

学位論文（博士）

Inhibition of epithelial-mesenchymal transition
in retinal pigment epithelial cells

by a retinoic acid receptor- α agonist

(レチノイン酸受容体- α アゴニストによる

網膜色素上皮細胞における

上皮間葉系移行の阻害作用についての研究)

氏名 小林 由佳

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 眼科学講座

令和3年5月

目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 目的	4
4. 方法	5
1) 方法	5
2) 解析	8
5. 結果	8
6. 考察	14
7. 結語	16
8. 謝辞	16
9. 参考文献	17

1. 要旨

加齢黄斑変性などの網膜疾患では、線維性増殖組織の形成が視機能低下に関与する。線維性組織の形成には、網膜色素上皮(RPE)細胞における上皮間葉系移行(EMT)が関与している。今回我々は、マウス primary RPE 細胞における EMT や、マウスモデルでの網膜下線維組織形成に対するレチノイン酸受容体(RAR)- α アゴニストの作用を検討した。マウス primary RPE 細胞をI型コラーゲンゲル内で培養し、transforming growth factor- β 2(TGF- β 2)と RAR- α アゴニストである Am580 を添加したところ、Am580 は TGF- β 2 によるコラーゲンゲル収縮を抑制した。また、Am580 は TGF- β 2 により誘導された EMT 関連マーカーである α -smooth muscle actin(α -SMA)、フィブロネクチン、およびI型コラーゲンの発現を抑制した。さらに、Am580 は TGF- β 2 により誘導された細胞外マトリックス(ECM)の分解や構成に関与する pro-matrix metalloproteinase 2(pro-MMP2)と Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1(TIMP-1)や、炎症性サイトカインである Interleukin-6(IL-6)の産生、接着斑構成タンパク質であるパキシリンの発現、および SMAD2 のリン酸化を抑制した。免疫蛍光染色では Am580 は TGF- β 2 により誘導される myocardin-related transcription factor-A(MRTF-A)の細胞質から核内への移行を抑制した。網膜下線維化モデルのマウスでは網膜下線維組織形成を抑制した。以上の結果から、RAR- α アゴニストは RPE 細胞の EMT を抑制し、線維性増殖組織を伴う網膜疾患における増殖組織の形成、収縮を抑制する可能性が示唆された。

2. 研究の背景

加齢黄斑変性症(AMD)は成人の中途失明の主要な原因疾患である。滲出型 AMD では黄斑部に脈絡膜新生血管を生じ、黄斑浮腫や漿液性網膜剥離、網膜下出血などによる視力低下を来す^{1,2}。AMD の治療として血管内皮細胞増殖因子(VEGF)阻害薬の硝子体注射が行われており、視力の維持や改善などの治療効果をもたらしている³。しかしながら、抗 VEGF 阻害薬治療中に網膜下線維症や黄斑部萎縮が起こり⁴、網膜構造が破綻することで視力低下を来すことがある⁵。この過程には、IL-6、単球走化性因子(MCP-1)、IL-8 などの様々なサイトカインや、TGF- β や血小板由来成長因子(PDGF)などの成長因子が関与している⁶。

線維化は、線維芽細胞、筋線維芽細胞、炎症性細胞などによる ECM 成分の過剰沈着によって引き起こされる^{7,8}。このうち、筋線維芽細胞は線維化の発生と進行に重要な役割を果たしている⁹。筋線維芽細胞の発生には、上皮細胞がその細胞極性を失い間質系の形質を獲得する上皮間葉系移行(EMT)が関与しており、EMT を起こした細胞は α -SMA、フィブロネクチン、vimentin などの筋線維芽細胞マーカーを発現する¹⁰。また、筋線維芽細胞は EMT と関連して MMPs や TIMPs を産生することで ECM のリモデリングを起こす¹¹。網膜下線維組織における ECM の主要構成成分は I 型、IV型コラーゲンとフィブロネクチンであり、III 型、V 型、VI型コラーゲンも少量含まれている¹²。その他に、筋線維芽細胞は focal adhesion kinase (FAK)やパキシリン、talin などの接着斑関連タンパクの発現や活性化を介してマトリックスの収縮に関与する^{13,14}。TGF- β は mitogen-activated protein kinases (MAPKs)や、SMAD, phosphoinositide 3-kinase(PI3K), Akt, myocardin-related transcription factor (MRTF)などの様々な下流シグナル伝達因子を活性化することにより、EMT を誘導する¹⁵⁻¹⁷。RPE 細胞の EMT は、滲出型 AMD、増殖性硝子体網膜症、増殖糖尿病網膜症などの網膜硝子体疾患において線維性増殖組織の形成に関与し¹⁸、滲出型 AMD 患者の脈絡膜新生血管に伴う線維膜の病理学的解析では、 α -SMA を発現する RPE 細胞の存在が明らかになっている¹⁹。また以前我々は、RPE 細胞において MRTF-A の活性化は TGF- β による EMT を誘導し、MRTF-A 転写因子阻害剤はマウスモデルで網膜下線維組織形成を抑制することを報告した²⁰。

レチノイン酸(RA)はビタミン A の代謝産物であり、抗酸化作用、細胞分化・アポトーシスの調節因子、線維化抑制因子などの様々な生物学的活性が報告されている²¹⁻²³。核内受容体である RAR には、RAR- α 、RAR- β 、RAR- γ のサブタイプが存在する²⁴。RA は TGF- β シグナル伝達経路を抑制するという報告があり^{25,26}、以前我々は、テノン囊線維芽細胞において全トランスレチノイン酸(ATRA)が、RPE 細胞において RAR- γ アゴニストが TGF- β -SMAD シグナル経路を抑制することを報告した^{27,28}。このことから ATRA や RAR- γ アゴニストは抗線維化作用を有することが示唆されたが、RAR- α や RAR- β の線維化への影響については明らかになっていない。

3. 目的

本研究では、RAR- α アゴニストである Am580 の RPE 細胞における EMT への影響を、細胞によるマトリックス収縮と線維化の *in vitro* モデルであるコラーゲンゲル収縮アッセイを用いて検討した。また、網膜線維化モデルマウスを用いて、RAR- α アゴニストの網膜下線維組織形成に対する作用を *in vivo* で検討した。

4. 方法

1) 方法

試料

ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)高グルコース(D6429)および最小必要培地(MEM), ウシ胎児血清(FBS), DMEM- nutrient mixture F-12(DMEM/F-12), トリプシン-EDTA(エチレンジアミン四酢酸)は Invitrogen-Gibco (Rockville, MD, USA)のものを使用した。細胞培養ディッシュ(直径 60mm または 100mm), 24 ウェル培養プレートは Coating(Corning, NY, USA)のものを使用した。プロテアーゼ阻害剤カクテル, 抗 α -SMA マウスモノクローナル抗体, 抗 β -チューブリンマウスモノクローナル抗体は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)のものを使用した。セルマトリックス Type I -A, 5 倍濃縮(5×)DMEM, 再構成用緩衝液は新田ゼラチン(Osaka, Japan)のものを使用した。ウシ血清アルブミン(BSA) はナカライテスク(Kyoto, Japan)のものを使用した。抗 TIMP-1 ヤギポリクローナル抗体, 組み換えヒト TGF- β 2, マウス IL-6 に対する ELISA キットは R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)のものを使用した。RAR- α アゴニスト Am580 は ENZO Life Sciences Institute (Farmingdale, NY, USA)のものを使用した。抗パキシリンマウスモノクローナル抗体は BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)のものを使用した。抗 I 型コラーゲンウサギポリクローナル抗体は Rockland Immunochemicals (Limerick, PA, USA)のものを使用した。抗 SMAD2 ウサギモノクローナル抗体, 抗グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)ウサギモノクローナル抗体, 抗リン酸化-SMAD2 ウサギポリクローナル抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)のものを使用した。抗 MKL-1/MRTF-A ウサギポリクローナル抗体は Abcam(Cambridge, UK)のものを, Alexa Fluor 488 標識二次抗体は Invitrogen(Waltham, MA, USA)のものを使用した。ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識二次抗体, ECL ウェスタンブロットティング検出試薬は GE Healthcare(Little Chalfont, UK)のものを使用した。RNeasy Mini Kit は Qiagen (Venlo, the Netherlands)のものを, ReverTra Ace qPCR RT Master Mix は東洋紡(Osaka, Japan)のものを, SYBR Green 試薬は Life Technologies(Carlsbad, CA, USA)のものを, DAPI(4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩) Fluoromount-G は SouthernBiotech(Birmingham, AL, USA)のものを使用した。塩酸ケタミンは第一三共プロファーマ(Tokyo, Japan), キシラジンは Bayer(Leverkusen, Germany)のものを使用した。

