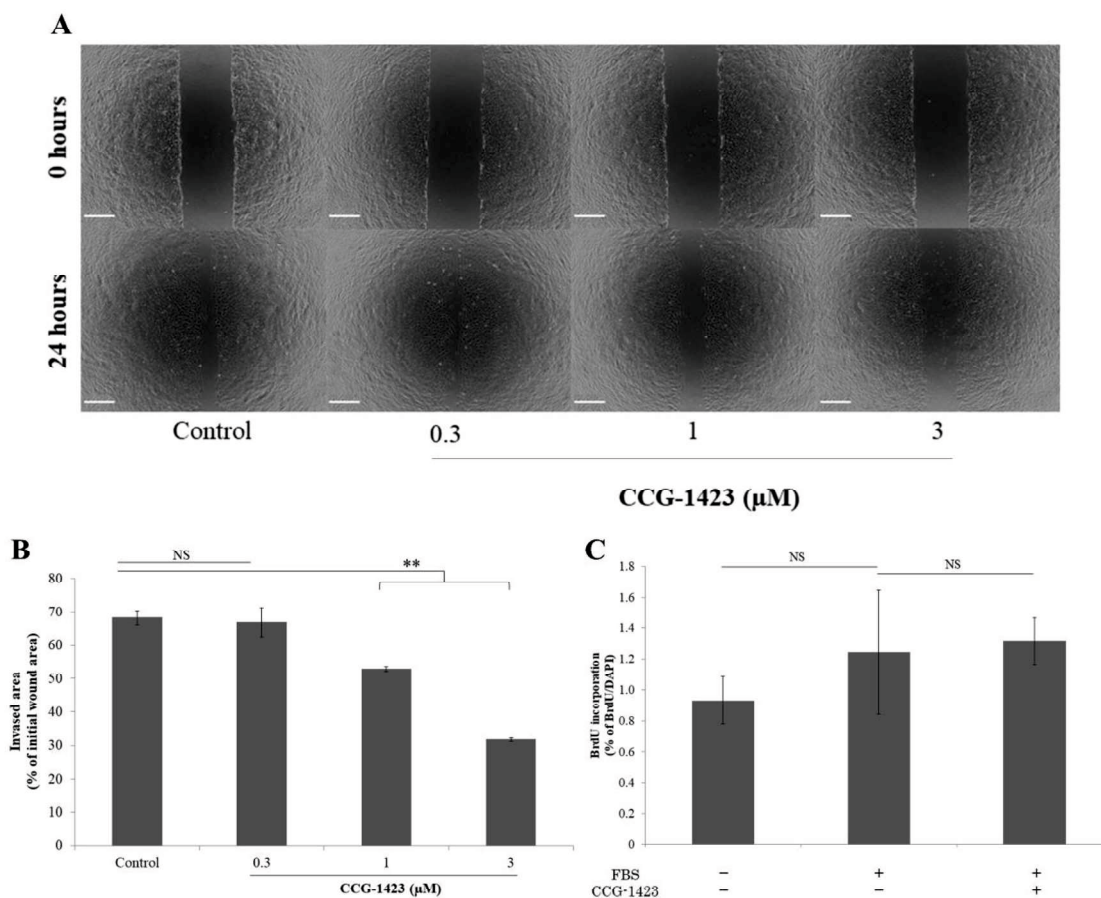


図 1. RPE-1 細胞遊走及び増殖に対する MRTF-A 阻害の効果. RPE-1 細胞の血清除去は 24 時間行った. (A) 細胞層に約 1mm 幅の直線的な傷をつけた後, 0.3%FBS または 0.3%FBS 及び 0.3-3 μ M CCG-1423 を加えた DMEM/D6429 で 24 時間培養してから, 写真撮影を行い創傷面積の測定を行った. Scale bar: 500 μ m. (B) RPE-1 細胞の遊走によって覆われた面積を測定し解析した. (C) RPE-1 細胞を, 0.3%FBS または 0.3%FBS に 1 μ M CCG-1423 を加えた DMEM/D6429 で, それぞれ 10 μ M BrdU を加えて 1 時間培養し, 固定して BrdU の取り込み率を免疫蛍光染色で解析した. 母数は DAPI 染色陽性であった細胞核数として, BrdU 陽性細胞数を百分率で比較した. 平均値 \pm 標準誤差 (n=4). ** P < 0.01. NS 有意差なし(ダネット検定).

TGF- β 2 及び CCG-1423 が RPE-1 細胞の MRTF-A 細胞内局在に与える影響及び EMT マーカーの発現に

与える影響の検討

免疫蛍光染色によって RPE-1 細胞における MRTF-A の細胞内局在, 及び α -SMA の発現を検討した. 未刺激の細胞では, MRTF-A は主に細胞質に局在した. 細胞を 10 ng/mL TGF- β 2 に 24 時間曝露すると, MRTF-A の局在は核内へと移行した. 1 μ M CCG-1423 を加えた群では MRTF-A の核内移行は抑制された(図 2A). また RPE-1 細胞において, TGF- β 2 は, EMT で発現が増強するタンパク質 α -SMA の発現を誘導した. この反応は CCG-1423 によって抑制された(図 3A). ウェスタンブロッティングでは, 核内分画のタンパク質において MRTF-A は免疫蛍光染色と同様の変化を示し, α -SMA においても免疫蛍光染色と同様の変化を示すことが確認された(図 2,3). また, RT-qPCR によって EMT 関連タンパク質の遺伝子発現を検討した. TGF- β 2 は, RPE-1 細胞中の α -SMA(ACTA2), COL1(COL1A1), 及び CTGF の mRNA 量を増加させ, これらは CCG-1423 存在下では発現が減少した(図 4).

