

第101回 日本眼科学会総会 宿題報告 I

眼の細胞生物学

トランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF- β) スーパーファミリーの
眼組織における作用

山下 英俊

東京大学医学部眼科学教室

共同研究者

戸張 幾生, 澤 充, 堀 貞夫, 宮園 浩平, C-H Heldin, P Heldin
 P ten Dijke, T Kuber Sampath, 水流 忠彦, 江口秀一郎, 北野 滋彦
 鈴木 水音, 一條 秀憲, 加藤 光保, 山本 禎子, 船津 英陽, 鈴木 雅信
 池上 靖子, 加藤 聡, 小幡 博人, 堀江公仁子, 茂木 豊, 征矢 耕一
 田中 義和, 清水 顕, 加治 優一, 出田 隆一, 三田 知直, 山田 秀之
 石田 耕一, マルシア・東, 羽生 亜紀, 三浦 雅一, 白澤 榮一, 酒井 宏之

要 約

眼の機能を含めた生命現象を細胞生物学的な方向から眺めるときに, 多細胞生物における細胞間相互作用の解明がある. 多細胞生物がまとまった働きをするためには, 構成している細胞の機能を制御するお互いの情報伝達が大切である. この細胞間情報伝達物質の一つとしてサイトカイン・増殖因子がある. トランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF- β) スーパーファミリーを取り上げ, 眼の生命現象をこのファミリーを通して検討することにより, 今日的な意味での眼研究における細胞生物学の位置づけを試みた. TGF- β スーパーファミリーは TGF- β ファミリー, アクチビンファミリー, 骨形成因子 (BMP) ファミリーなどを含む. その作用としては細胞の増殖, 分化, 遊走, アポトーシス, 細胞外基質産生制御などがある. 受容体は I 型および II 型受容体がシグナル伝達に必須である. 本報告では, まず I 型および II 型受容体のクローニングおよび同定, そして眼組織における分布を検討した. TGF- β 受容体, アクチビン受容体, BMP 受容体は角膜, 毛様体上皮, 水晶体上皮, 網膜, 血管など広い範囲にわたって分布していた. これらの因子が眼組織の恒常性維持に重要な働きをしていることが示唆された. 眼における病態での働きを眼内血管新生および角膜創傷治癒

メカニズムの中でとらえて検討した. 糖尿病網膜症をはじめ, 網膜虚血に伴う血管新生は血管内皮増殖因子 (VEGF) が重要な働きをしていると考えられる. TGF- β は血管内皮細胞に対して直接的には血管新生抑制的に作用するが, 周囲の細胞 (ミューラー細胞や線維芽細胞) に作用して VEGF 産生や細胞外基質産生を促進することで, 間接的には血管新生促進的に作用する. 角膜上皮および実質創傷治癒過程では, TGF- β は上皮細胞が創傷部を覆う過程に抑制的に作用し, 実質細胞の活性化によって異常な結合組織形成に関与する可能性が示唆された. 以上の作用は, 他の因子からの影響を受けつつサイトカイン・増殖因子ネットワークを形成して細胞機能を制御している. 眼という多様な多くの細胞から成る器官の恒常性維持, 病態解明の細胞レベルでの理解には TGF- β スーパーファミリーを含めたサイトカイン・増殖因子ネットワークの解明が重要と考えられる. (日眼会誌 101: 927-947, 1997)

キーワード: TGF- β スーパーファミリー, 血管新生, 角膜創傷治癒, サイトカイン・増殖因子ネットワーク, 細胞生物学

別刷請求先: 113 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学医学部眼科学教室 山下 英俊
 (平成9年8月4日受付, 平成9年8月13日受理)

Reprint requests to: Hidetoshi Yamashita, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, the University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

(Received August 4, 1997 and accepted in August 13, 1997)

Functions of the Transforming Growth Factor- β Superfamily in Eyes

Hidetoshi Yamashita

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo

Abstract

One human body is composed of 6×10^{13} cells, and eyes are also composed of many cells of different functions. The cellular functions and intercellular interaction are regulated by many regulators including cytokines and growth factors to maintain the homeostasis. The transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, a large family of multifunctional factors, regulates various cellular functions, including cellular proliferation, migration, differentiation, apoptosis and extracellular matrix production. The TGF- β superfamily contains about 30 multifunctional factors, and is divided into several families according to the sequence homology. The TGF- β family, the activin family, and bone morphogenic proteins belong to the TGF- β superfamily. TGF- β superfamily members transduce signals through type I and type II serine/threonine type transmembrane receptors. The signals are transduced from receptors through nuclei by Smad family members, which are phosphorylated by the activated type I receptors and translocate from cytoplasm into nuclei. TGF- β family members and the TGF- β superfamily receptor family are expressed in ocular tissues including the cornea, ciliary epithelium, lens epithelium, retina, and blood vessels. This observa-

