

授与番号	甲第 1779 号
------	-----------

論文内容の要旨

Topical Administration of a ROCK Inhibitor Prevents Anterior Subcapsular Cataract Induced by UV-B Irradiation

(UV-B 誘発前嚢下白内障が ROCK 阻害剤の点眼により予防される)
(今泉利康, 黒坂大次郎, 坂本うみ, 酒井大典, 福田一央, 三部篤)
(Experimental Eye Research 189 号 2019 年 4 月掲載)

I. 研究目的

水晶体上皮細胞 (LEC) は、筋線維芽細胞様細胞に分化転換することができ、前嚢下白内障 (ASC) および白内障手術後の後嚢胞白濁を引き起こす。これらの分化転換 LEC は、筋線維芽細胞のバイオマーカーとしての α 平滑筋アクチン (α -SMA) だけではなく、I 型コラーゲンで構成された細胞外マトリックス (ECM) 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。ECM の沈着は、視覚機能の低下に直接つながる可能性がある。したがって、EMT を防止し、ECM 沈着を抑制することが重要である。トランスフォーミング成長因子- β (TGF- β) は、LEC、網膜色素上皮細胞、乳腺上皮細胞、および腎尿細管上皮における 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 および I 型コラーゲンの発現を促進する。Rho キナーゼ (ROCK) は乳腺上皮細胞および腎尿細管上皮の EMT に重要な役割を果たしていることが報告されている。ROCK 阻害剤である Y-27632 は、In vitro でこれらの細胞における α -SMA およびコラーゲン発現を減少させる。LEC において、Y-27632 は α -SMA 発現を減少させるが、Y-27632 が TGF- β に刺激された LEC における I 型コラーゲン遺伝子発現に影響を与えるかどうかは不明である。したがって、我々は、TGF- β 2 で刺激したヒト LEC における Y-27632 の効果を調べた。さらに、UV-B を照射したマウスを用いて Y-27632 がインビボで ASC 形成に影響を及ぼすかどうかを評価した。

II. 研究対象ならび方法

α -SMA および I 型コラーゲン発現に対する ROCK 阻害剤 Y-27632 の効果を研究するために、TGF- β 2 で刺激したヒト水晶体上皮 B3 (HLE-B3) 細胞を、Y-27632 の有無にかかわらず培養した。その後、 α -SMA および I 型コラーゲンの mRNA の発現を RT-PCR にて定量化した。Y-27632 が ASC 形成に影響を及ぼすかどうかを調べるために、Y-27632 の局所点眼の有無にかかわらず経角膜的にマウス水晶体に対して UV-B を暴露した。UV-B 曝露後に水晶体は単離され白内障の形態が記録された。ASC の発現は水晶体前面における混濁の面積比として定量化された。得られた水晶体を固定後、パラフィン包埋のうえ、免疫組織化学染色にて α -SMA および I 型コラーゲンの組織上における発現を検討した。