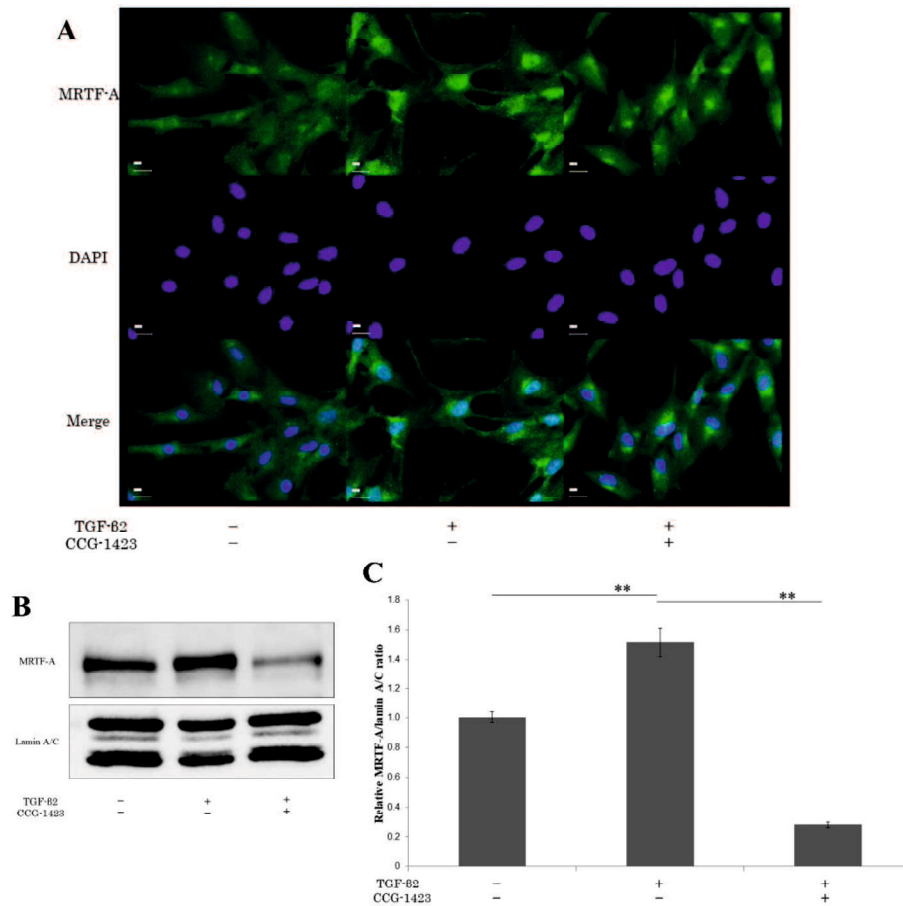


図2. TGF- β 2 及び CCG-1423 が RPE-1 細胞の MRTF-A 細胞内局在に与える影響の検討. RPE-1 細胞の血清除去は 24 時間行った. TGF- β 2 (10ng/mL) または TGF- β 2 及び 1 μ M CCG-1423 を加えた DMEM/D6429 で 24 時間培養してから, 固定して MRTF-A の免疫蛍光染色を行い解析した. (A) 核は DAPI で染色した. Scale bar: 20 μ m. (B) RPE-1 細胞の核内分画における MRTF-A のタンパク発現の解析. TGF- β 2 (3ng/mL) または TGF- β 2 及び 1 μ M CCG-1423 を加えた DMEM/D6429 にて 24 時間培養後, 核抽出物を調製し, ウェスタンブロッティングで解析した. 抗体は MRTF-A または Lamin A/C(ローディングコントロール). (C) 核内分画における Lamin A/C に対する MRTF-A の相対比を示した. 平均値 \pm 標準誤差 (n=3), ** P < 0.01 (ダネット検定).