マウス RPE 細胞の採取と培養

6 週齢, 雌の C57BL/6J マウス(日本 SLC, 静岡県)から RPE 細胞を既報²⁹をもとに採取した。RPE 細胞は 1%MEM, 20%FBS を添加した DMEM(D6429)を含む培養ディッシュに播種し, 37°C の 5%CO₂ インキュベーターで培養した。

コラーゲンゲル収縮アッセイ

コラーゲンゲルは, 既報^{30,31}を参考に作成した。24 ウェル培養プレートに 1%BSA(1 ml/well) を添加し 37°C で 1 時間コーティングした。マウス RPE 細胞をトリプシン-EDTA を用いて回収し, 無血清 DMEM/F-12 で 2 回洗浄した後, 無血清 DMEM/F-12 で再懸濁した。氷上で, セルマトリックス Type I -A (3 mg/ml), 5×DMEM, 再構成用緩衝液, および RPE 細胞懸濁液(無血清 DMEM/F-12 中に 4.4×10^6 cells/ml)を 7:2:1:1 の比率で混和し, 最終的なセルマトリ

ックス Type I -A の濃度が 1.9 mg/ml, 最終的な細胞数が 1.1×10^6 cells/ml となるよう調整した。BSA でコーティングした 24 ウェル培養プレートに混和液(0.5ml/well)を入れ, コラーゲンを形成するために, 37°C の 5%CO₂ インキュベーターで 1 時間培養した。マイクロスパチュラを用いてコラーゲンをウェルの側面から剥し, 各ゲルの上に TGF- β 2 1ng/ml および Am580 10 μ M の存在下または非存在下で無血清 DMEM/F-12(0.5ml)を添加した。24 時間後と 48 時間後に, 定規を用いてゲルの直径を測定した。

ウェスタンブロッティング

RPE 細胞を 24 ウェル培養プレートのコラーゲンゲル内で 48 時間培養した後, 氷上で 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM NaF, 1% Nonidet P-40, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム, 0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS), 1mM Na₃VO₄, および 1% プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む溶液に溶解した。細胞溶解液をホモジナイズし, 12000rpm, 4 °C で 10 分間遠心分離し, 上清を回収した。その後, 細胞溶解液を 10%または 15%ゲルでの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画し, 分離したタンパク質をニトロセルロース膜に転写した。メンブレンを, 5%スキムミルクを添加した 0.1% Tween-20 を含むトリス緩衝生理食塩水(TBS-T)中で室温にて 1 時間ブロッキングし, 各種一次抗体を加え 4°C で一晩振盪した。メンブレンを TBS-T で洗浄後, 室温で各種二次抗体を加え 1 時間振盪し, enhanced chemiluminescence (ECL)試薬を用いて免疫複合体を検出した。免疫反応により発現したバンドは NIH ImageJ ソフトウェア(バージョン 1.46r; National Institutes of Health, アメリカ, メリーランド州ベセスダ)を用いて解析した。³²

定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)

24 ウェル培養プレートで培養したマウス RPE 細胞から, RNeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出し, ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて逆転写した。生成した cDNA を, SYBR Green 試薬および StepOnePlus Real-Time PCR システム (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた qPCR 分析により増幅した。qPCR のフォワードプライマーおよびリバースプライマーはそれぞれ, α -SMA(*ACTA2*, NM_007392.3)は 5'-AACCCCTTCAGCGTTCAGCCT-3' および 5'-TCCTCTTCACACATAGCTGGAGCA-3', フィブロネクチン(*Fnl1*, NM_010233.2)は 5'-GTTCGGGAAGAGGTTGTGAC-3'および 5'-CCAATGGCGTAATGGGAAAC-3', I 型コラーゲン(*Colla1*, NM_007742.4)は 5'-CTAGACATGTTTCAGCTTTGTGGA-3'および 5'-GCTGACTTCAGGGATGTCTTC-3", GAPDH(*Gafdh*, NM_008084.3)は 5'-GGCATTGTGGAAGGGCTCAT-3'および 5'-ATCACGCCACAGCTTCCAG-3'を用いた。 α -SMA, フィブロネクチン, I型コラーゲンの mRNA 量は, 対応する GAPDH の mRNA 量で正規化した。²⁰

ゼラチンザイモグラフィ

ゼラチンザイモグラフィの方法は, 既報³²を参照した。24 ウェル培養プレートで培養した RPE 細胞を含むコラーゲンゲルの培養上清 8 μ l を, 非還元 SDS サンプルバッファー(125mM Tris-HCl [pH 6.8], 20%グリセロール, 2%SDS, 0.002%プロモフェノールブルー)4 μ l と混和し, 得られた混合液のうち 5 μ l を, 0.1%ゼラチンを含む 10%ゲルで, 4°C の暗所で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動をした。ゲルを 2.5% Triton X-100 に入れ室温で 1 時間洗浄した後,

50mM Tris-HCl(pH7.5), 5mM CaCl₂, 1% Triton X-100 を含む反応混合液中で 37°C, 18 時間浸透した。最後にクマシーブリリアントブルー(CBB)で染色した後, 50%メタノール, 10%酢酸で脱色しバンドを検出した。

IL-6 の測定

IL-6 の測定方法は, 既報³³を参照した。24 ウェル培養プレートで培養したコラーゲンの培養上清を 120×g で 5 分間遠心分離し, 得られた上清を-80°Cで凍結保存し, ELISA キットを用いて IL-6 を測定した。

RPE 細胞における MRTF-A の免疫蛍光染色

24 ウェル培養プレートに 12mm カバーガラスを 1 枚/well 入れ, RPE 細胞を 1×10⁵cells/well 播種した。24 時間培養した後, 無血清 DMEM/F-12 に培地交換し, さらに 24 時間培養した。Am580(10μM)の存在下または非存在下で 12 時間インキュベートした後, TGF-β2 10ng/ml および Am580 10μM の存在下または非存在下でさらに 24 時間培養した²⁰。4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で細胞を 4°C で 15 分間固定した後, 0.1%オクチルフェノールエトキシレートで室温にて 5 分間置き, PBS で 2 回洗浄してから 1%BSA を含む PBS で 4°C にて一晩ブロッキングした。抗 MKL-1/MRTF-A 抗体(1%BSA を含む PBS で 1:250 に希釈)を添加し 4°C にて一晩反応させた後, 細胞を PBS で洗浄し, Alexa Fluor 488 標識二次抗体(1%BSA を含む PBS で 1:200 希釈)で室温にて 1 時間反応させた。DAPI Fluoromount-G で封入し, BZ-X710 蛍光顕微鏡(Keyence, Osaka, Japan)で撮影した。MRTF-A の蛍光輝度は NIH ImageJ ソフトウェアを用いて測定した。

マウス網膜下線維化モデル

網膜下線維化のマウスモデルを, 既報^{20,34}を参考に作製した。8 週齢, 雌の C57BL/6J マウス(日本 SLC, 静岡県)に, ケタミン(90mg/kg)とキシラジン(10mg/kg)を腹腔内注射し麻酔をかけた後に, レーザー光凝固(波長: 532 nm, 照射時間: 0.1 秒, スポットサイズ: 75 μm, パワー: 200 mW)を施行し, Am580(50μM)を含む PBS(1μl)を光凝固直後と光凝固 3 日後に硝子体注射した。光凝固 3 週間後に, マウスを頸椎脱臼により安楽死させ, 眼球を摘出した。眼球は 4%パラホルムアルデヒドを含む PBS で氷上にて 2 時間固定した。脈絡膜フラットマウントを作成し, PBS で洗浄後に, 100%メタノールに 4°C で 20 分間反応させた。5%スキムミルクを含む PBS で 4°C にて一晩ブロッキングした後, 抗 I 型コラーゲン抗体(PBS で 1:100 希釈)にて 4°C で一晩反応させた。その後, Alexa Fluor 488 標識二次抗体(1%BSA を含む PBS で 1:1000 希釈)にて室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄し, 50%グリセロールを含む PBS で脈絡膜フラットマウントを封入し, BZ-X710 蛍光顕微鏡で撮影した。網膜下線維の面積は NIH ImageJ ソフトウェアを用いて測定した。

研究の承認

本研究における動物実験は山口大学大学院医学系研究科の動物倫理委員会の承認を得た。また, すべての動物実験は山口大学医学部動物実験指針を順守して施行した。

2) 解析

定量データは平均値±標準偏差として示し、Dunnett の多重比較検定または Mann-Whitney 検定で分析した。0.05 未満の *P* 値を統計的に有意とした。