III. 研究結果

Y-27632 は In vitro で TGF- β 2 誘導性 EMT および ECM マーカー発現を抑制した。LEC 中の α -SMA および I 型コラーゲンの mRNA 発現に対する ROCK 阻害剤 Y-27632 の効果を決定するために、HLE-B3 細胞を Y-27632 の存在下または非存在下で 12.5ng/ml の TGF- β 2 と共に培養した (3, 10 および 30 μ M)。TGF- β 2 は、HLE-B3 細胞において α -SMA および I 型コラーゲン mRNA 発現を増加させた。Y-27632 は、HLE-B3 細胞における α -SMA および I 型コラーゲン mRNA の TGF- β 2 依存性誘導を用量依存的に抑制した (それぞれ P=0.0134、P=0.0012)。Y-27632 は In vivo での ASC 形成を抑制した。In vivo での ASC 形成に対する Y-27632 の効果を調べるために、マウスの水晶体に対して Y-27632 の点眼の有無にかかわらず UV-B に曝露した。このモデルでは、ASC は UVR-B 照射によって誘導され、白内障形成の程度を定量的に調べることができる。スリットランプでの観察では 1 週間と 2 週間では水晶体の混濁は示されなかったが、照射後 3 週間で水晶体の混濁を観察した。スリットランプ顕微鏡および立体顕微鏡では主に水晶体の前囊下で、混濁が観察された。組織学的には、前囊下領域の LEC が紡錘形断面で平らになり、多層化していた。これらの平坦な LEC が α -SMA および I 型コラーゲンを発現するかどうかを調べるために、免疫組織化学的染色を行った。I 型コラーゲンおよび α -SMA は、平滑化細胞の周囲に存在した。このモデルを用いて、本研究では、Y-27632 の点眼投与が In vivo での ASC 形成に影響を及ぼすかどうかを調べた。最後の UV-B 曝露から 48 時間後、立体顕微鏡で示されるように、対照群の水晶体の混濁面積は、Y-27632 を点眼した群の混濁面積よりも広範囲であった。Y-27632 で処置した水晶体の平均白内障面積比 (5.8 \pm 0.9%) は、対照群の水晶体の平均白内障面積比 (16.0 \pm 2.2%) より有意に小さかった。(P=0.002、スチューデントの t 検定)

IV. 結 語

ROCK 阻害剤 Y-27632 は、HLE-B3 細胞における α -SMA および I 型コラーゲンの TGF- β 2 依存性誘導を抑制した。Y-27632 の点眼投与は、In vivo における UV-B 照射によって誘導される ASC 形成を抑制した。これらの知見は、ROCK の局所的な阻害が ASC の形成を妨げる可能性があることを示唆する。

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 教授 前沢 千早 (腫瘍生物学研究分野)

副査 講師 村井 憲一 (眼科学講座)

水晶体上皮細胞 (LEC) は、筋線維芽細胞様細胞に分化転換することができ、前嚢下白内障 (ASC) および白内障手術後の後嚢胞白濁を引き起こす。これらの分化転換 LEC は、筋線維芽細胞のバイオマーカーとしての α 平滑筋アクチンや I 型コラーゲンで構成された細胞外マトリックス (ECM) を生産することが知られている。LEC 細胞において α -SMA および I 型コラーゲンの発現を促進する TGF- β のシグナリングの下流にある Rho キナーゼ (ROCK) は乳腺上皮細胞および腎尿管上皮の EMT に重要な役割を果たしていることが報告されており、ROCK 阻害剤である Y-27632 は、In vitro でこれらの細胞における α -SMA およびコラーゲン発現を減少させる。今回、LEC 由来 HLE-B3 細胞においても ROCK 阻害剤 Y-27632 が、 α -SMA および I 型コラーゲンの TGF- β 2 依存性誘導を抑制することを明らかとした。さらに、Y-27632 の点眼投与は、In vivo における UV-B 照射によって誘導される ASC 形成を抑制することを見いだした。これらの知見は、ROCK の局所的な阻害が ASC の形成を妨げる可能性があることを示唆するものであり、学位に値する。

試験・試問の結果の要旨

白内障の成因、TGF- β シグナリング、UV-B により誘導された ASC について、Y-27632 の点眼方法別の ASC 形成の違い、ASC に対する免疫組織学的な妥当性、既に販売されている ROCK 阻害剤点眼薬との関連等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、また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した。

参考論文

- 1) Effect of Geranylgeranylacetone on Ultraviolet Radiation Type B-Induced Cataract in Heat-Shock Transcription Factor 1 Heterozygous Mouse.
1 型ヒートショック転写因子ヘテロ型マウスにおける UV-B 誘発白内障へのゲラニルゲラニルアセトンの効果(小笠原聡 橋爪公平,他 6 名と共著)
Current Eye Research 42 巻 5 号 : P732-737
- 2) 極小石灰白内障手術における眼内レンズ電動挿入手技の違いによる切開創への影響(橋浦哲哉 木澤純也,他 5 名と共著)日本白内障学会誌 28 巻 1 号 : P89-92
- 3) 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 木澤純也,他 6 名と共著) 岩手医誌 69 巻 3 号 : P149-154