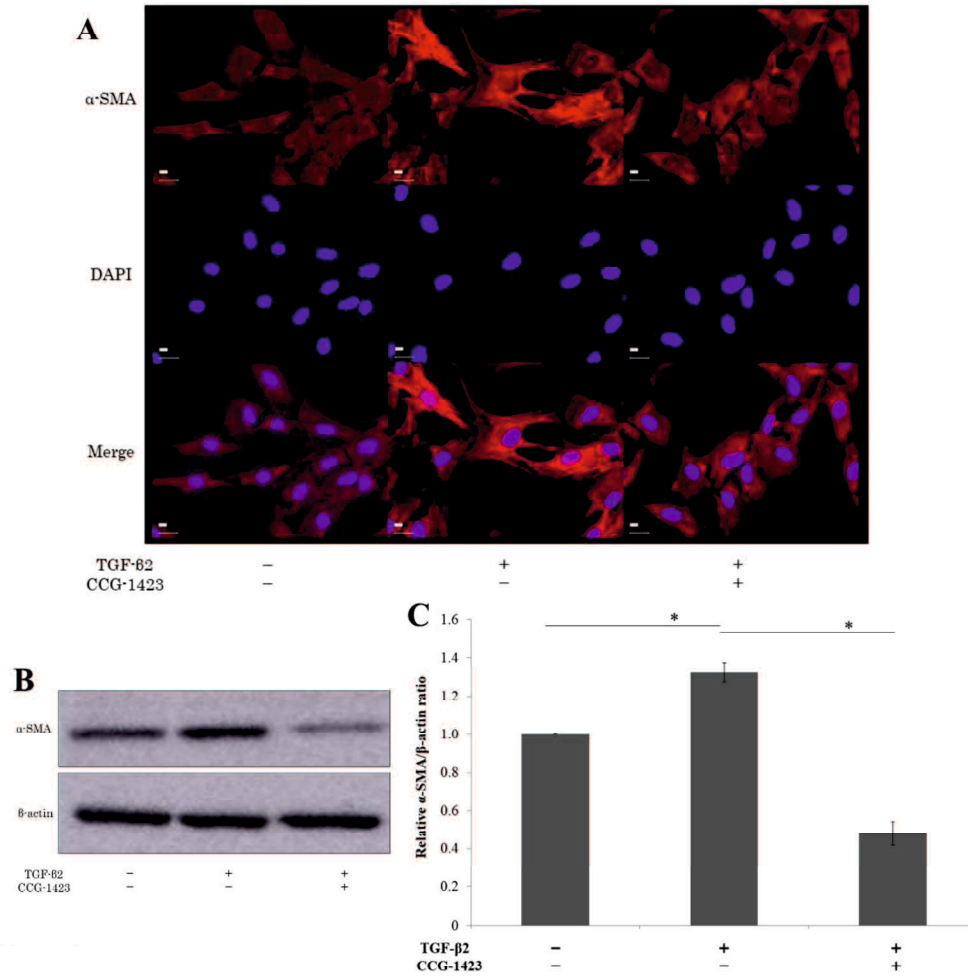


図3. TGF- β 2 及び CCG-1423 が RPE-1 細胞における α -SMA の発現に与える影響の検討. RPE-1 細胞の血清除去は 24 時間行った. TGF- β 2 (10ng/mL) または TGF- β 2 及び 1 μ M CCG-1423 を加えた DMEM/D6429 で 24 時間培養してから, 固定して α -SMA の免疫蛍光染色を行い解析した. (A) 核は DAPI で染色した. Scale bar: 20 μ m. (B) RPE-1 細胞における α -SMA タンパク発現の解析. TGF- β 2 (3ng/mL) または TGF- β 2 及び 1 μ M CCG-1423 を加えた DMEM/D6429 にて 24 時間培養後, 細胞を溶解して抽出物を調製し, ウェスタンブロッティングで解析した. 抗体は α -SMA または β -actin(ローディングコントロール). (C) 抽出タンパク質における α -SMA/ β -actin の相対比を示した. 平均値 \pm 標準誤差 (n=4). * P < 0.05 (ダネット検定).