5. 結果

RPE 細胞コラーゲンゲル収縮に対する RAR- α agonist の効果

コラーゲンゲル収縮アッセイは、細胞によるマトリックス収縮と線維化の *in vitro* モデルである³⁵。本研究では、まず AMD に伴う線維化組織形成の *in vitro* モデルとして、マウス RPE 細胞コラーゲンゲル収縮に対する RAR- α アゴニスト Am580 の効果を検討した。TGF- β 2(1 ng/ml)の存在下あるいは非存在下で、Am580(1 μ M, 10 μ M, 30 μ M)を添加し、RPE 細胞コラーゲンゲルを 48 時間培養した。TGF- β 2 は RPE 細胞コラーゲンゲルの収縮を誘導し、これは Am580 により濃度依存的かつ時間依存的に阻害された(図 1)。Am580 は 1 μ M 以上の濃度で TGF β 2 誘導性のゲル収縮に対する有意な阻害効果を認め、刺激後 24 時間から有意な阻害効果を認めた。Am580 単独では RPE 細胞コラーゲンゲルの収縮には影響を与えなかった。

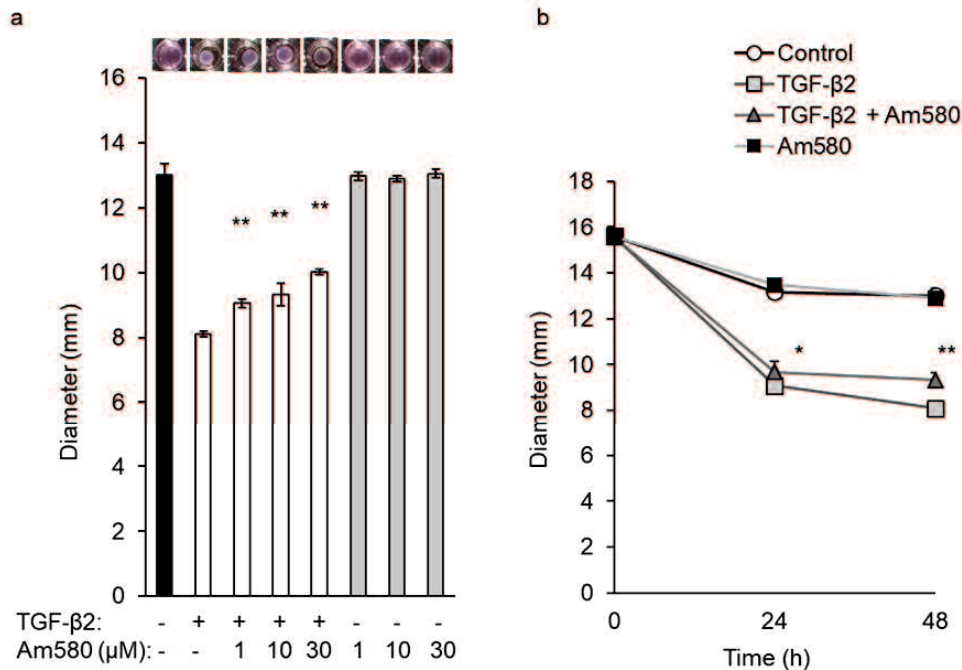


図 1. TGF- β 2 による RPE 細胞コラーゲンゲル収縮に対する RAR- α アゴニストの阻害作用。(a) TGF- β 2 (1 ng/ml) および Am580 (1 μ M, 10 μ M, 30 μ M) の存在下または非存在下で、RPE 細胞をコラーゲンゲル内で 48 時間培養し、各コラーゲンゲルの直径を測定した。(b) TGF- β 2 (1 ng/ml) または Am580 (10 μ M) の存在下または非存在下における各コラーゲンゲルの直径を 24 時間、48 時間で計測した。平均値±標準偏差(N=4)。**P* < 0.05, ***P* < 0.01: TGF- β 2 単独で培養したコラーゲンゲルと比較(Dunnett の検定)。

RPE 細胞における EMT 関連マーカー発現に対する Am580 の効果

網膜下線維組織形成過程には、RPE 細胞の EMT が関与している¹⁸。そこで、コラーゲンゲル内で培養した RPE 細胞における EMT 関連マーカーである α -SMA の発現と、それに対する RAR- α アゴニストの効果を検討した。ウエスタンブロッティングの結果、TGF- β 2 により

増加した α -SMA の発現は Am580(10 μ M)により有意に抑制された(図 2a, b)。ECM のリモデリングは線維化形成に関与しており，網膜下線維症における ECM の主要な構成成分には I 型コラーゲンやフィブロネクチンがある³⁶。そこで次に，RPE 細胞における EMT 関連マーカーである α -SMA と，網膜下線維症における ECM の構成成分であるフィブロネクチン，I 型コラーゲンの遺伝子発現を RT-qPCR で測定した。RPE 細胞を無血清 DMEM/F-12 で 24 時間培養した後，Am580(10 μ M)の存在下または非存在下で 6 時間培養し，TGF- β 2(1 ng/ml)を追加または追加せずにさらに 48 時間培養した。RT-qPCR では，TGF- β 2 により RPE 細胞の α -SMA，フィブロネクチン，I 型コラーゲンの mRNA 量は増加し，Am580 はこれを有意に抑制した(図 2c)。

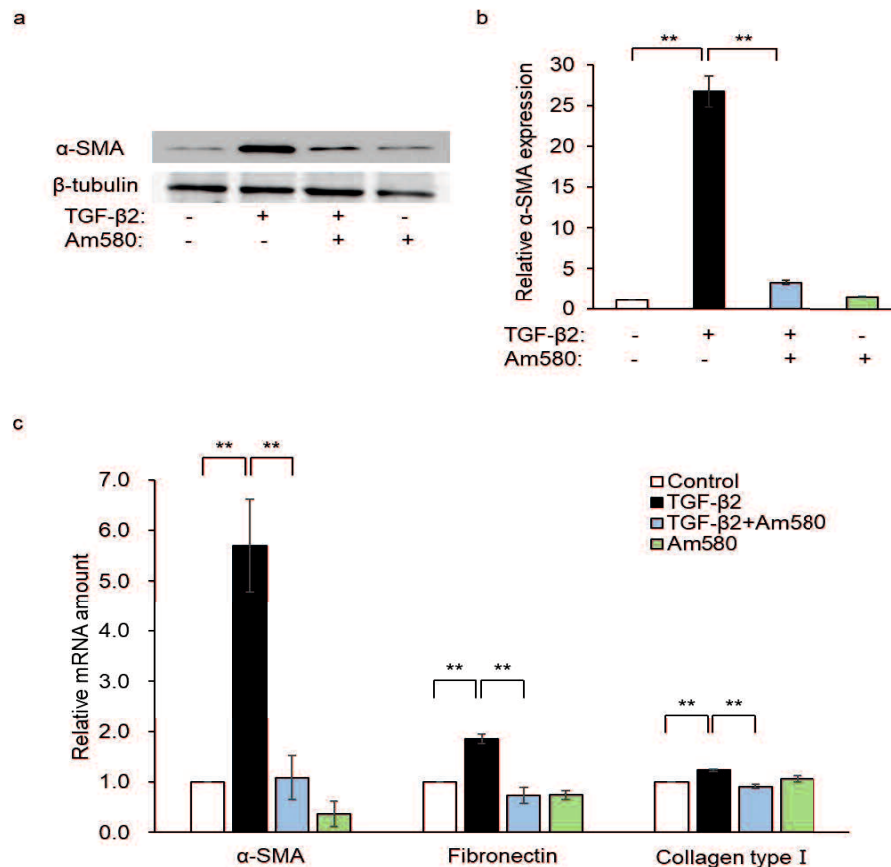


図 2. RPE 細胞における TGF- β 2 による EMT 関連マーカー発現に対する RAR- α アゴニストの抑制効果。(a)TGF- β 2(1 ng/ml)および Am580(10 μ M)の存在下または非存在下で，RPE 細胞をコラーゲングル内で 48 時間培養した後，細胞溶解液を回収し，抗 α -SMA 抗体および抗 β -チューブリン抗体(ローディング・コントロール)を用いてウェスタンブロッティングで解析した。(b) β -チューブリン に対する α -SMA の信号強度の相対比を示した。(c)無血清 DMEM/F-12 で 24 時間培養した RPE 細胞を Am580(10 μ M)の存在下または非存在下で 6 時間培養した後，TGF- β 2(1 ng/ml)を追加または追加せずにさらに 48 時間培養し， α -SMA，フィブロネクチン，I 型コラーゲンの mRNA 量を RT-qPCR で解析し，GAPDH に対する各 mRNA 量の相対比を示した。平均値 \pm 標準偏差(N=3)。** $P < 0.01$: TGF- β 2 単独で培養した RPE 細胞との比較(Dunnett の検定)。