tion suggests the important role of the TGF- β superfamily in eyes. Smad family members (Smad 1, Smad 2, Smad 3 and Smad 4) are expressed in the cultured retinal pigmented epithelial cell line (D407), in which TGF- β and activin A stimulate the translocation of Smad 2, but not Smad 1 into nuclei, whereas bone morphogenic protein (BMP) stimulates that of Smad 1, but not Smad 2. TGF- β superfamily members play important roles in the pathogenesis of retinal neovascularization and in the wound healing process of corneal tissue. TGF- β inhibits the endothelial functions, but, stimulates angiogenesis *in vivo*. TGF- β is involved in the formation of abnormal connective tissue in corneal wound healing. In these processes, many cytokines and growth factors are involved, interacting with each other and forming networks. It is mandatory to clarify the networks to investigate molecular pathogenesis and new therapeutic agents. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 927-947, 1997)

Key words: TGF- β superfamily, Angiogenesis, Corneal wound healing, Cytokine/growth factor network, Cell biology

I 緒 言

今回の宿題報告の課題は、眼の研究における細胞生物学の位置を明らかにすることである。細胞が生体を構成する基本単位であること、そして生命現象が細胞を基本単位として営まれていることは、19世紀に Schleiden, Schwann, Virchow らの生命科学の巨人達の努力により、今日では常識となっている。しかし、他面ではあまりに当たり前すぎて、今回のテーマの先端性に誤解が生まれるかも知れない。本項では今日の意味で細胞生物学が現代生命科学の中心に座っていることを示すことを最終目的としたいと考えている。

これまでの生命科学は物理学、化学などと同様により細かな構成単位を同定し、性質を極めることへと向かってきた。しかし同時に、生命科学の最も大切な応用分野である臨床医学は、常に生体全体を相手としなければならない。今日、臨床医学の専門化に際して、眼科医は主に眼という器官を中心に診療を行うが、それにしても細胞レ

ベルからみると極めて大きな眼という器官全体を相手にしなければならない。最新の生命科学の成果である分子生物学が眼全体の病態の理解に現時点で直結しているわけではない。このように、分析を極めて個々の現象の理解ができれば目的が達するというわけに行かないのが臨床医学の難しさである。つまり、分析で得られた多くの基本的な因子を再構成して、生命現象を我々がみえるレベルにまでまとめあげる作業は遅れている。今回、細胞生物学がテーマになった意義は、このような分析的な方向が主流になり、個々のデータを総合して生体レベルで理解することがまだ完成していない時代に、これからの生命科学、臨床医学の方向を考えてみるよい機会とすることである。

生命現象を細胞生物学的な方向から眺めるときに種々の側面が考えられるが、その重要な項目として、多細胞生物における細胞間相互作用の解明がある。多細胞生物がまとまった働きをするためには、構成している細胞の機能を制御するお互いの情報伝達が大切である。この細胞

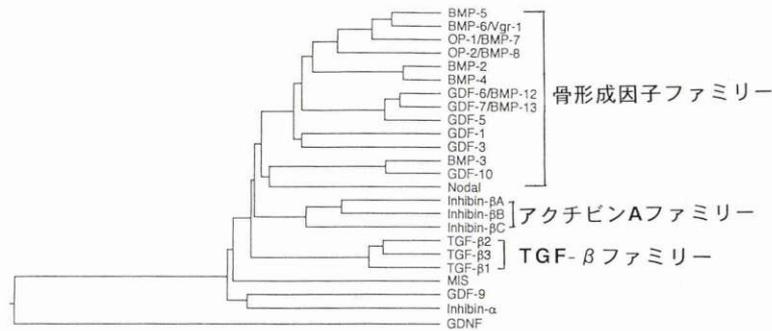


図1 トランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF- β) スーパーファミリーのメンバーの相同性の系統樹。TGF- β スーパーファミリーは相同性が高い因子をまとめたファミリーに分けられる。TGF- β ファミリー、アクチビンファミリー、骨形成因子ファミリー(BMP ファミリー)が大きなファミリーである。系統樹は TGF- β スーパーファミリーのメンバーの活性型の部分の相同性の高いものが距離が近い。(文献4から改変引用)

間情報伝達物質には、低分子量の一酸化窒素などから蛋白質、脂質、巨大な分子である糖質など様々である。今回、我々は蛋白質性の因子であるサイトカイン・増殖因子を取り上げた。すなわち、サイトカイン・増殖因子とは細胞間の情報伝達を行う蛋白質性の因子である¹⁾。そして、その中でトランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF- β) スーパーファミリーを取り上げ、眼の生命現象をこのファミリーを通して検討することにより、今日的な意味での眼研究における細胞生物学の位置づけについて考えてみたい。