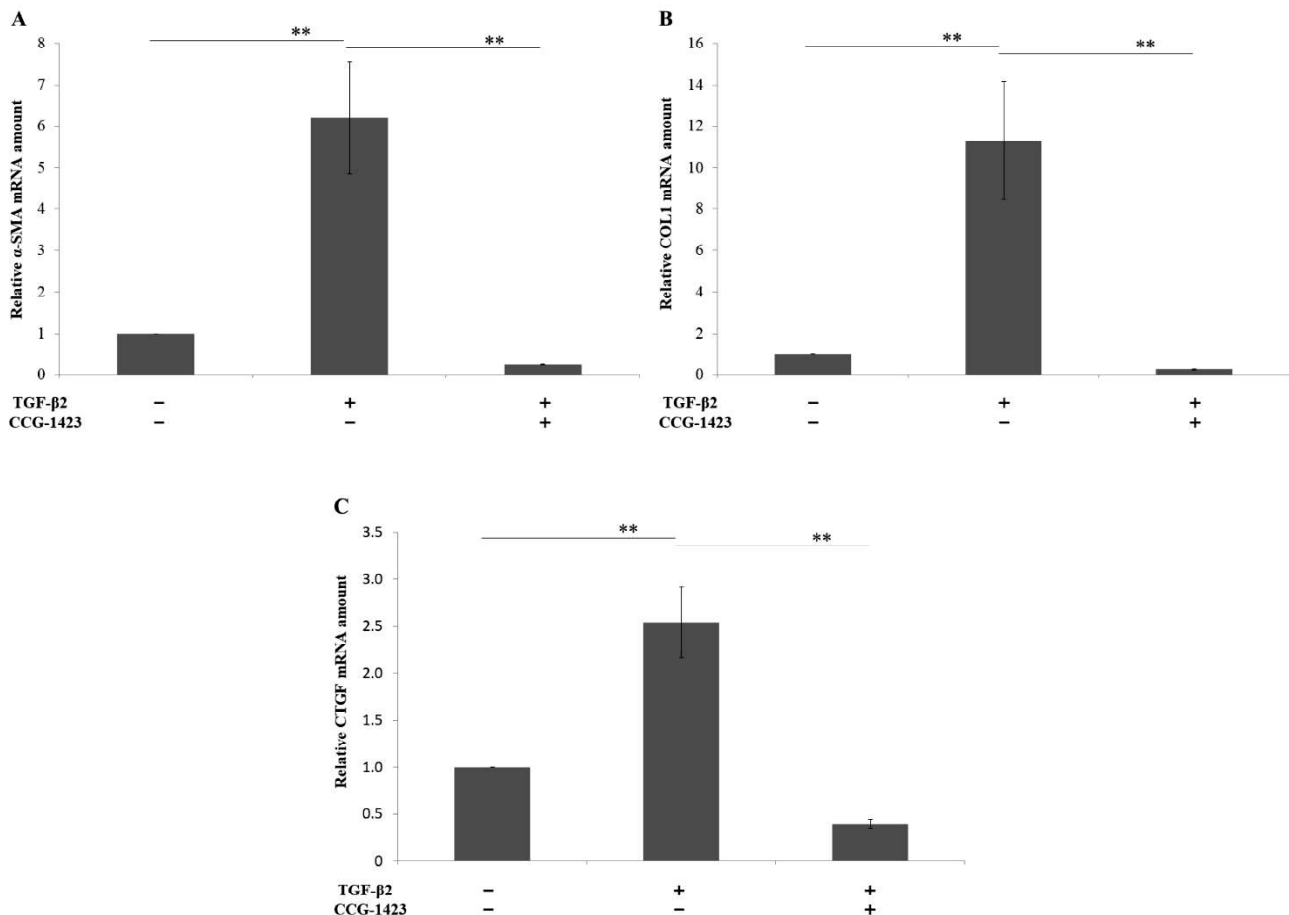


図4. TGF-β2 及び CCG-1423 が RPE-1 細胞における EMT 関連遺伝子の発現に与える影響の検討. RPE-1 細胞の血清除去は 24 時間行った. TGF-β2 (3ng/mL) または TGF-β2 及び 1μM CCG-1423 を加えた DMEM/D6429 にて 24 時間培養後, α-SMA (ACTA2) (A), COL1 (COL1A1) (B), CTGF (C)の相対的な mRNA 量を RT-qPCR 解析により決定した. 相対化は GAPDH の mRNA 量によって行った. 平均値±標準誤差 (n=3). ** P <0.01 (ダネット検定).

TGF-β2 及び CCG-1423 が RPE-1 細胞のパキシリン及び pro MMP-2 の発現に与える影響の検討

ウェスタンブロッティングによって, TGF-β2 が RPE-1 細胞において細胞接着に関連するタンパク質であるパキシリンの発現を増強し, CCG-1423 はこの反応を抑制することが示された(図 5). 同様に, ゼラチンゼンモグラフィーによって, TGF-β2 が RPE-1 細胞における pro MMP-2 の発現を増強し, CCG-1423 存在下ではこの発現が抑制することが示された(図 6). 本検討では活性型の MMP-2 は検出されなかった.

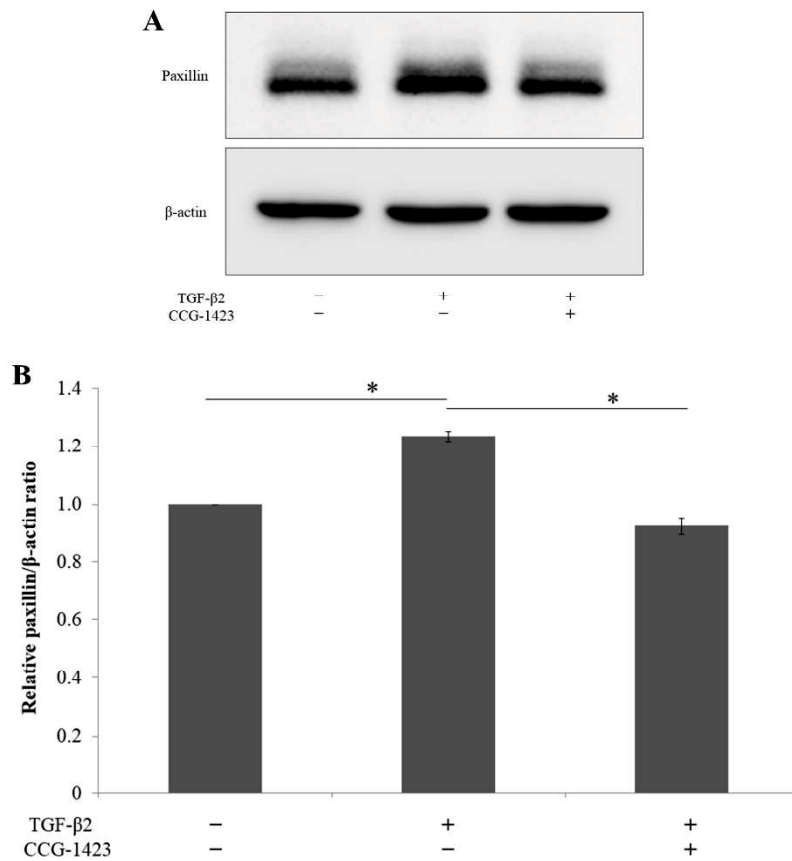


図 5. TGF- β 2 及び CCG-1423 が RPE-1 細胞のパキシリンの発現に与える影響の検討. RPE-1 細胞の血清除去は 24 時間行った. (A) TGF- β 2 (3ng/mL) または TGF- β 2 及び 1 μ M CCG-1423 を加えた DMEM/D6429 にて 24 時間培養後, 細胞を溶解して抽出物を調製し, 抗パキシリン抗体を用いてウェスタンブロッティングで解析した. (B) 抽出タンパク質における paxillin/ β -actin の相対比を示した. 平均値 \pm 標準誤差 (n=3). * P < 0.05 (ダネット検定).

