

論文内容の要旨

Myocardin-related transcription factor A (MRTF-A) regulates TGF- β 2-induced type I collagen production in human lens epithelial cells.

(Myocardin 関連転写因子 A (MRTF-A) は、ヒト水晶体上皮細胞において TGF- β 2 の誘導により I 型コラーゲン産生を調節する)

(奥野孟, 黒坂大次郎, 今泉利康, 坂本うみ, 酒井大典, 三部篤)

(Journal of Iwate Medical Association 70 巻 4 号 平成 30 年 10 月掲載)

I. 研究目的

水晶体上皮細胞は、白内障手術後に前嚢下白内障および後嚢胞白濁をもたらす筋線維芽細胞様細胞に分化転換される。これに伴い、分化転換した水晶体上皮細胞は、筋線維芽細胞のバイオマーカーである α -平滑筋アクチン (α -SMA) を発現するだけでなく、I 型コラーゲンからなる細胞外マトリックスも産生する。この現象は上皮間葉移行 (EMT) として知られている。これらの細胞外マトリックスの沈着は、視覚機能の低下、ならびに前嚢の開口部の収縮などに伴う術後合併症に直接つながる。したがって EMT を予防し、これらの細胞外マトリックスの沈着を減少させることが重要である。

形質転換増殖因子- β (TGF- β) は、水晶体上皮細胞、網膜色素上皮細胞、乳房上皮細胞、および腎尿細管上皮細胞における EMT の誘導における重要な因子である。TGF- β はこれらの細胞において α -SMA 発現およびコラーゲン産生を促進する。最近、乳房上皮細胞および腎尿細管上皮における EMT にミオカルジン関連転写因子 A (MRTF-A) が重要な役割を果たすことが報告されている。MRTF-A は、細胞質に隔離された転写補助活性化因子である。TGF- β 刺激後、MRTF-A は核内に移行し、 α -SMA を含む遺伝子発現を促進するために血清応答因子 (SRF) と相互作用する。

本研究は、MRTF-A の効果を明らかにするために、ヒト水晶体上皮細胞において MRTF-A に対する低分子干渉 RNA (siRNA) でトランスフェクションし検討した。さらに α -SMA および I 型コラーゲンの発現に対する MRTF-A 阻害剤である CCG203971 の効果も検討した。

II. 研究対象ならび方法

1. (1) 抗 METFA 抗体, (2) 抗 GAPDH 抗体 (Chemicon International, Temecula, CA, USA) を用いて RT-PCR を行い, ゲル調製および電気泳動条件の試料調製を行った。イムノブロットにおけるバンド強度は, Image J 1.38 を用いて半定量化した。
2. 免疫染色は HLE-B3 を 0.1%FBS 含有させた DMEM 中で培養 (Life Technologies, Inc.) した。次に, 細胞を TGF- β 12.5ng/ml (Sigma, St. Louis, MO) で 24 時間処理した。
3. ヒト水晶体上皮細胞 (HLE-B3) を MRTFA に標的となる siRNA (siMRTF) と対照となる siRNA (siLuc) を使用し, トランスフェクトした。細胞からの全 RNA は定量的リアルタイム PCR (RT-PCR) を行った。

4. HLE-B3 を 0.1%FBS 含有する DMEM 中で培養した。次に、細胞を 24 時間 12.5ng / ml の TGF- β 2 (Sigma, St. Louis, MO) で処理した。CGG203971 を DMSO に溶解し、3 μ M または 10 μ M になるように DMEM で希釈した。3 μ M または 10 μ M の CGG203971 または 0.1%DMSO を TGF- β 2 処理の 1 時間後の HLE-B3 細胞に処理した。

統計分析はスチューデントの T 検定および一元配置分散分析, Tukey の多重比較を用いて検討を行った。

III. 研究結果

MRTF には MRTF-A および B が存在する。HLE-B3 細胞では MRTF-A の mRNA が発現したが、MRTF-B の mRNA は発現しなかった。

TGF- β 2 が MRTF-A の核移行を促進するかどうかを調べ、MRTF-A は TGF- β 2 のない場合には細胞質に残ったが、TGF- β 2 処理により核に移行した。

HLE-B3 細胞を MRTF-A に対する siRNA でトランスフェクトした場合、MRTF-A の mRNA の発現は対照の siRNA を有する細胞と比較して減少した。TGF- β 2 は MRTF-A の mRNA の発現をわずかに増加させたが、この増加は有意ではなかった。