RPE 細胞における pro-MMP2 および TIMP-1 の発現に対する Am580 の効果

MMPs と TIMPs は、発現の変化により ECM のリモデリングを起こし、線維化組織の形成に関与する¹¹。そこで、RPE 細胞コラーゲンゲルの培養上清中の pro-MMP2 と、コラーゲンゲル内で培養下 RPE 細胞中の TIMP-1 の発現に対する、RAR- α アゴニストの効果を検討した。ゼラチンザイモグラフィの結果、pro-MMP2 の発現は TGF- β 2 により増加し、これは Am580 により阻害された(図 3a, b)。ウエスタンブロッティングの結果、TIMP-1 の発現は TGF- β 2 により増加し、これは Am580 によって抑制された(図 3c, d)。

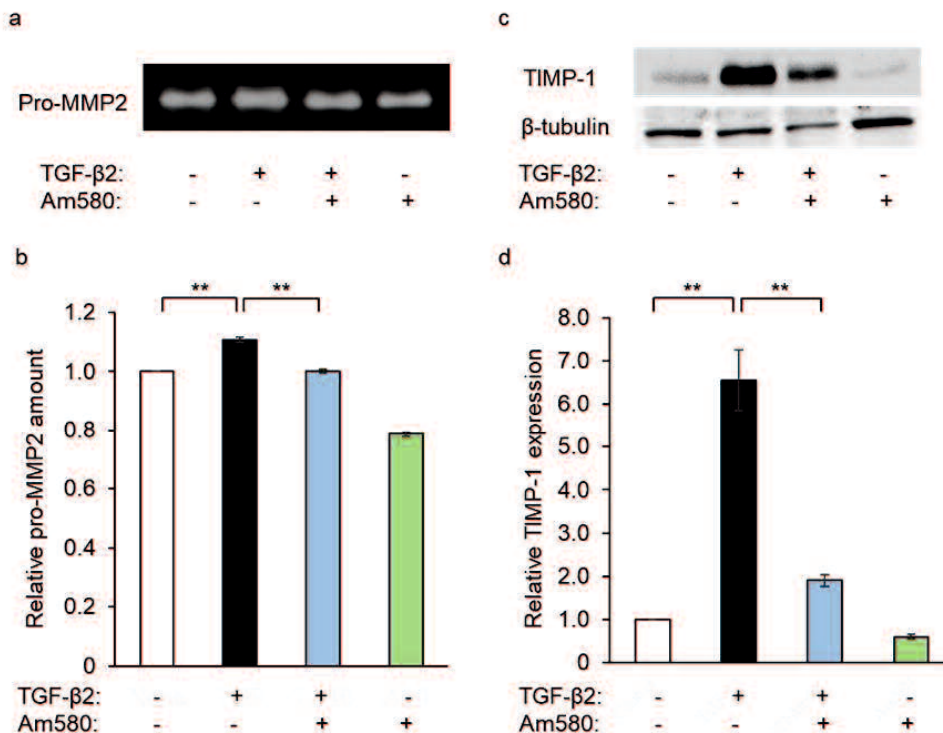


図 3. RPE 細胞における TGF- β 2 による pro-MMP2 および TIMP-1 発現に対する RAR- α アゴニストの阻害効果。TGF- β 2(1 ng/ml)および Am580(10 μ M)の存在下または非存在下で、RPE 細胞を 48 時間培養した。(a)培養上清中の pro-MMP2 の発現をゼラチンザイモグラフィで解析し、(b) pro-MMP2 の発現を定量化し相対比を示した。(c)RPE 細胞の細胞溶解液を回収し、抗 TIMP-1 抗体および抗 β -チューブリン抗体(ローディング・コントロール)を用いてウエスタンブロッティングで解析した。(d) β -チューブリンに対する TIMP-1 の信号強度の相対比を示した。平均値 \pm 標準偏差(N=4)。** $P < 0.01$: TGF- β 2 単独で培養した RPE 細胞との比較(Dunnnett の検定)。

RPE 細胞におけるパキシリンの発現に対する Am580 の効果

接着斑関連タンパクの発現や活性化は、EMT や細胞移動において関与する¹⁴。コラーゲンゲル内で培養した RPE 細胞における、接着斑関連タンパク質であるパキシリンの発現に対する RAR- α アゴニストの効果を検討した。ウエスタンブロッティングの結果、パキシリンの発現は TGF- β 2 により増加し、これは Am580 により有意に抑制された(図 4)。

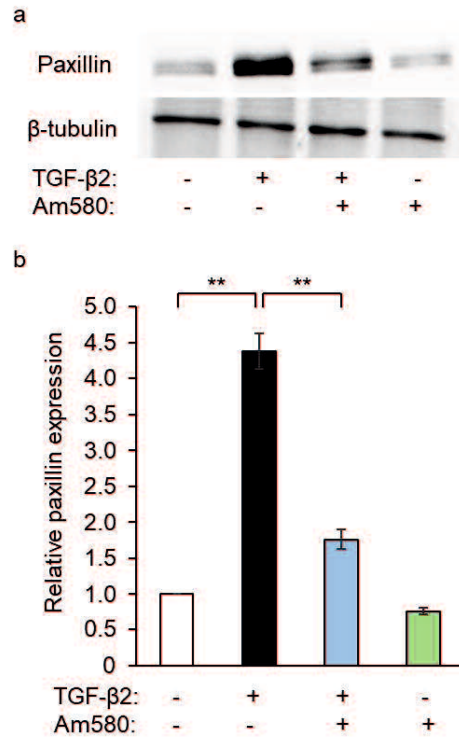


図 4. RPE 細胞における TGF-β2 によるパキシリン発現に対する RAR-α アゴニストの阻害効果。(a) TGF-β2(1 ng/ml)および Am580(10μM)の存在下または非存在下で、RPE 細胞をコラーゲンゲル内で 48 時間培養した後、細胞溶解液を回収し、抗パキシリン抗体および抗 β-チューブリン抗体(ローディング・コントロール)を用いてウエスタンブロッティングで解析した。(b) β-チューブリン に対するパキシリンの信号強度の相対比を示した。平均値±標準偏差(N=4)。** $P < 0.01$: TGF-β2 単独で培養した RPE 細胞との比較(Dunnett の検定)。

RPE 細胞における IL-6 産生に対する Am580 の効果

IL-6 などの炎症性サイトカインは、網膜下線維症の発症に関与している³⁷。コラーゲンゲル内で培養した RPE 細胞における、炎症性サイトカインである IL-6 の産生に対する RAR-α アゴニストの効果を検討した。ELISA 法の結果、IL-6 の産生は TGF-β2 により増加し、これは Am580 により有意に抑制された(図 5)。

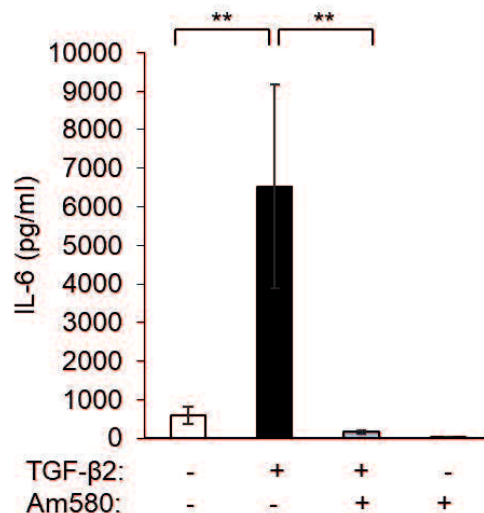


図 5. RPE 細胞における TGF- β 2 による IL-6 産生に対する RAR- α アゴニストの阻害効果。TGF- β 2(1 ng/ml)および Am580(10 μ M)の存在下または非存在下で, RPE 細胞をコラーゲンゲル内で 48 時間培養した後, 培養上清中の IL-6 を ELISA 法で測定した。平均値 \pm 標準偏差 (N=4)。** $P < 0.01$: TGF- β 2 単独で培養した RPE 細胞との比較(Dunnett の検定)。