II TGF- β スーパーファミリーの分子生物学

1. TGF- β スーパーファミリーとは何か?

TGF- β スーパーファミリーは、そのプロトタイプである TGF- β とアミノ酸配列が似ている(相同性の高い)サイトカイン・増殖因子のファミリーである²⁾³⁾。スーパーファミリーは相同性の高い因子によるファミリーに分けられる。これには TGF- β ファミリー、アクチビンファミリー、骨形成因子ファミリー(bone morphogenetic protein family, BMP family)などがある(図1)⁴⁾。

プロトタイプの TGF- β は分子量 25 kD の二量体構造をもったペプチドで、哺乳類では TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 の3種類のアイソフォームが確認されている。そのお互いの相同性は 70~80% に及び、*in vitro* での作用は極めて類似している。しかし、ノックアウトマウスを用いた検討によると、TGF- β 1 ノックアウトでは生後 2~3 週で多臓器の炎症が起こり⁵⁾⁶⁾、TGF- β 2 ノックアウトでは眼を含み、心臓、肺、顔面、四肢、脊柱、内耳など多くの臓器の形成異常がみられ⁷⁾、TGF- β 3 ノックアウトでは口蓋裂、肺形成異常などの奇形がみられた⁸⁾。このように phenotype が異なっており、3 者の生体内での作用は異なっていることが示唆されている。

TGF- β の作用としては、細胞の増殖、遊走、分化、アポトーシス、細胞外基質蓄積などが知られている²⁾³⁾。このように、一つの因子が細胞やその周囲の状況により多様

な作用をもつことがサイトカイン・増殖因子の特徴の一つである(多様性, pleiotropism)。

アクチビンファミリーは卵巣から分泌され、下垂体細胞からの follicle stimulating hormone (FSH) 分泌を促進するホルモンとして発見された。その後、赤芽球の分化誘導、神経栄養作用、血管内皮細胞や網膜色素上皮細胞の細胞増殖抑制作用など、多様な作用をもつサイトカイン・増殖因子として再発見された⁹⁾¹⁰⁾。下垂体の FSH 分泌を抑制するホルモンとしてインヒビンも発見された。インヒビンとアクチビンは作用が正反対であるが、構造的には類似している。インヒビンは α 鎖と β 鎖のヘテロ二量体であるが、アクチビンは β 鎖の二量体である。 β 鎖には哺乳類では β A, B, C の3種類がクローニングされている⁹⁾¹⁰⁾(図1)。

骨形成因子(BMP)は元々筋肉などの非骨組織に投与すると骨組織が形成されることからクローニングされたが、他のファミリー同様に、それ以外に多くの作用をもつことが判明している。作用としては、細胞の増殖、分化、細胞接着、発生過程での形態形成など極めて多様である¹¹⁾。

以上の因子はそれぞれが多様な作用をもつと同時に、同じ細胞が種々の因子によって同様の作用を発揮することが知られている。これを冗長性(redundancy)と呼び、サイトカイン・増殖因子のもう一つの特徴である。例えば、血管内皮細胞が TGF- β 1, アクチビン A によって増殖が抑制されることが冗長性の例である²⁾¹²⁾。

2. TGF- β スーパーファミリーの作用発現と受容体

TGF- β の各因子は、いずれも I 型受容体(分子量 50~55 kD)および II 型受容体(70~100 kD)の2種類の受容体がリガンド存在下に複合体を形成することにより作用を発揮する²⁾³⁾¹¹⁾(図2)。I 型受容体および II 型受容体はいずれもセリン/スレオニンキナーゼの作用をもつ細胞膜結合型酵素である³⁾⁴⁾¹¹⁾。表1に示すように、現在までに7種類の I 型受容体分子、4種類の II 型受容体がクローニングされている。歴史的には、まず II 型受容体がクローニングされ、I 型受容体のクローニングがその後我々のグループを含むいくつかのグループによってな

