

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592596

研究課題名(和文) 眼創傷治癒における TGF-β とインテグリンの相互作用の役割解明とその応用

研究課題名(英文) The role of the interaction between integrin and TGF-beta in the eye wound healing

研究代表者

吉田 浩二 (YOSHIDA, Koji)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：60230736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：角膜線維芽細胞(keratocyte)はTGF-β 刺激を受けると、活性化し、筋線維芽細胞様の形態を示すようになった。また、TGF-β 処理によりkeratocyteのインテグリン α11(ITGA11)、α-SMA、fibronectinの発現は亢進した。ITGA11およびcalcium- and integrin-binding protein 1(CIB1)を高発現させた細胞はTGF-β に対する感受性が亢進した。また、緑茶成分epigallocatechin-3-gallate (EGCG)はTGF-β type IIレセプターに結合し、TGF-β の作用を阻害することが判明した。

研究成果の概要(英文)：When corneal fibroblast (keratocyte) was stimulated by TGF-beta, the keratocytes showed myofibroblast-like morphology. In addition, the expression of integrin alpha11 (ITGA11), alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA), fibronectin in keratocytes was increased by TGF-beta treatment. Sensitivity to TGF-beta was up-regulated in the cells constitutively expressing ITGA11 or calcium-and integrin-binding protein 1. It was suggested that ITGA11 and CIB1 could be the target protein of the organ fibrosis treatment. Furthermore, we found that the green tea component epigallocatechin-3-gallate (EGCG) binds to TGF-beta type II receptor and inhibits the action of TGF-beta.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：創傷治癒 インテグリン 線維芽細胞 TGF-

### 1. 研究開始当初の背景

TGF- $\beta$  は創傷治癒・組織線維化の過程において中心的な役割を果たす増殖因子であり、肺線維芽細胞を TGF- $\beta$  で刺激すると種々のインテグリンの発現が亢進することを我々は発見していた。そこで、TGF- $\beta$  とインテグリンの細胞内シグナル伝達は影響し合っ創傷治癒や組織線維化に寄与しているのではないかという、着想に至った。インテグリンは細胞表面に存在する接着分子で、2つの異なるタンパク質サブユニット(  $\alpha$  と  $\beta$  )からなるヘテロ2量体の膜貫通糖タンパク質である。インテグリン  $\alpha 11$  (ITGA11)はもっとも新しく発見された  $\alpha$  サブユニットで  $\alpha 11 \beta 1$  インテグリンは type I コラーゲンへの細胞接着を媒介する。しかし、ITGA11の創傷治癒過程における役割については不明である。

角膜はコラーゲン線維の規則的配列とその隙間を埋めるプロテオグリカンのバランスによってその透明性を維持している。ヒト角膜において ITGA11 は妊娠 8 週頃より検出され、ITGA11 がコラーゲンの規則的配列を制御することに関与する可能性や円錐角膜では ITGA11 の発現が亢進することが報告されている。これらのことから ITGA11 は角膜の発生、創傷治癒に重要な役割を果たしていることが推測される。

### 2. 研究の目的

角膜実質に対する傷害は角膜線維芽細胞(keratocyte)を活性化させ、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの合成・分泌を促進し、たとえ治癒しても角膜に混濁が生じることがある。角膜線維芽細胞を TGF- $\beta$  で刺激するとコラーゲンレセプターである ITGA11 の発現が上昇することを我々は見出した。本研究の目的は眼創傷治癒過程において TGF- $\beta$  シグナルとインテグリンがどのように連携しているかを明らかにし、インテグリンの機能を制御することにより角膜実質混濁の原因となっている過剰な線維化を阻止する方法を確立することである。

### 3. 研究の方法

(1) TGF- $\beta$  処理による角膜線維芽細胞の変化  
角膜線維芽細胞を血清非存在下で 24 時間培養後、培地内の TGF- $\beta$  濃度を変化させ、48 時間後に細胞形態を観察した。また、TGF- $\beta$  処理した細胞の lysate を回収し、各種抗体で western blot 解析を行った。