RPE 細胞におけるリン酸化 SMAD2 の発現に対する Am580 の効果

TGF- β のシグナル伝達経路には SMAD を介する経路と SMAD を介さない経路があり, TGF- β はこれらの下流シグナル伝達経路を活性化することで EMT を誘導する¹⁵⁻¹⁷。RPE 細胞における TGF- β 2-SMAD シグナル伝達経路に対する RAR- α アゴニストの効果を検討するために, リン酸化 SMAD2 の発現に対する RAR- α アゴニストの効果をウエスタンブロッティングで解析した。その結果, TGF- β 2 による刺激開始から 1 時間から 6 時間後に TGF- β 2 は SMAD2 のリン酸化を誘導し, これは Am580 により有意に抑制された(図 6)。

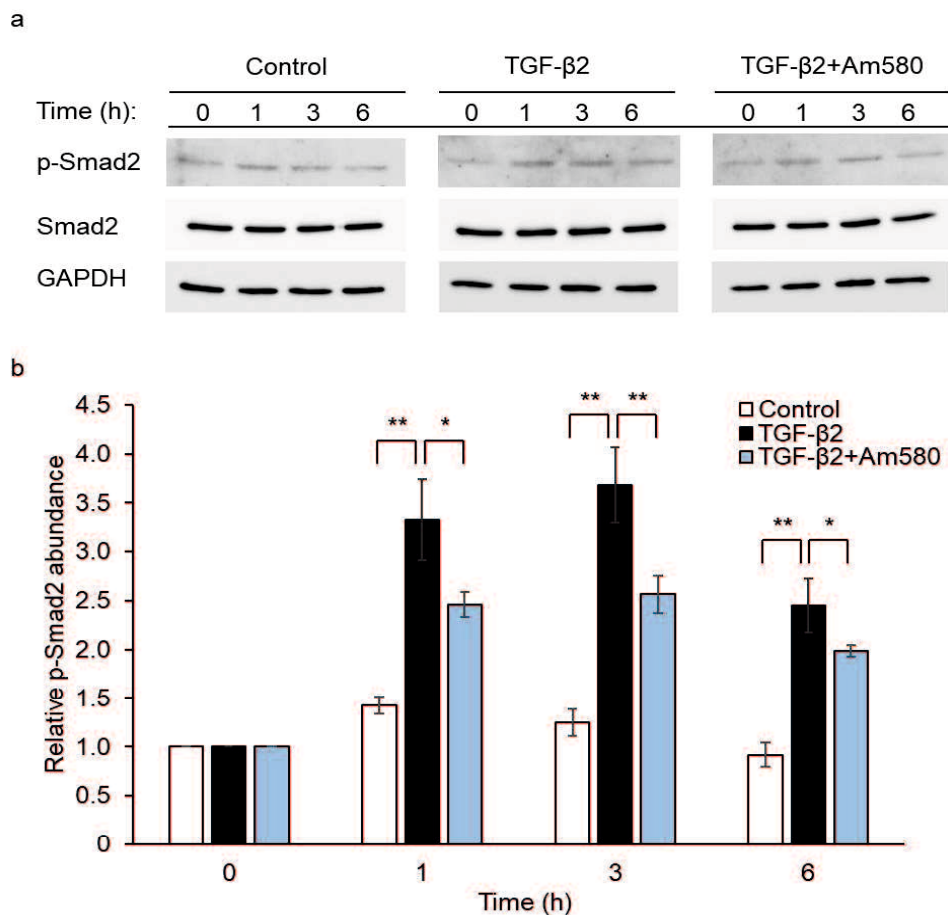


図 6. RPE 細胞における TGF- β 2 によるリン酸化 SMAD2 発現に対する RAR- α アゴニストの抑制効果。(a) RPE 細胞を Am580(10 μ M)の存在下または非存在下で 6 時間培養した後, TGF- β 2(1 ng/ml)を追加または追加せずに 0-6 時間培養した。細胞溶解液を回収し, 抗リン酸化-SMAD2 抗体および抗 GAPDH 抗体(ローディング・コントロール)を用いてウエスタンブロッティングで解析した。(b) β -チューブリン に対するリン酸化 SMAD2 の信号強度の相対比を示した。平均値 \pm 標準偏差(N=4)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: TGF- β 2 単独で培養した RPE 細胞との比較(Dunnett の検定)。

RPE 細胞における MRTF-A の細胞内分布に対する Am580 の効果

MRTFs の活性化は TGF- β シグナル伝達経路を介して EMT に関与している^{20,28}。RPE 細胞における, TGF- β による MRTF-A 細胞内分布の変化に対する RAR- α アゴニストの効果を免疫蛍光染色で検討した。TGF- β は MRTF-A の細胞質から核内への移行を誘導し, これは Am580 によって有意に抑制された(図 7a, b)。

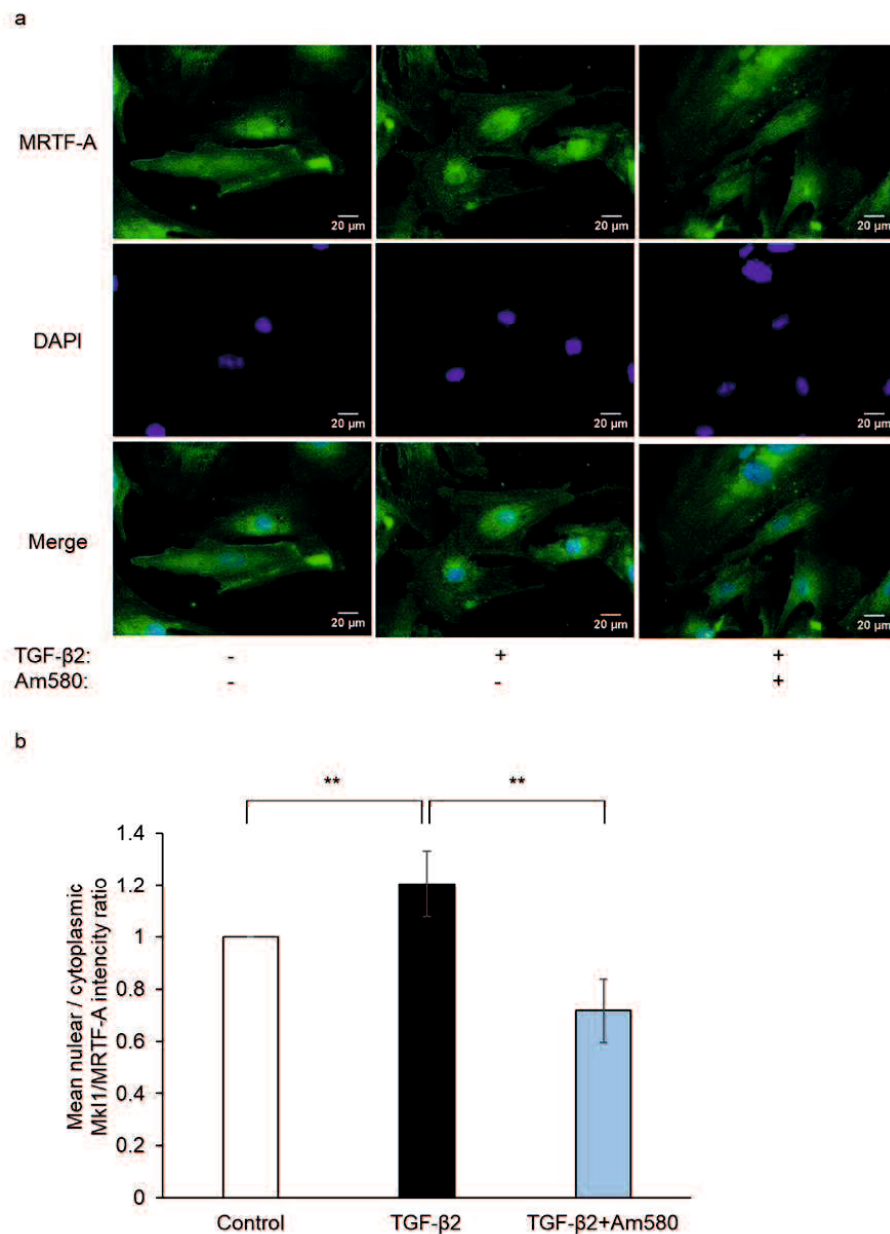


図 7. RPE 細胞における TGF- β 2 による MRTF-A の核内移行に対する RAR- α アゴニストの抑制効果。(a)24 ウェル培養プレートに入れたカバーガラス上で, 無血清 DMEM/F-12 で 24 時間培養した RPE 細胞を, Am580(10 μ M)の存在下または非存在下で 12 時間培養した。TGF- β 2(10 ng/ml)を追加または追加せずにさらに 24 時間培養した後, RPE 細胞を固定し, 抗 MRTF-A 抗体で免疫蛍光染色した(緑)。核は DAPI(青)で染色した。スケールバー: 20 μ m。(b)MRTF-A の核内平均輝度/細胞質平均輝度の相対比を示した。平均値 \pm 標準偏差(4 視野, N=20)。** $P < 0.01$: TGF- β 2 単独で培養した RPE 細胞との比較(Dunnett の検定)。