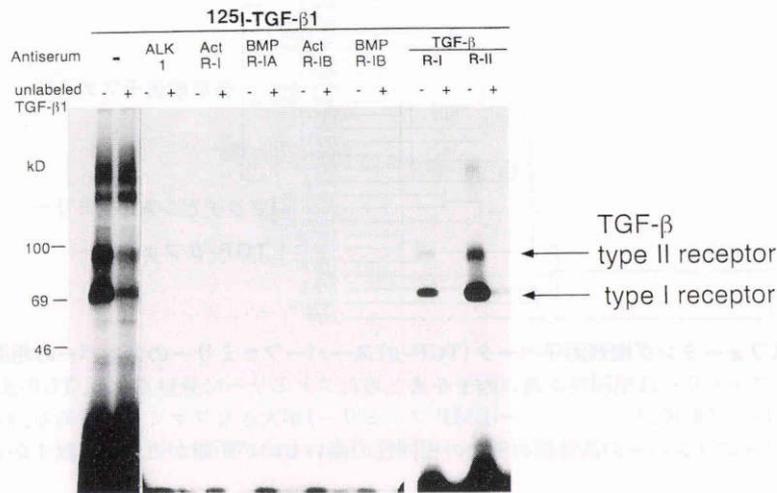


図2 TGF-β I型および II型受容体の検出。

ブタ培養大動脈内皮細胞において¹²⁵I-TGF-β 1を細胞膜上に発現した受容体に結合させ、化学架橋剤により複合体を安定化させ、SDS-PAGEで分析した結果を示す。6種類のI型受容体(ALK-1: activin receptor-like kinase-1, Act R-I: アクチビンI型受容体, Act R-IB: アクチビンIB型受容体, BMP R-IA: BMP IA型受容体, BMP R-IB: BMP IB型受容体, TβR-I: TGF-βI型受容体)に対する特異的な抗体による免疫沈降法を用いて6種類のI型受容体のうち、どのI型受容体がTGF-βに結合するかを検討した。TGF-I型受容体のみで¹²⁵I-TGF-β 1-TGF-β受容体複合体が検出された。詳細は本文参照。TGF-βII型受容体を抗体で検出するとTGF-βI型受容体も検出され、TGF-βI型およびII型受容体が複合体を形成していることがわかる。¹²⁵I-TGF-β 1の結合の特異性を確かめるため、放射性ヨードラベルしないTGF-β 1による結合のブロックを行った。結合がブロックされたものが特異的な結合である。

表1 TGF-βスーパーファミリーとその受容体ファミリーの対応

受容体	因子
TGF-β I型受容体	TGF-β
アクチビン I型受容体	アクチビン, BMP
アクチビン IB型受容体	アクチビン
BMP IA型受容体	BMP
BMP IB型受容体	BMP
ALK-1	不明
ALK-7	不明
TGF-β II型受容体	TGF-β
アクチビン II型受容体	アクチビン, BMP
アクチビン IIB型受容体	アクチビン, BMP
BMP II型受容体	BMP

TGF-β: transforming growth factor-β, BMP: 骨形成因子, ALK-1: activin receptor-like kinase-1, ALK-7: activin receptor-like kinase-7

された^{2(11)(13)~16)}。サイトカイン・増殖因子のリガンドと受容体の組み合わせの同定は、重要な問題であると同時に難しい問題である。I型受容体うち、TGF-βの受容体を同定する過程により、受容体のリガンド同定法を我々のデータを基に紹介する。

II型受容体との構造上の類似性から、6分子のセリン/スレオニンキナーゼ型受容体がクローニングされた。これを activin receptor-like kinase-1(ALK-1)~ALK-6と名付けた¹⁴⁾(ALK-7¹⁵⁾は1996年にクローニングされたので、今回の検討には入っていない)。これまでの研究に

よると、TGF-βはII型受容体に単独で結合するが、I型受容体がないとシグナルは伝達されず(図3, 4), I型受容体は単独ではTGF-βを結合せず、II型受容体が共存下に結合する²⁾。そこで、TGF-βスーパーファミリー受容体の発現が極めて低いCOS-1細胞にTGF-βII型受容体遺伝子導入とともにALK-1~6の一つ一つの complementary deoxyribonucleic acid(cDNA)を共導入したところ、TGF-βはALK-1~6のすべてに結合した¹⁴⁾。このデータではALK-1~6がTGF-βの受容体になり得ることを示しているが、真の受容体は不明である。次に、我々はTGF-βに反応するミンク肺上皮細胞、ブタ大動脈内皮細胞においてTGF-βに結合する分子を検討したところ、ALK-5のみが検出されたのでALK-5がTGF-βI型受容体と名付けられた。図2はブタ大動脈内皮細胞での検討を示す。この図に示すように、TGF-βリガンド-受容体複合体は抗TGF-βI型受容体抗体のみによって検出されており、TGF-βが生理的条件下ではTGF-βI型受容体(ALK-5)のみに結合することがわかる¹⁴⁾。抗TGF-βII型受容体抗体でもII型受容体とともにI型受容体も検出されたことから、TGF-βI型、II型受容体がTGF-βリガンド存在下に複合体を形成していることがわかる。さらに、TGF-βI型、II型受容体がTGF-βのシグナルを伝達する機能を持っていることで真の受容体であることの証明には必要である。その証明のためにTGF-βI型受容体が発現していない変異細胞にI型受容体の6種類を遺伝子導入して反応性の回復をみたところ