(2) ITGA11 および CIB1 の線維化における役割

ITGA11、および ITGA11 の細胞内ドメインと結合する CIB1 を恒常的に発現する線維芽細胞を確立し、それらを高発現している細胞が TGF- $\beta$  刺激に対してどのような挙動を示す

かを検討した。

(3) EGCG が TGF- $\beta$  の作用に及ぼす影響  
EGCG と TGF- $\beta$  type II レセプターの結合は免疫沈降法とアフィニティークロマトグラフィーにより解析した。

### 4. 研究成果

(1) 角膜線維芽細胞(keratocyte)を TGF- $\beta$  処理すると濃度依存的に筋線維芽細胞様の形態を示すようになった(図1)。

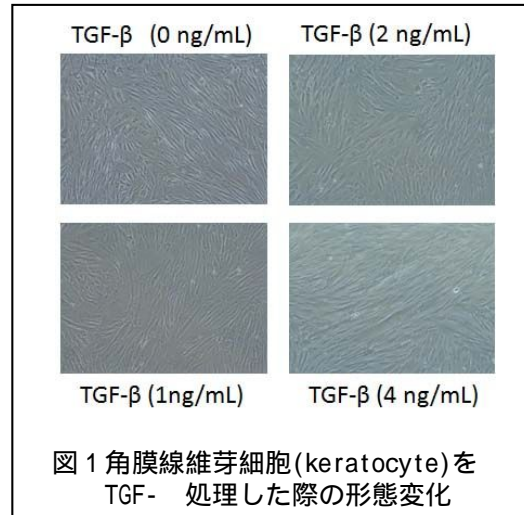


図1 角膜線維芽細胞(keratocyte)を TGF- $\beta$  処理した際の形態変化

(2) 角膜線維芽細胞(keratocyte)を TGF- $\beta$  処理すると濃度依存的に ITGA11、 $\alpha$ -SMA の発現が増加した(図2)。

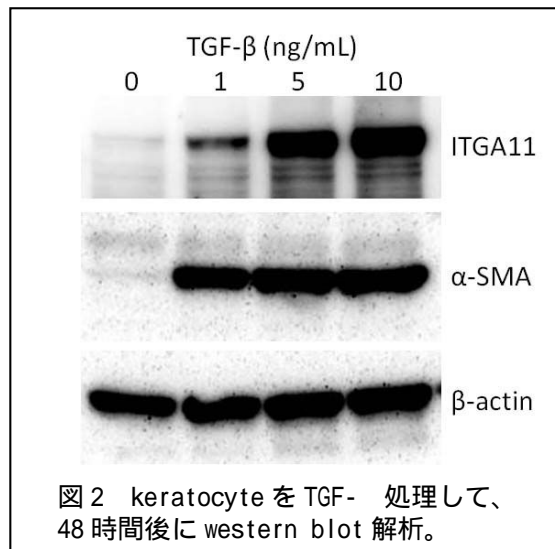


図2 keratocyteを TGF- $\beta$  処理して、48 時間後に western blot 解析。

(3) ITGA11、CIB1 を高発現する安定細胞株を確立し、その細胞を TGF- $\beta$  処理すると高発現していない場合と比較してフィブロネクチンの発現が増加し、TGF- $\beta$  に対する感受性が亢進していることが推察された(図3)。

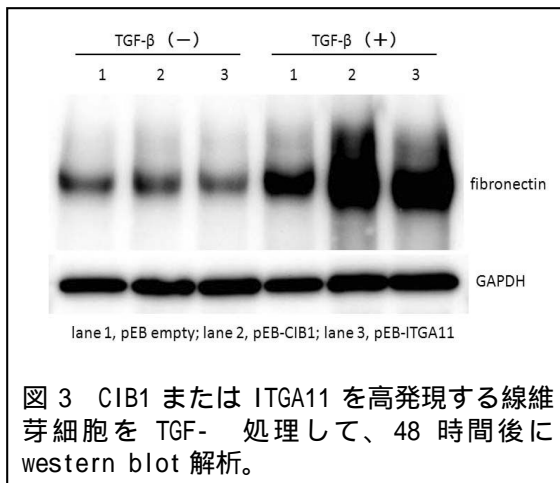


図3 CIB1 または ITGA11 を高発現する線維芽細胞を TGF- $\beta$  処理して、48 時間後に western blot 解析。

(4)線維芽細胞を TGF- $\beta$  処理したとき、EGCG は濃度依存的に  $\alpha$ -SMA の発現を抑制した (図 4)。また、TGF- $\beta$  処理するとリン酸化 Smad2/3 の核内移行が観察されたが、EGCG 処理を加えるとその核内移行は減少した(図 5)。