網膜下線維症モデルマウスにおける Am580 の効果

最後に、網膜下線維症モデルマウスを用いて、網膜下線維症の発生に対する RAR- α アゴニストの効果を実験で評価した。Am580 の硝子体注射により、網膜下線維組織の形成が抑制された(図 8)。

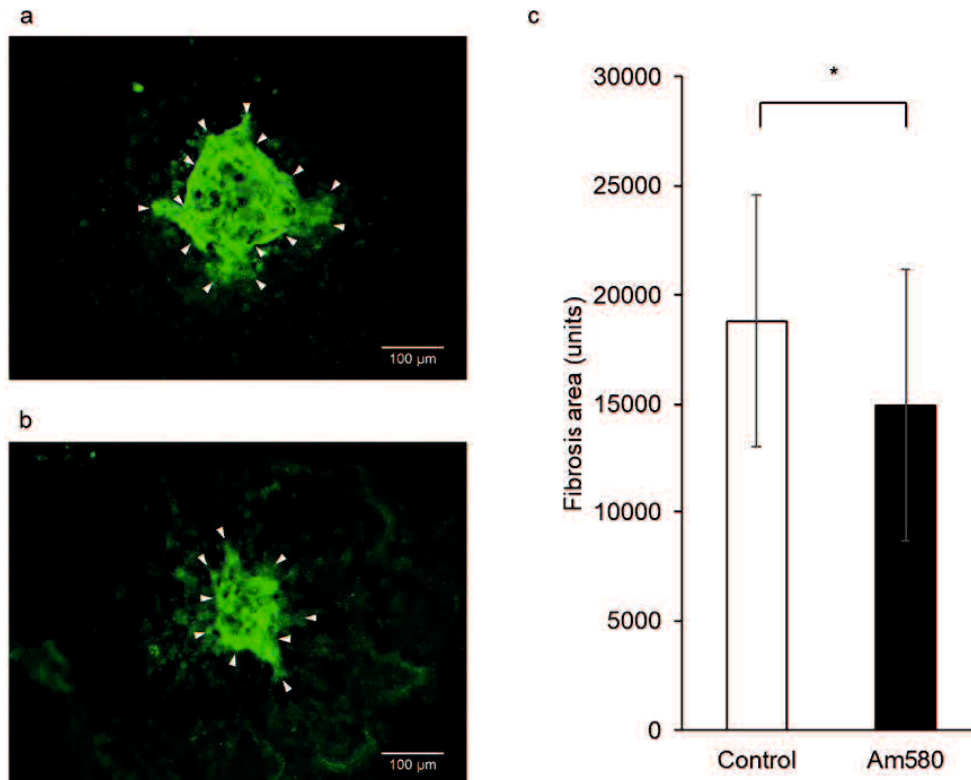


図 8. 網膜下線維症モデルマウスにおける RAR- α アゴニストの抑制効果。(a) レーザー光凝固直後と光凝固 3 日後に Am580(50 μ M)または PBS を硝子体注射(1 μ l)し、光凝固 3 週間後にマウスの眼球から脈絡膜フラットマウントを作成し、抗 I 型コラーゲン抗体で免疫蛍光染色した。(b) I 型コラーゲンで示された網膜下線維組織の面積を測定した。矢印：網膜下線維組織。スケールバー：100 μ m。平均値 \pm 標準偏差(N=40 レーザースポット/群)。* $P < 0.05$ (Mann-Whitney の検定)。

6. 考察

本研究では、線維性増殖組織形成に対する RAR- α アゴニスト Am580 の効果を *in vitro* および *in vivo* で検討した。Am580 は、TGF- β 2 によるマウス RPE 細胞のコラーゲンゲル収縮を時間依存的および濃度依存的に抑制した。また、Am580 はマウス RPE 細胞において、TGF- β 2 により上昇した、EMT 関連マーカーである α -SMA、フィブロネクチン、I 型コラーゲンの発現、および ECM のリモデリングに関与する pro-MMP2 と TIMP-1 の産生を阻害した。さらに、Am580 は TGF- β により誘導された、接着斑構成タンパク質であるパキシリンの発現、炎症性サイトカインである IL-6 の産生、TGF- β シグナル伝達経路に関与するリン酸化 SMAD2 の発現、および TGF- β シグナル伝達経路を介して EMT に関与する MRTF-A の細胞質から核内への移行を阻害した。最後に、Am580 は網膜下線維化モデルマウスにおいて網膜下線維組織の形成を抑制した。以上の結果から、Am580 は *in vitro* で RPE 細胞において TGF- β 2 により誘導される変化を抑制し、*in vivo* で網膜下線維化組織の形成を抑制することが明

らかになり、RAR- α アゴニストが AMD などの線維性増殖組織を形成する網膜疾患に対する治療薬として有用である可能性が示唆された。

筋線維芽細胞は、滲出型 AMD における線維化の発生および進行に関与しており³⁸、その発生には EMT が関与している⁹。ビタミン A 代謝物は、発達や、細胞増殖・分化、視機能など様々な生物学的プロセスを制御しており^{39,40}、ビタミン A 代謝物の一つである ATRA は RAR- α 、RAR- β 、RAR- γ を活性化することで様々な細胞で EMT の抑制効果を示す^{15,26,27}。RAR には RAR- α 、RAR- β 、RAR- γ の 3 つのサブタイプがあり、ECM 成分の過剰沈着や線維化形成に関与している⁴¹。以前我々は、テノン囊線維芽細胞のコラーゲンゲルにおいて TGF- β 1 でゲル収縮を誘導し、RAR- α アゴニスト Am580、RAR- β アゴニスト BmS453、RAR- γ アゴニスト R667 をそれぞれ同濃度で添加すると、コラーゲンゲル収縮が Am580 では 36%、BmS453 では 12%、R667 では 73%抑制されることを報告した²⁷。また、RAR- γ アゴニスト R667 はマウス RPE 細胞における EMT と網膜下線維組織形成を抑制し、この RPE 細胞の EMT の過程では RAR の発現は影響を受けなかった²⁸。本研究では、RAR- α アゴニスト Am580 が RPE 細胞のコラーゲンゲル収縮や、マウスの網膜下線維組織形成を抑制することを示した。以上より、RAR- α シグナルと RAR- γ シグナルが相互に作用することで、RPE 細胞の EMT や網膜下線維化を抑制されている可能性が示唆された。

TGF- β は、SMAD、MAPK、Akt などの下流シグナル因子を介して様々なシグナル伝達経路を活性化し、EMT や ECM リモデリング、細胞遊走などの様々な細胞プロセスを制御しており、滲出型 AMD や増殖性硝子体網膜症などの網膜疾患では網膜下線維組織の形成に関与している¹⁵。ATRA は TGF シグナル伝達経路を阻害することで抗線維化作用を示し^{42,43}、TGF- β とレチノイドシグナルは複雑に関連している⁴⁴。本研究では、RAR- α アゴニスト Am580 が TGF- β 2 による SMAD2 のリン酸化を有意に抑制した。我々は以前、RAR- γ アゴニスト R667 が TGF- β 2 の下流シグナル因子である SMAD と Akt を抑制することで、RPE 細胞の EMT を抑制することを報告しており²⁸、本研究と比較すると、リン酸化 SMAD2 の発現抑制レベルが異なっていた。このことから、SMAD 経路以外の TGF- β シグナル伝達経路が、RPE 細胞の EMT や網膜下線維組織形成に関与している可能性が示唆され、TGF- β シグナル伝達経路に対する RAR- α アゴニストの作用について、さらなる検討が必要である。