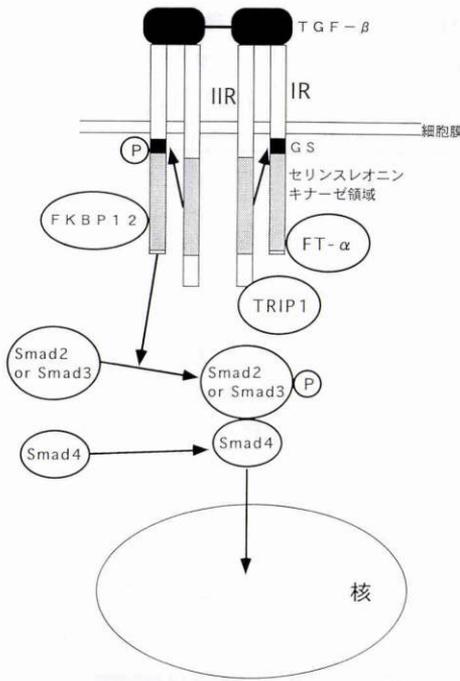


図3 TGF-βのシグナル伝達機構。

TGF-βはI型およびII型受容体に結合する。II型受容体はI型受容体をリン酸化しての活性化する。活性化されたI型受容体はSmadファミリーの因子をリン酸化してシグナルが伝達されていく。I型およびII型受容体に結合する多くの蛋白質が明らかになっている。詳細は本文参照。

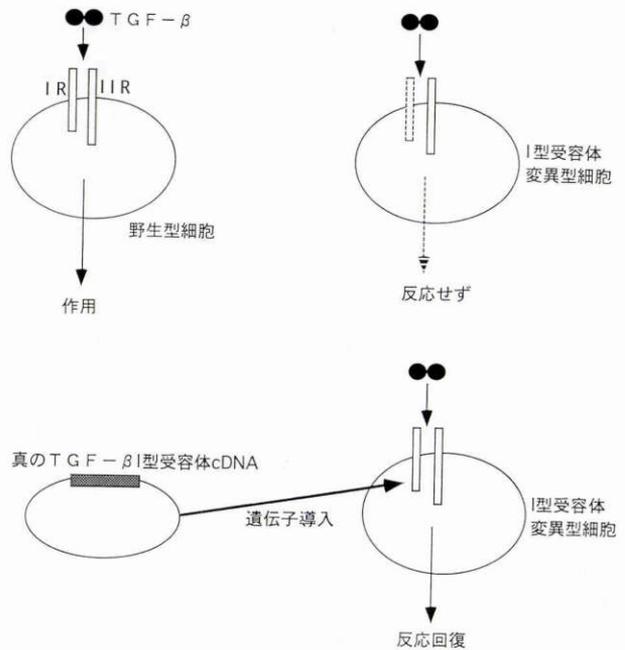


図4 真の TGF-β I 型受容体の同定。

野生型は TGF-β に反応する。TGF-β I 型受容体変異細胞は TGF-β に反応しない。後者を用いた反応性の回復 (rescue) をみる実験の模式図を示す。TGF-β に対する反応性が回復するためには真の TGF-β I 型受容体の遺伝子を変異細胞に導入する必要がある。この実験系を用いて ALK-1~6 の cDNA を検討したところ、ALK-5 の cDNA を導入したときのみ TGF-β に対する反応性が回復した。このことから、ALK-5 が真の TGF-β I 型受容体であることが明らかになった。

ろ、TGF-β I 型受容体 (ALK-5) のみで TGF-β の反応性の回復がみられた (図 4)¹⁴⁾。これをまとめると、ALK-1~ALK-6 のうちで ALK-5 が TGF-β の真の I 型受容体であることが示されたことになる。TGF-β 以外の因子に対する受容体としては、表 1 に示すように、アクチビン は 2 種類の I 型受容体と 2 種類の II 型受容体の組み合わせによりシグナルが伝達される¹¹⁾¹⁷⁾。アクチビン I 型受容体と IB 型受容体では発現される作用が異なるとの報告¹⁷⁾もある。これでアクチビンの作用の多様性を一部説明することができる。また、アクチビンと BMP は I 型受容体のうちアクチビン I 型受容体 (ALK-2)、II 型受容体のうちアクチビン II 型および IIB 型受容体を共有している¹⁸⁾。これでアクチビンと BMP の冗長性 (redundancy) の一部が説明できると考えられる。すなわち、アクチビン I 型受容体+アクチビン II 型 (または IIB 型) 受容体はアクチビンのシグナルと BMP のシグナルを伝達できることになる。アクチビンや BMP と異なり、TGF-β には相互に共有されない一種類の I 型受容体、II 型受容体があるのみであるので、表 1 の対応で TGF-β のもつ作用の多様性、冗長性を説明できない¹¹⁾¹⁴⁾¹⁶⁾。このため、細胞内シグナル伝達経路の解明が大切になる。