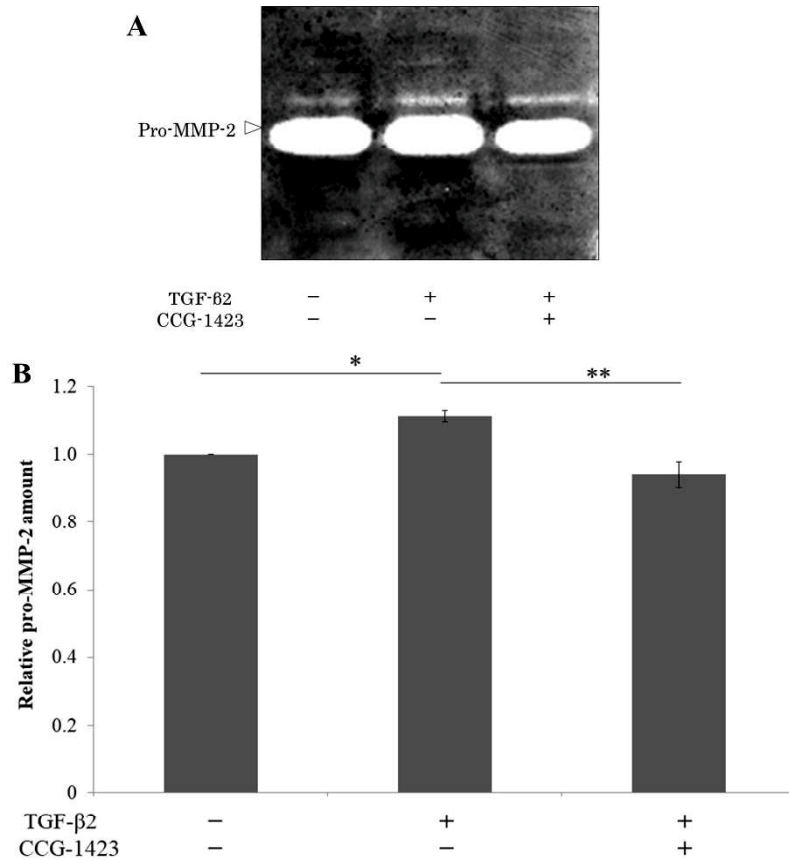


図 6. TGF-β2 及び CCG-1423 が RPE-1 細胞の pro MMP-2 の発現に与える影響の検討. RPE-1 細胞の血清除去は 24 時間行った. (A) TGF-β2 (3ng/mL) または TGF-β2 及び 1μM CCG-1423 を加えた DMEM/D6429 にて 24 時間培養後, 細胞を溶解して抽出物を調製し, ゼラチンゼイモグラフィで解析した. (B) ゲル中の pro MMP-2 バンドの強度を相対比として示した. 平均値±標準誤差 (n=2), * P < 0.05, ** P < 0.01 (ダネット検定).

CNV 及び網膜下線維症のマウスモデルにおける CCG-1423 の効果の検討

レーザー網膜光凝固によって作成した滲出型加齢黄斑変性のマウスモデルを用いて, CCG-1423 が CNV 及び網膜下線維症の形成に与える影響を検討した.⁵ 滲出型加齢黄斑変性の CNV 及び網膜下線維症の形成では TGF-β2 シグナルが重要な役割を担う.²⁵ Isolectin GS-IB4 で CNV を可視化した脈絡膜フラットマウントの免疫蛍光染色では, 光凝固直後に CCG-1423 を硝子体腔内に投与することで, 処置後 7 日目時点で CNV の形成に有意な差は認めなかった(図 7). 一方で, COL1 で網膜下の線維化を可視化した脈絡膜フラットマウントの免疫蛍光染色では, 光凝固直後と処置後 7 日目に CCG-1423 を硝子体腔内に投与する

ことで、処置後 21 日時点で網膜下の線維化面積に有意な縮小が見られた。これは CCG-1423 を 60 μ M または 200 μ M、各 1 μ L 硝子体腔内に投与した群で有意差を示し、CCG-1423 に対して濃度依存的な傾向が見られた(図 8)。

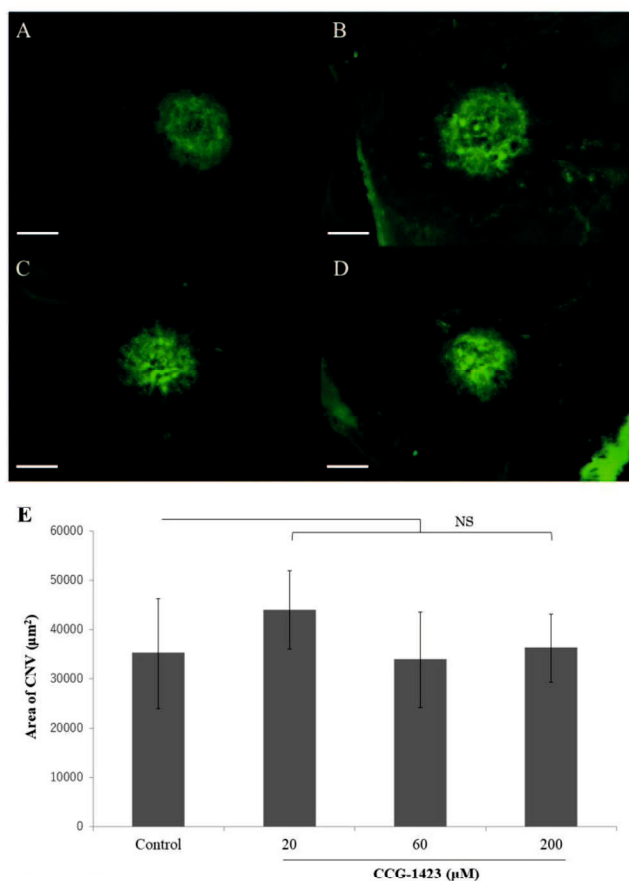


図 7. CNV マウスモデルにおける CCG-1423 の効果の検討。(A-D) 網膜光凝固後 7 日目のマウスの脈絡膜フラットマウント標本における Isolectin GS-IB4 による蛍光免疫染色。光凝固直後に、PBS (A)、または 20 μ M (B)、60 μ M (C)、200 μ M CCG-1423 (D) のそれぞれを各 1 μ L 硝子体腔内に注射した。Scale bar: 100 μ m。(E) 測定した各群の CNV 面積。平均値 \pm 標準誤差 (n = 14-20)。NS 有意差なし (ダネット検定)。