MRTF-A は、転写調節因子であるミオカルディンファミリーの 1 つであり、G-アクチンと複合体を形成し、静止細胞では細胞質に局在している。MRTF-A は活性化すると核内へ移行し、EMT や細胞増殖に関連する様々な遺伝子の発現を増加する^{20,45}。また、MRTF-A は、ATRA による骨髄由来間葉系幹細胞の神経分化に関与している⁴⁶。以前我々は、MRTF-A シグナル伝達阻害剤である CCG-1423 が RPE 細胞の TGF- β による EMT を抑制し²⁰、RAR- γ アゴニストが RPE 細胞の EMT と網膜下線維組織形成を抑制することを報告した²⁸。本研究では、RPE 細胞において RAR- α アゴニスト Am580 は、TGF- β 2 により誘導された、 α -SMA、フィブロネクチン、I 型コラーゲンの発現、および SMAD2 のリン酸化、MRTF-A の核内移行を抑制した。さらに、RAR- α アゴニスト Am580 はマウスの網膜下線維組織形成を抑制した。以上の結果から、RAR- α シグナルは、RPE 細胞の TGF- β 2 誘導性の EMT や、網膜下線維組織形成において重要な抑制作用を有する可能性が示唆された。

RPE 細胞は眼炎症時にサイトカインを産生する³⁷。RA は、IL-6 や腫瘍壊死因子 α (TNF- α) などの炎症性サイトカインの産生を阻害することで抗炎症効果を示す⁴⁷。滲出型 AMD にお

ける網膜下線維組織形成にも、炎症性サイトカインの産生が関連している⁴⁸。本研究では、RPE細胞においてRAR- α アゴニスト Am580がTGF- β 2によるIL-6の産生を抑制し、これにより炎症の増悪や網膜下線維組織形成を抑制する可能性が示唆された。

EMTには、細胞骨格の変化および細胞-ECM間、細胞間の相互作用が関連している^{49,50}。EMTを起こした細胞では、フィブロネクチンやI型コラーゲンを含む様々なECMタンパク質の発現が上昇し、ECMタンパク質を分解するMMPを発現することで遊走能や浸潤能を獲得する⁵¹。網膜下線維症におけるECMの主な構成成分は、I型とIV型コラーゲン、フィブロネクチンであり、III型、V型、VI型コラーゲンは少量である。特に、I型コラーゲンはECMのリモデリングで合成され、網膜下線維組織を維持する役割を果たしている¹²。pro-MMP2は活性化されてMMP2となり、ゼラチン、コラーゲン、フィブロネクチンを分解することでECMのリモデリングに関与している⁵²。TIMPはMMPの内因性阻害因子であり、いくつかの膜型MMPを除いて、pro-MMP2などの多くのMMPを阻害することでMMPの発現を調節し⁵³、ECMの分解を阻害してECMの沈着を増加させる。また、TIMP-1はMMP経路を介さずにEMTを誘導し、これにはFAK、PI3K、Akt、MAPKなどのシグナル伝達分子が関与している¹⁷。肝線維症ではMMP-2とTIMP-1が活性化される⁵⁴。以前の我々の報告では、RPE細胞ではTGF- β によるEMTにおいてMMP-2、3、8が活性化され、これはRAR- γ アゴニストR667によって阻害された²⁸。本研究では、RPE細胞においてTGF- β 2によりpro-MMP2とTIMP-1の発現が上昇し、これはAm580によって抑制された。以上より、MMPとTIMPの相対的なバランスがECMの分解と再構成を制御しており、ECMや組織の線維化ではこの平衡が崩れ、異常なECMが蓄積される可能性が示唆され、これに対しRAR- α アゴニストは抑制的に作用する可能性が示唆された。

接着斑は、細胞-ECM間および細胞間の相互作用において重要な役割を果たしており、パキシリンは細胞の移動およびアクチン細胞骨格のリモデリングを調節する主要な接着斑関連タンパク質である^{55,56}。以前我々は、RPE細胞におけるリン酸化パキシリンと総パキシリンの比率がTGF- β 2によって増加し、これはRAR- γ アゴニストR667によって阻害されることを報告した²⁸。本研究では、RAR- α アゴニストAm580がRPE細胞において、TGF- β 2によるフィブロネクチン、I型コラーゲン、pro-MMP2、TIMP-1、パキシリンの発現を抑制した。以上より、RAR- α アゴニストは細胞-ECM間シグナルを調節し、RPE細胞におけるEMTを部分的に抑制する可能性が示唆された。

7. 結語

本研究では、RPE細胞においてRAR- α アゴニストAm580は、TGF- β 2による細胞の収縮や、EMT、ECMのリモデリング、炎症性サイトカインの産生に対して抑制的に作用し、さらに、*in vivo*で網膜下線維組織形成を抑制することを示した。今後さらなる検討が必要ではあるが、RAR- α アゴニストはAMDなどの網膜疾患において、線維性増殖組織の形成に対する治療薬となる可能性が示唆された。

8. 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、山口県立大学看護栄養学部栄養学科教授 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。

9. 参考文献

- 1 Lim, L. S., Mitchell, P., Seddon, J. M., Holz, F. G. & Wong, T. Y. Age-related macular degeneration. *Lancet* **379**, 1728-1738, doi:10.1016/S0140-6736(12)60282-7 (2012).
- 2 林田 真由香, 三木 明子, 中井 駿一朗, 松宮 亘, 今井 尚徳, 楠原 仙太郎, 中村 誠. 治療維持期の視力不良な滲出型加齢黄斑変性患者の固視. *日眼会誌* **124**, 465-471 (2020).
- 3 小椋 祐一郎, 高橋 寛二, 飯田 知弘 ;日本網膜硝子体学会硝子体注射ガイドライン作成委員会. 黄斑疾患に対する硝子体内注射ガイドライン. *日眼会誌* **120**, 87-90 (2016).
- 4 Sadda, S. R., Guymer, R., Mones, J. M., Tufail, A. & Jaffe, G. J. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Use and Atrophy in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Systematic Literature Review and Expert Opinion. *Ophthalmology*, doi:10.1016/j.ophtha.2019.11.010 (2019).
- 5 Cheung, C. M. G. *et al.* The Evolution of Fibrosis and Atrophy and Their Relationship with Visual Outcomes in Asian Persons with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol Retina* **3**, 1045-1055, doi:10.1016/j.oret.2019.06.002 (2019).
- 6 Saika, S. *et al.* SMAD3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury. *Am J Pathol* **164**, 651-663, doi:10.1016/S0002-9440(10)63153-7 (2004).
- 7 Wynn, T. A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* **117**, 524-529, doi:10.1172/JCI31487 (2007).
- 8 Greaves, N. S., Ashcroft, K. J., Baguneid, M. & Bayat, A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J Dermatol Sci* **72**, 206-217, doi:10.1016/j.jdermsci.2013.07.008 (2013).
- 9 Wang, X. *et al.* Induction of Fibroblast Senescence During Mouse Corneal Wound Healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **60**, 3669-3679, doi:10.1167/iovs.19-26983 (2019).
- 10 Kalluri, R. & Neilson, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* **112**, 1776-1784, doi:10.1172/jci200320530 (2003).
- 11 Lee, H., O'Meara, S. J., O'Brien, C. & Kane, R. The role of gremlin, a BMP antagonist, and epithelial-to-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 4291-4299, doi:10.1167/iovs.07-0086 (2007).
- 12 Ishikawa, K., Kannan, R. & Hinton, D. R. Molecular mechanisms of subretinal fibrosis in age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* **142**, 19-25, doi:10.1016/j.exer.2015.03.009 (2016).
- 13 Kattan, W. M. *et al.* Myofibroblast-Mediated Contraction. *J Coll Physicians Surg Pak* **27**, 38-43, doi:2519 (2017).
- 14 Nakamura, K. *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* **275**, 27155-27164, doi:10.1074/jbc.M000679200 (2000).
- 15 Akhurst, R. J. & Hata, A. Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 790-811, doi:10.1038/nrd3810 (2012).
 - 16 Taiyab, A., Holms, J. & West-Mays, J. A. beta-Catenin/SMAD3 Interaction Regulates Transforming Growth Factor-beta-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in the Lens. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20092078 (2019).
 - 17 Zou, Y. *et al.* Upregulation of gelatinases and epithelial-mesenchymal transition in small airway remodeling associated with chronic exposure to wood smoke. *PLoS One* **9**, e96708, doi:10.1371/journal.pone.0096708 (2014).
 - 18 Feng, H. *et al.* Autophagy resists EMT process to maintain retinal pigment epithelium homeostasis. *Int J Biol Sci* **15**, 507-521, doi:10.7150/ijbs.30575 (2019).
 - 19 Hirasawa, M. *et al.* Transcriptional factors associated with epithelial-mesenchymal transition in choroidal neovascularization. *Mol Vis* **17**, 1222-1230 (2011).
 - 20 Kobayashi, M. *et al.* Suppression of Epithelial-Mesenchymal Transition in Retinal Pigment Epithelial Cells by an MRTF-A Inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **60**, 528-537, doi:10.1167/iovs.18-25678 (2019).
 - 21 De Rosa, S. *et al.* Reactive oxygen species and antioxidants in the pathophysiology of cardiovascular disease: does the actual knowledge justify a clinical approach? *Curr Vasc Pharmacol* **8**, 259-275, doi:10.2174/157016110790887009 (2010).
 - 22 Lee, H. P. *et al.* All-trans retinoic acid as a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* **9**, 1615-1621, doi:10.1586/ern.09.86 (2009).
 - 23 Soderpalm, A. K., Fox, D. A., Karlsson, J. O. & van Veen, T. Retinoic acid produces rod photoreceptor selective apoptosis in developing mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 937-947 (2000).
 - 24 Conde, I., Paniagua, R., Fraile, B., Ruiz, A. & Arenas, M. I. Expression of vitamin D3 receptor and retinoid receptors in human breast cancer: identification of potential heterodimeric receptors. *Int J Oncol* **25**, 1183-1191 (2004).
 - 25 Lee, S. H. *et al.* The Effects of Retinoic Acid and MAPK Inhibitors on Phosphorylation of SMAD2/3 Induced by Transforming Growth Factor β 1. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* **82**, 42-52, doi:10.4046/trd.2017.0111 (2019).
 - 26 Pendaries, V., Verrecchia, F., Michel, S. & Mauviel, A. Retinoic acid receptors interfere with the TGF-beta/SMAD signaling pathway in a ligand-specific manner. *Oncogene* **22**, 8212-8220, doi:10.1038/sj.onc.1206913 (2003).
 - 27 Liu, Y. *et al.* Inhibition by all-trans-retinoic acid of transforming growth factor-beta-induced collagen gel contraction mediated by human tenon fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**, 4199-4205, doi:10.1167/iovs.13-13572 (2014).
 - 28 Kimura, K. *et al.* Attenuation of EMT in RPE cells and subretinal fibrosis by an RAR-gamma agonist. *J Mol Med (Berl)* **93**, 749-758, doi:10.1007/s00109-015-1289-8 (2015).