3. TGF-β スーパーファミリーの受容体から細胞核へのシグナル伝達経路

TGF-β のシグナル伝達は受容体に TGF-β が結合し

て始まる。TGF-β は、まず II 型受容体に結合し、TGF-β -II 型受容体複合体に I 型受容体が結合する¹⁶⁾¹⁹⁾。I 型受容体は II 型受容体により、GS ドメイン (グリシン (G)、セリン (S)、スレオニン (T) に富んだ領域) においてリン酸化され、キナーゼが活性化される (図 3)¹⁶⁾¹⁹⁾。活性化された I 型受容体が細胞質の蛋白質分子をリン酸化して、シグナルが細胞外から細胞内へと伝達されていくことになる。

受容体ーリガンド複合体が細胞内へシグナルを伝達するには、必ず I 型受容体と II 型受容体が必要であることが次の実験で明らかになった。TGF-β I 型受容体と II 型受容体の細胞内の部分を入れ替えたキメラ受容体を遺伝子工学的に作製して細胞で発現させて TGF-β のシグナル伝達について検討した²⁰⁾。図 5 に示すように、細胞内に TGF-β I 型受容体と II 型受容体の細胞内の部分がともに存在するときのみシグナルが伝達された。このことから、細胞内へシグナルを伝達するには TGF-β I 型受容体と II 型受容体がともに必要であることが証明された。

この受容体複合体に結合する分子は、近年多く発見されている¹⁶⁾。TGF-β I 型受容体に結合する因子としては FKBP 12 (FK 506 binding protein)¹²⁾、ファルネシルトランスフェラーゼ α (FT-α) サブユニットがあり、TGF-

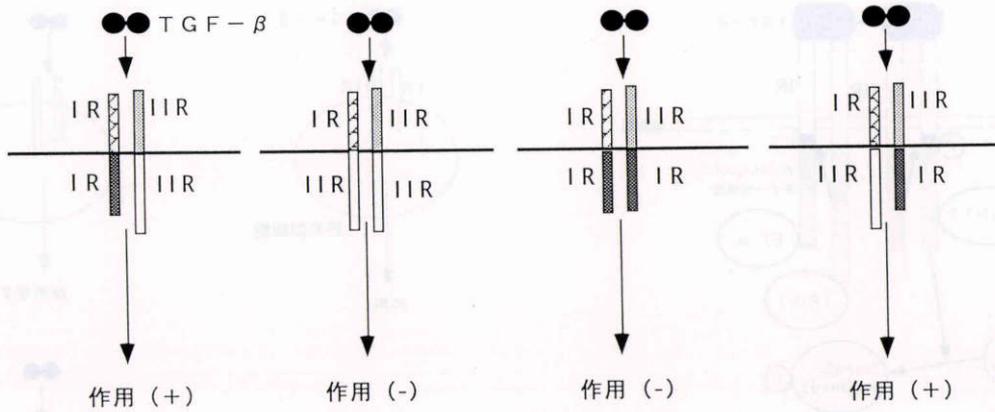


図5 TGF-βのI型(IR)およびII型受容体(IIR)の細胞外領域と細胞内領域が入れ替わったキメラ受容体を作製し、種々の組み合わせでのTGF-βのシグナル伝達について検討した。細胞内ドメインがTGF-βのI型およびII型受容体由来の部分から成っているときのみシグナルの伝達が行なわれた。

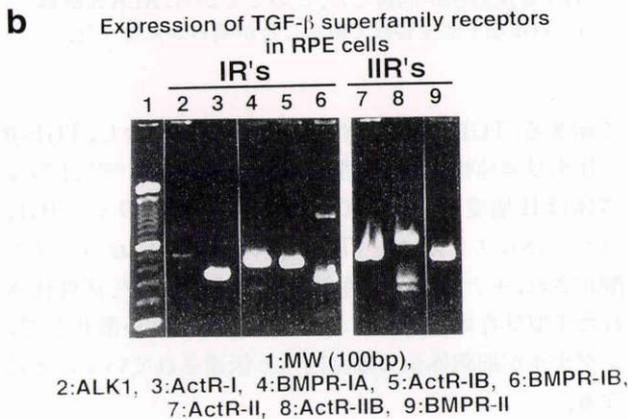
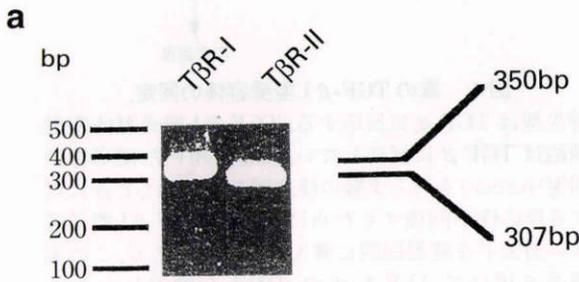