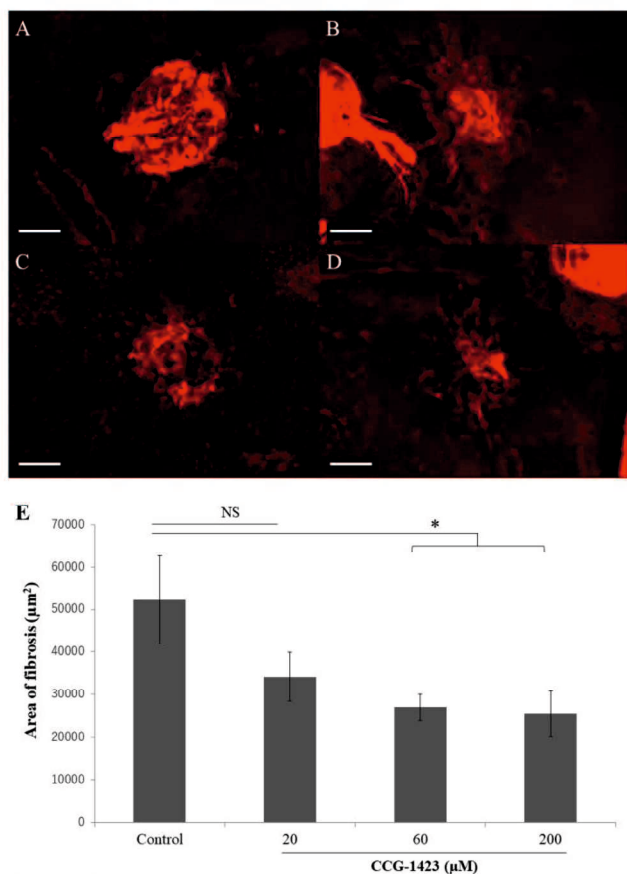


図 8. 網膜下線維症マウスモデルにおける CCG-1423 の効果の検討. (A-D) 網膜光凝固後 21 日目のマウスの脈絡膜フラットマウント標本における COL1 による蛍光免疫染色. 光凝固直後及び 7 日後に, PBS (A), または 20 μ M (B), 60 μ M (C), 200 μ M CCG-1423 (D) のそれぞれを各 1 μ L 硝子体腔内に注射した. Scale bar: 100 μ m. (E) 測定した各群の線維化面積. 平均値 \pm 標準誤差 (n = 10-18). * P < 0.05, NS 有意差なし (ダネット検定).

考察

今回の研究では, MRTF-A シグナル伝達阻害剤 CCG-1423 がヒト RPE 細胞の遊走活性を抑制し, それらの増殖活性に影響を及ぼさないことを示した. しかしながら, MRTF-A は上皮細胞の増殖に関与するとの報告もあり, CCG-1423 による RPE 細胞の増殖に与える影響は今後の検討が必要である.²⁶ MRTF-A は定常状態において RPE-1 細胞の細胞質に主たる局在があったが, TGF- β 2 の刺激によって核内へ移行が見られた. この反応は CCG-1423 によって抑制された. さらに CCG-1423 は, タンパク質において EMT 関連タンパク質である α -SMA の, mRNA において EMT 関連分子である α -SMA, COL1, CTGF の TGF-

$\beta 2$ による発現の亢進を抑制した。同様に, RPE-1 細胞において, TGF- $\beta 2$ によって誘導されたパキシリン及び pro MMP-2 の発現が CCG-1423 によって抑制された。生体内においても, マウスモデルにおいて, CCG-1423 は網膜下線維症の形成を抑制した。ただし, 線維化に先行する CNV の形成に関して CCG-1423 による有意な変化は見られず, このことから CCG-1423 が線維性変化に直接的に作用していることが示唆された。これらの結果は, MRTF-A シグナルが, 滲出型加齢黄斑変性に関連する病態である, 網膜下線維症の形成において重要な役割を果たしている可能性を示している。

上皮細胞から間葉系細胞への分化転換である EMT は, 創傷治癒, 線維化, 細胞遊走を含む多くの生物学的プロセスに寄与している。²⁷⁻²⁹ EMT は TGF- β , CTGF, epidermal growth factor, fibroblast growth factor などの様々な因子によって引き起こされ,^{14,30-33} これらの因子は, 細胞の運動性を亢進したり, 細胞の形質を転換することで細胞特性を変化させる。³⁴ また, EMT 関連タンパク質 α -SMA の発現が亢進した RPE 細胞が, 滲出型加齢黄斑変性患者の網膜線維芽細胞組織から検出されている。³⁵ 今回の研究では, CCG-1423 がヒト RPE 細胞の運動性を抑制することを明らかにした。さらに, RPE-1 細胞における TGF- $\beta 2$ による α -SMA, COL1, 及び CTGF の発現が, CCG-1423 によって抑制されることを示した。マウスモデルにおいては, CCG-1423 は CNV の形成に影響を与えず網膜下線維症の形成を抑制したことから, CCG-1423 は直接的に網膜下線維症の形成を阻害しており, CNV の形成に対する阻害効果に起因するものではないことが示唆された。これらの結果は, CCG-1423 がヒト RPE 細胞における EMT 及び網膜下線維症の形成に対して阻害効果を有することを示しており, したがって, 滲出型加齢黄斑変性の後期に形成される網膜下線維組織とその収縮性変化を抑制し得ることを示唆する。