- 29 Jo, Y. J. *et al.* Establishment of a new animal model of focal subretinal fibrosis that resembles disciform lesion in advanced age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 6089-6095, doi:10.1167/iovs.10-5189 (2011).
- 30 Zhou, H., Kimura, K., Orita, T., Nishida, T. & Sonoda, K. H. Inhibition by medroxyprogesterone acetate of interleukin-1beta-induced collagen degradation by corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 4213-4219, doi:10.1167/iovs.11-8822 (2012).
- 31 Liu, Y. *et al.* Induction by latanoprost of collagen gel contraction mediated by human tenon fibroblasts: role of intracellular signaling molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 1429-1436, doi:10.1167/iovs.07-0451 (2008).
- 32 Kimura, K. *et al.* Inhibition by female sex hormones of collagen gel contraction mediated by retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**, 2621-2630, doi:10.1167/iovs.13-13501 (2014).
- 33 Nomi, N., Kimura, K. & Nishida, T. Release of interleukins 6 and 8 induced by zymosan and mediated by MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways in human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 2955-2959, doi:10.1167/iovs.09-4823 (2010).
- 34 Zhang, H. *et al.* A Novel Platelet-Activating Factor Receptor Antagonist Inhibits Choroidal Neovascularization and Subretinal Fibrosis. *PLoS One* **8**, e68173, doi:10.1371/journal.pone.0068173 (2013).
- 35 Ngo, P., Ramalingam, P., Phillips, J. A. & Furuta, G. T. Collagen gel contraction assay. *Methods Mol Biol* **341**, 103-109, doi:10.1385/1-59745-113-4:103 (2006).
- 36 Das, A., Puklin, J. E., Frank, R. N. & Zhang, N. L. Ultrastructural immunocytochemistry of subretinal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **99**, 1368-1376, doi:10.1016/s0161-6420(92)31792-0 (1992).
- 37 Benson, M. T., Shepherd, L., Rees, R. C. & Rennie, I. G. Production of interleukin-6 by human retinal pigment epithelium in vitro and its regulation by other cytokines. *Curr Eye Res* **11 Suppl**, 173-179, doi:10.3109/02713689208999529 (1992).
- 38 Little, K., Ma, J. H., Yang, N., Chen, M. & Xu, H. Myofibroblasts in macular fibrosis secondary to neovascular age-related macular degeneration - the potential sources and molecular cues for their recruitment and activation. *EBioMedicine* **38**, 283-291, doi:10.1016/j.ebiom.2018.11.029 (2018).
- 39 Mora, J. R., Iwata, M. & von Andrian, U. H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol* **8**, 685-698, doi:10.1038/nri2378 (2008).
- 40 Sahu, B. & Maeda, A. Retinol Dehydrogenases Regulate Vitamin A Metabolism for Visual Function. *Nutrients* **8**, doi:10.3390/nu8110746 (2016).
- 41 Long, Y. B., Qin, Y. H., Zhou, T. B. & Lei, F. Y. Association of retinoic acid receptors with extracellular matrix accumulation in rats with renal interstitial fibrosis disease. *Int J Mol Sci* **13**, 14073-14085, doi:10.3390/ijms131114073 (2012).
- 42 Sierra-Mondragon, E. *et al.* All-Trans Retinoic Acid Attenuates Fibrotic Processes by

- Downregulating TGF- β 1/SMAD3 in Early Diabetic Nephropathy. *Biomolecules* **9**, doi:10.3390/biom9100525 (2019).
- 43 Xu, Y. *et al.* All-Trans Retinoic Acid Attenuates Hypoxia-Induced Injury in NRK52E Cells via Inhibiting NF- κ B/VEGF and TGF- β 2/VEGF Pathway. *Cell Physiol Biochem* **38**, 229-236, doi:10.1159/000438624 (2016).
- 44 Xu, Q. & Kopp, J. B. Retinoid and TGF- β families: crosstalk in development, neoplasia, immunity, and tissue repair. *Semin Nephrol* **32**, 287-294, doi:10.1016/j.semnephrol.2012.04.008 (2012).
- 45 Yu-Wai-Man, C., Treisman, R., Bailly, M. & Khaw, P. T. The role of the MRTF-A/SRF pathway in ocular fibrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**, 4560-4567, doi:10.1167/iovs.14-14692 (2014).
- 46 Wang, N. *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* **523**, 178-186, doi:10.1016/j.gene.2013.03.043 (2013).
- 47 Wojtal, K. A. *et al.* The effects of vitamin A on cells of innate immunity in vitro. *Toxicol In Vitro* **27**, 1525-1532, doi:10.1016/j.tiv.2013.03.013 (2013).
- 48 Kent, D. & Sheridan, C. Choroidal neovascularization: a wound healing perspective. *Mol Vis* **9**, 747-755 (2003).
- 49 Radisky, D. C. Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* **118**, 4325-4326, doi:10.1242/jcs.02552 (2005).
- 50 Zhang, Y. *et al.* Protective Effects of Fucoidan on Epithelial-Mesenchymal Transition of Retinal Pigment Epithelial Cells and Progression of Proliferative Vitreoretinopathy. *Cell Physiol Biochem* **46**, 1704-1715, doi:10.1159/000489246 (2018).
- 51 Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 178-196, doi:10.1038/nrm3758 (2014).
- 52 Heo, J. H. *et al.* Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**, 624-633, doi:10.1097/00004647-199906000-00005 (1999).
- 53 Arpino, V., Brock, M. & Gill, S. E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol* **44-46**, 247-254, doi:10.1016/j.matbio.2015.03.005 (2015).
- 54 Deng, Z. *et al.* Gexia-Zhuyu Decoction Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Mice Partly via Liver Angiogenesis Mediated by Myeloid Cells. *Med Sci Monit* **25**, 2835-2844, doi:10.12659/msm.913481 (2019).
- 55 Shi, S. *et al.* EMT Transcription Factors Are Involved in the Altered Cell Adhesion under Simulated Microgravity Effect or Overloading by Regulation of E-cadherin. *Int J Mol Sci* **21**, doi:10.3390/ijms21041349 (2020).
- 56 Tumbarello, D. A. Regulation of paxillin family members during epithelial-mesenchymal transformation: a putative role for paxillin *Journal of Cell Science* **118**, 4849-4863, doi:10.1242/jcs.02615 (2005).