図6 網膜色素上皮細胞株(D 407)におけるTGF-βスーパーファミリー受容体ファミリーのメッセンジャーRNA(mRNA)レベルでの発現。

reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)法を用いて観察した。(a) TβR-I: TGF-βI型受容体, TβR-II: TGF-βII型受容体, (b) ALK-1: activin receptor-like kinase-1, Act R-I: アクチビンI型受容体, Act R-IB: アクチビンIB型受容体, BMP R-IA: BMP IA型受容体, BMP R-IB: BMP IB型受容体, Act R-II: アクチビンII型受容体, Act R-IIB: アクチビンIIB型受容体, BMP R-II: BMP II型受容体。いずれも計算されたサイズにPCR産物が検出された。

β II型受容体に結合する因子としてTRIP1(TGF-β receptor interacting protein-1)が報告されている(図

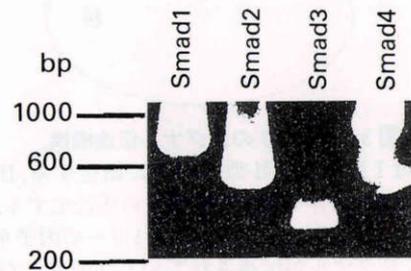


図7 網膜色素上皮細胞株(D 407)におけるTGF-βスーパーファミリーのシグナル伝達分子SmadファミリーのmRNAレベルでの発現。RT-PCR法を用いて観察した。Smad 1, Smad 2, Smad 3, Smad 4のいずれも計算されたサイズにPCR産物が検出された。

3). さらに, TGF-β I型受容体に結合してリン酸化される因子としてSmadファミリーがクローニングされた¹⁶⁾²¹⁾。我々は網膜色素上皮細胞株D 407を用いて, Smadファミリーの作用について検討した。D 407はTGF-βスーパーファミリーの受容体のうち, TGF-β I型, II型受容体, アクチビンI, IB型受容体, II, IIB型受容体, BMP IA, IB型受容体, II型受容体のメッセンジャーRNA(mRNA)レベルでの発現がreverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)法により確認された²²⁾(図6)。さらに, SmadファミリーのSmad 1, 2, 3, 4のmRNAレベルでの発現がRT-PCR法により確認された(図7)。蛋白質レベルではSmad 1, 2を免疫組織化学的に観察したところ発現が確認された(図8)。Smad 1, 2は, 無刺激の状態では細胞質および細胞核にびまん性に分布していた(図8)。この細胞にTGF-β1を作用させると(100 ng/ml, 37°C 1時間)Smad 1の分布は対照と変わらなかったが, Smad 2は細胞核に集中して存在する細胞がみられるようになった(図8)。これは, TGF-β1の刺激でSmad 2がリン酸化され細胞質から細胞核へと移動することを示して

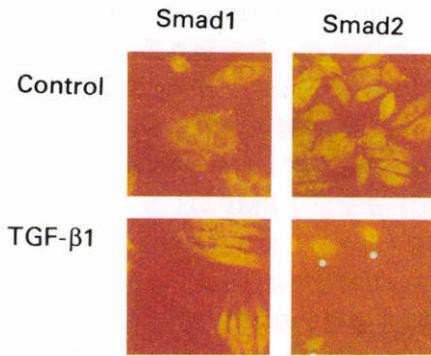


図8 D407細胞における Smad 1, Smad 2 の細胞内局在の TGF-β1 刺激による変化.

Smad 1, Smad 2 の分布はそれぞれに対する特異抗体を用いて免疫蛍光法によって観察した. 二次抗体としてローダミン結合抗体を用いた. D407細胞に TGF-β1 を作用させると(100 ng/ml, 37°C 1 時間) Smad 1 の分布は対照と変わらなかったが, Smad 2 は細胞核に集中して存在する細胞がみられるようになった.