TGF- β は細胞接着タンパク質の発現を調節している。^{36,37} 過去に我々は, TGF- $\beta 2$ が RPE 細胞中のパキ

シリリンにおけるリン酸化の割合を増加させ、レチノイン酸受容体- γ (RAR- γ)アゴニストである R667 がこの効果を阻害することを報告した。⁵ 本研究では、TGF- β 2 は RPE-1 細胞におけるパキシリンの発現を増加させ、CCG-1423 はこの反応を阻害した。接着斑を介した細胞接着の阻害は、細胞遊走に対する CCG-1423 の阻害効果に関連している可能性がある。既報では、MRTF-A の活性化は細胞接着を促進することが示されている。³⁸

組織リモデリングおよび ECM タンパク質の沈着は MMP の影響を受ける。³⁹ 過去に我々は、TGF- β 2 が RPE 細胞の MMP 活性を亢進することを示しており、⁵ 本研究では、TGF- β 2 が pro MMP-2 の発現を増加させ、CCG-1423 が RPE-1 細胞でこの反応を抑制することを見出した。また、CCG-1423 が TGF- β 2 によって亢進する COL1 など EMT 関連タンパク質の発現を抑制することから、MRTF-A が生体における網膜下の線維性組織形成を誘導する ECM の産生及び分解に深く関与している可能性がある。

過去に我々は、RAR- γ アゴニスト R667 ならびに女性ホルモンが、RPE 細胞における TGF- β 2 を介した EMT を阻害することを示した。^{5,40} また、R667 はマウスモデルにおいて網膜下線維症の形成を抑制した。

⁵ MRTF-A に関しては、エストロゲン 17 β -エストラジオールはヒト乳癌細胞において MRTF-A 発現を増加させるとの報告がある。⁴¹ さらに、MRTF-A は骨髄由来の間葉系幹細胞のレチノイン酸による神経分化において下流のエフェクターとして機能している。⁴² 我々は、TGF- β 2 が RPE-1 細胞において MRTF-A の核内移行を誘導し、この反応が、EMT の抑制と関連して、CCG-1423 によって阻害されることを示した。これらの結果から、RPE 細胞における EMT の制御に関して、MRTF-A が核内受容体と相互に作用している可能性が示唆された。

生体内での線維性変化に関連して、緑内障濾過手術の家兎モデルにおいて、MRTF-A 阻害剤の局所投

与がマイトマイシン C と同等の抗線維化作用を示したとの報告がある。²⁴ 我々の研究では、マウスモデルにおいても、MRTF-A 阻害剤 CCG-1423 の硝子体腔内投与が、網膜下線維症の形成を抑制することが示された。これらの結果は、MRTF-A のシグナル伝達阻害が、滲出型加齢黄斑変性をはじめとした増殖性網膜疾患における線維性変化の治療標的となる可能性を示唆している。

結語

RPE 細胞の EMT 及び *in vivo* における網膜下線維症の形成に MRTF-A が関与することを示した。滲出型加齢黄斑変性をはじめとした網膜下線維症を有する疾患において、MRTF-A が潜在的な治療標的になり得ることが示された。

謝辞

本研究にあたって、指導教官としてご指導を頂いた山口大学大学院医学系研究科眼科学講座教授 木村和博先生、同講座助教 徳田和央先生、実験にご協力頂いた同講座技術補佐員 水野由香里氏、片岡彩加氏に対して、ここに深謝の意を表する。

関連論文との関係性

本研究は、著者執筆の関連論文 (Kobayashi M, Tokuda K, Kobayashi Y, et al. Suppression of Epithelial-Mesenchymal Transition in Retinal Pigment Epithelial Cells by an MRTF-A Inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. TBD.) に基づいて、RPE 細胞における MRTF-A の役割、及び *in vivo* での網膜下線維症に対する MRTF-A 阻害剤の抑制効果について検討したものである。