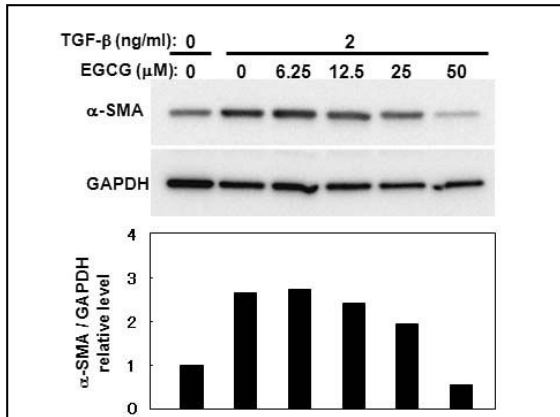


図4  $\alpha$ -SMA に対する EGCG の効果。EGCG、TGF- $\beta$  を 24 時間作用させた後に、western blot 解析。

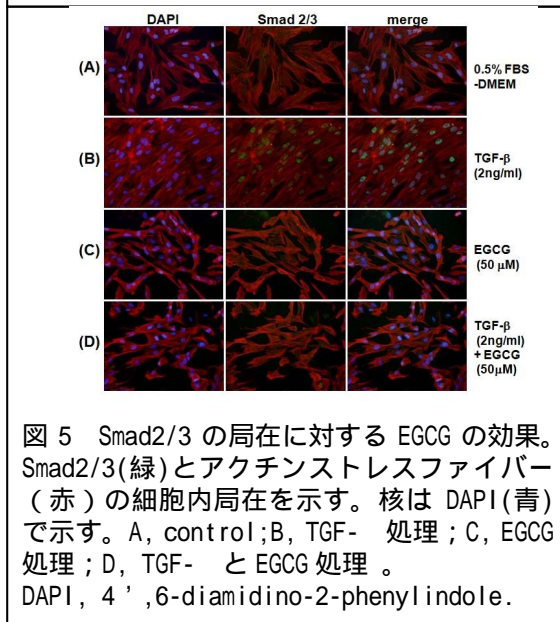


図5 Smad2/3 の局在に対する EGCG の効果。Smad2/3(緑)とアクチンストレスファイバー(赤)の細胞内局在を示す。核は DAPI(青)で示す。A, control; B, TGF- $\beta$  処理; C, EGCG 処理; D, TGF- $\beta$  と EGCG 処理。DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

TGF- type II レセプター (TGFRII) を高発現させた cell lysate と抗 TGFRII 抗体を用いて EGCG が TGF- と TGFRII の結合を阻害することを免疫沈降法で確認した (図 6)。

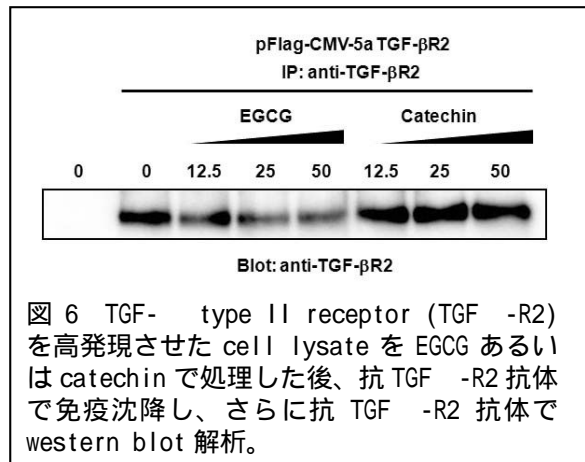


図6 TGF- type II receptor (TGF- $\beta$ -R2) を高発現させた cell lysate を EGCG あるいは catechin で処理した後、抗 TGF- $\beta$ -R2 抗体で免疫沈降し、さらに抗 TGF- $\beta$ -R2 抗体で western blot 解析。