MRTF-A が HLE-B3 細胞における α -SMA 発現と関連するかどうかを調べるために、対照の siRNA または MRTF-A の siRNA をトランスフェクトした細胞を 12.5ng / ml の TGF- β 2 を含ませた場合と含まない場合で 24 時間培養した。TGF- β 2 は、対照 siRNA をトランスフェクションした HLE-B3 細胞における α -SMA 発現を増加させた。この増加は MRTF-A を siRNA で処理した HLE-B3 細胞において阻害された。

MRTF-A が HLE-B3 細胞において I 型コラーゲン発現と関連しているかどうかを調べるために、対照 siRNA または MRTF-A の siRNA をトランスフェクトした細胞を 12.5ng / ml の TGF- β 2 の存在下または非存在下で 24 時間培養した。TGF- β 2 は対照 siRNA でトランスフェクトされた HLE-B3 細胞における I 型コラーゲン発現を増加させた。MRTF-A の siRNA で処理した HLE-B3 細胞において部分的に阻害された。

MRTF-A 阻害剤である CGG203971 が α -SMA および I 型コラーゲンの発現を減少させるかどうかを決定するために、CGG203971 を添加または無添加に対して 12.5ng / ml の TGF- β 2 で処理した HLE-B3 細胞を培養した。12.5ng / ml の TGF- β 2 は、HLE-B3 細胞における α -SMA および I 型コラーゲン発現を増加させたが、CGG203971 はこれらの増加を用量依存的に阻害した。

IV. 結 語

この研究では、TGF- β 2 は MRTF-A の核移行および HLE-B3 細胞における α -SMA および I 型コラーゲンの mRNA の発現を促進した。MRTF-A のノックダウンは、これらを抑制した。MRTF-A 阻害剤である CGG203971 は、TGF- β 2 によって誘導された HLE-B3 細胞における α -SMA および I 型コラーゲンの mRNA の発現を阻害した。これらの結果は、MRTF-A が HLE-B3 細胞の EMT において重要な役割を果たすことが示唆された。以上より CGG203971 のような阻害剤が TGF- β による水晶体上皮細胞の EMT を阻害する可能性があると考えられる。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 平 英一 (薬理学講座:情報伝達医学分野)
副査 特任教授 前沢 千早 (医歯薬総合研究所, 腫瘍生物学研究部門)
副査 講師 村井 憲一 (眼科学講座)

水晶体上皮細胞は、白内障手術後に前囊下白内障および後囊胞白濁をもたらす筋線維芽細胞様細胞に分化転換される。分化転換した水晶体上皮細胞は、 α 平滑筋アクチン(α -SMA)やI型コラーゲン等の細胞外マトリックスを産生する。この現象は上皮間葉移行(EMT)として知られている。細胞外マトリックスの沈着は、視覚機能の低下や術後合併症を引き起こす。

形質転換増殖因子- β (TGF- β) は、水晶体上皮細胞、網膜色素上皮細胞における EMT の誘導における重要な因子である。ミオカルディン関連転写因子 A (MRTF-A) は、細胞質に隔離された転写補助活性化因子であり、EMT の誘導に重要な働きを示す。TGF- β 刺激後、MRTF-A は核内に移行し、 α -SMA を含む遺伝子発現を促進するために血清応答因子 (SRF) と相互作用する。本研究は水晶体上皮細胞において成長因子 (TGF- β) 刺激が MRTF-A を介して α -SMA 及び I 型コラーゲンの発現に影響を与える影響を検討したものである。ヒト水晶体上皮細胞 HLE-B3 細胞において、TGF- β 2 は MRTF-A を核内移行させ、 α -SMA や I 型コラーゲンの発現を促進させることを明らかにした。これらの知見は、MRTF-A がヒト水晶体上皮細胞における上皮間葉移行 (EMT) に重要な関与を示唆している。さらに MRTF-A 阻害剤である CGG203971 が TGF- β による水晶体上皮細胞の EMT を阻害し、細胞外マトリックスの沈着を減少させる可能性がある事を示した。学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

水晶体上皮細胞の上皮間葉移行 (EMT) と分化誘導因子、MRTF-A 阻害剤である CGG203971 の今後の臨床応用について、また実際の実験の内容について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、作成された学位論文において、剽窃・盗作などの研究不正がないことを確認した。

参考論文

- 1) Effect of green tea polyphenols on glucocorticoid-induced cataract formation in chick embryo (ニワトリ胚におけるグルココルチコイド誘発白内障形成に及ぼす緑茶ポリフェノールの影響) (前田加奈子, 他 8 名と共著)
岩手医学雑誌 69 巻, 4 号 (2017)
- 2) 初心者の白内障手術における粘弾性物質による眼圧および角膜内皮細胞への影響 (坂本うみ, 他 7 名と共著)
岩手医学雑誌 69 巻, 3 号 (2017)