参考文献

1. 中江 公裕, 増田 寛次郎, 石橋 達朗. 眼科学 日本人の視覚障害の原因 15年前との比較. 医学のあゆみ.2008, 225 巻, 8 号, 691-693.
2. Ishikawa K, Kannan R, Hinton RD. Molecular mechanisms of subretinal fibrosis in age-related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 2016;142:19–25.
3. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, et al. Age-related macular degeneration. *Lancet.* 2012;379:1728–1738.
4. Hwang JC, Del Priore LV, Freund KB, et al. Development of subretinal fibrosis after anti-VEGF treatment in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging.* 2011;42:6–11.
5. Kimura K, Orita T, Liu Y, et al. Attenuation of EMT in RPE cells and subretinal fibrosis by an RAR-gamma agonist. *J Mol Med.* 2015;93:749–758.
6. Moustakas A, Heldin P. TGF β and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840:2621–2634.
7. Mamuya FA, Duncan MK. α V integrins and TGF- β -induced EMT: a circle of regulation. *J Cell Mol Med.* 2012;16:445–455.
8. Nakamura K, Yano H, Uchida H, et al. Tyrosine phosphorylation of paxillin alpha is involved in temporospatial regulation of paxillin-containing focal adhesion formation and F-actin organization in motile cells. *J Biol Chem.* 2000;275:27155–27164.
9. Scanlon CS, Van Tubergen EA, Inglehart RC, et al. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *J Dent Res.* 2013;92:114–121.
10. Xi Y, Tan K, Brumwell AN, et al. Inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis by methacycline. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;50:51–60.
11. Carew RM, Wang B, Kantharidis P. The role of EMT in renal fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2012;347:103–116.
12. Tan TK, Zheng G, Hsu TT, et al. Macrophage matrix metalloproteinase-9 mediates epithelial-mesenchymal transition *in vitro* in murine renal tubular cells. *Am J Pathol.* 2010;176:1256–1270.
13. Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, et al. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell.* 2001;12:27–36.
14. Cho HJ, Yoo J. Rho activation is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in lens epithelial cells. *Cell Biol Int.* 2007;31:1225–1230.
15. Tamiya S, Kaplan HJ. Role of epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy. *Exp Eye Res.* 2016;142:26–31.
16. Fong DS, Aiello LP, Ferris FL, Klein R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2004;27:2540–2553.
17. Friedlander M. Fibrosis and diseases of the eye. *J Clin Invest.* 2007;117:576–586.
18. Yu-Wai-Man C, Treisman R, Bailly M, et al. The role of the MRTF-A/SRF pathway in ocular fibrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55:4560–4567.
19. Morita T, Mayanagi T, Sobue K. Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal

- transition via slug induction and actin remodeling. *J Cell Biol.* 2007;179:1027–1042.
20. Hayashi K, Watanabe B, Nakagawa Y, et al. RPEL proteins are the molecular targets for CCG-1423, an inhibitor of Rho signaling. *PLoS One.* 2014;9:e89016.
 21. Evelyn CR, Wade SM, Wang Q, et al. CCG-1423: a small-molecule inhibitor of RhoA transcriptional signaling. *Mol Cancer Ther.* 2007;6:2249–2260.
 22. Watanabe B, Minami S, Ishida H, et al. Stereospecific inhibitory effects of CCG-1423 on the cellular events mediated by myocardin-related transcription factor A. *PLoS One.* 2015;10:e0136242.
 23. Johnson LA, Rodansky ES, Haak AJ, et al. Novel Rho/MRTF/SRF inhibitors block matrix-stiffness and TGF- β -induced fibrogenesis in human colonic myofibroblasts. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20:154–165.
 24. Yu-Wai-Man C, Spencer-Dene B, Lee RMH, et al. Local delivery of novel MRTF/SRF inhibitors prevents scar tissue formation in a preclinical model of fibrosis. *Sci Rep.* 2017;7:518.
 25. Zhang H, Liu ZL. Transforming growth factor- β neutralizing antibodies inhibit subretinal fibrosis in a mouse model. *Int J Ophthalmol.* 2012;5:307–311.
 26. Seifert A, G Posern. Tightly controlled MRTF-A activity regulates epithelial differentiation during formation of mammary acini. *Breast Cancer Res.* 2017;19:68.
 27. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119:1420–1428.
 28. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139:871–890.
 29. Nakamura M, Tokura Y. Epithelial-mesenchymal transition in the skin. *J Dermatol Sci.* 2011;61:7–13.
 30. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003;112:1776–1784.
 31. Okada H, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol.* 1997;273:F563–F574.
 32. Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, et al. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int.* 2002;61:1714–1728.
 33. Fan J-M, Ng Y-Y, Hill PA, et al. Transforming growth factor- β regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int.* 1999;56:1455–1467.
 34. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology.* 2007;39:305–318.
 35. Guidry C, Medeiros NE, Curcio CA. Phenotypic variation of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:267–273.
 36. Walsh JE, Young MR. TGF-beta regulation of focal adhesion proteins and motility of premalignant oral lesions via protein phosphatase 1. *Anticancer Res.* 2011;31:3159–3164.
 37. Zhang JJ, Sun Y, Hussain AA, et al. Laser-mediated activation of human retinal pigment epithelial cells and concomitant release of matrix metalloproteinases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:2928–2937.
 38. Kishi T, Mayanagi T, Iwabuchi S, et al. Myocardin-related transcription factor A (MRTF-A) activity-dependent cell adhesion is correlated to focal adhesion kinase (FAK) activity. *Oncotarget.* 2016;7:72113–72130.
 39. Suzuki R, Miyazaki Y, Takagi K, et al. Matrix metalloproteinases in the pathogenesis of asthma and COPD:

implications for therapy. *Treat Respir Med.* 2004;3:17–27.

40. Kimura K, Orita T, Fujitsu Y, et al. Inhibition by female sex hormones of collagen gel contraction mediated by retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55:2621–2630.
41. Zhang C, Luo X, Liu L, et al. Myocardin-related transcription factor A is up-regulated by 17 β -estradiol and promotes migration of MCF-7 breast cancer cells via transactivation of MYL9 and CYR61. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2013;45:921–927.
42. Wang N, Xu Y, Qin T, et al. Myocardin-related transcription factor-A is a key regulator in retinoic acid-induced neural-like differentiation of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Gene.* 2013;523:178–186.