また、catechin はその結合を阻害しなかったため、TGF- $\beta$  と TGFRII の結合を阻害するのはカテキン類すべてではなく、EGCG 特有の性質であると推測された。

以上の結果から、ITGA11 および CIB1 は臓器線維化治療の標的タンパク質となりうることが示唆された。

また、EGCG が TGFRII に結合することにより、TGF- $\beta$  の作用を抑制し、角膜実質混濁の原因となっている過剰な線維化を阻止する可能性があることが判明した。

## 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 6 件)

Yoshida K, Park AM, Ozaki S, Munakata H. Interaction of calcium- and integrin-binding protein 1 with integrin 11 and its possible involvement in pulmonary fibrosis, *Advances in Biological Chemistry*. 査読有, 4, 2014, 59-66.

DOI: 10.4236/abc.2014.41009

Tabuchi M, Hayakawa S, Honda E, Ooshima K, Itoh T, Yoshida K, Park AM, Higashino H, Isemura M, Munakata H.

Epigallocatechin-3-gallate suppresses transforming growth factor- signaling

by interacting with the transforming growth factor- type II receptor, World J Exp Med. 査読有, 3, 2013, 100-107. DOI: 10.5493/wjem.v3.i4.100

Sugioka K, Kodama A, Okada K, Iwata M, Yoshida K, Kusaka S, Matsumoto C, Kaji H, Shimomura Y. TGF- 2 promotes RPE cell invasion into a collagen gel by mediating urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression, Exp Eye Res. 査読有, 115, 2013, 13-21. DOI : 10.1016/j.exer.2013.06.020

Honda E, Park AM, Yoshida K, Tabuchi M, Munakata H. Myofibroblasts: Biochemical and Proteomic Approaches to Fibrosis, Tohoku J Exp Med. 査読有, 230, 2013, 67-73. DOI : 10.1620/tjem.230.67

Sugioka K, Kodama A, Yoshida K, Okada K, Fukuda M, Shimomura Y. Immunohistochemical localization of urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor and alpha2-antiplasmin in human corneal perforation: a case report, BMC Ophthalmology. 査読有, 12, 2012, - . DOI:10.1186/1471-2415-12-60

Park AM, Hayakawa S, Honda E, Mine Y, Yoshida K, Munakata H. Conditioned media from lung cancer cell line A549 and PC9 inactivate pulmonary fibroblasts by regulating protein phosphorylation, Arch Biochem Biophys. 査読有, 518, 2012, 133-141. DOI: 10.1016/j.abb.2011.12.012

〔学会発表〕(計 5 件)

Sugioka K. TGF-beta2 promotes RPE cell invasion into collagen gel by mediating urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression. ARVO 2013 Annual Meeting, 2013年5月6日, Seattle, USA.

児玉 彩. 原因不明の角膜潰瘍による角膜穿孔症例における線溶系因子の免疫学的局在の検討. 角膜カンファレンス 2013 (第37回日本角膜学会総会、第29回日本角膜移植学会), 2013年2月15日, 和歌山県西牟婁郡白浜町.

吉田 浩二. マトリックスメタロプロテイナーゼ2は 2 - antiplasmin を分解する. 第85回日本生化学会大会, 2012年12月15日, 福岡市.

井本 真由美. L鎖に糖鎖付加が示唆された特異な熱反応性を持つ型BJPの特性. 第59回日本臨床検査医学会学術集会. 2012年11月30日, 京都市.

児玉彩. 線溶系遺伝子欠損マウスを用いた角膜上皮創傷治癒過程の検討. 第116回日本眼科学会総会, 2012年4月5日, 東京.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

吉田 浩二 (YOSHIDA, Koji)  
近畿大学・医学部・准教授  
研究者番号: 60230736

### (2)研究分担者

杉岡 孝二 (SUGIOKA, Koji)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号: 50399119

萩原 智 (HAGIHARA, Satoru)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号: 40460852

### (3)連携研究者

なし