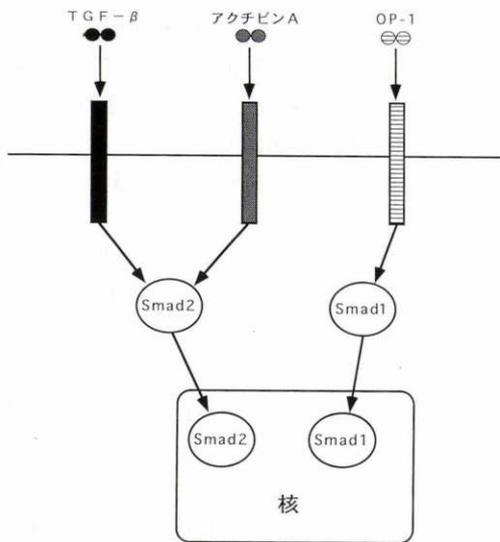


図9 D407細胞における Smad 1, Smad 2 の細胞内局在の TGF-β1, アクチビン A, OP-1 刺激による変化.

いる(図9). 同様な実験系での検討では, アクチビン A 刺激によって Smad 1 ではなく, Smad 2 が細胞核へと移動し, OP-1(BMP-7)の刺激では Smad 1 が移動し, Smad 2 は移動しない(図9). Smad ファミリーの因子が核内で転写因子, またはその一部として機能するかどうかは今後の課題である¹⁶⁾²¹⁾²³⁾. さらに, Smad ファミリーの因子としては Smad 1~5 が報告されており, 今後ますます増えていくと考えられている. そして, TGF-β のシグナルがアクチビン A と同じ Smad 2 を介していることは, 何らかのクロストークが細胞内シグナル伝達経路のレベルで行われている可能性も考えられる. また, TGF-β スーパーファミリーの作用の多様性も, それ

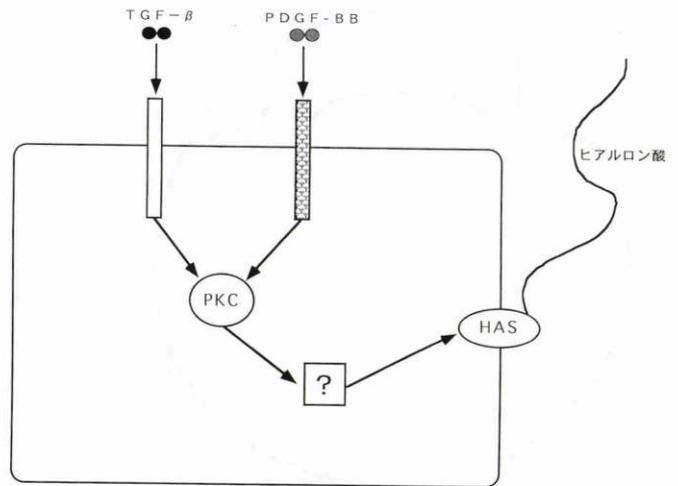


図10 培養線維芽細胞のヒアルロン酸産生の platelet-derived growth factor (PDGF)-BB および TGF-β1 による制御.

PKC レベルでのクロストークがみられる. PKC: プロテインキナーゼ C, HAS: ヒアルロン酸合成酵素.

ぞれの因子の刺激で, 異なった Smad ファミリーの組み合わせで伝達される可能性で一部は説明できるかも知れない. 今後, 急速にデータが蓄積されて, TGF-β スーパーファミリーの作用機序が分子レベルで明らかにされていくと考えられる.

4. TGF-β スーパーファミリーと他のファミリーの因子とのクロストーク

TGF-β スーパーファミリーの因子は先にも述べたように, 種々の因子とネットワークを形成して多細胞生物の細胞間相互作用を制御している. 我々は構造分子(生体の構造の要素となっている分子)としてだけでなく, 機能分子として重要であるヒアルロン酸(hyaluronan)の線維芽細胞からの産生制御に対する血小板由来増殖因子(platelet-derived growth factor, PDGF)と TGF-β1 の影響について検討した²⁴⁾. ともに培養線維芽細胞のヒアルロン酸産生を促進した. そして, その促進作用はプロテインキナーゼ C という細胞内シグナル伝達系の重要な因子を介していた(図10). この結果から, TGF-β はそのファミリーに属していない因子と細胞内のシグナル伝達因子のレベルでクロストークがあることが明らかになった.

III 眼組織における分布

1. 蛋白質レベルでの受容体発現

眼組織を構成する細胞があるサイトカイン・増殖因子の作用を受けるかどうかは, その受容体の蛋白質レベルでの発現をみればわかる. そこで, TGF-β スーパーファミリー受容体ファミリーの蛋白質レベルの眼組織における発現について組織化学的に検討した²⁵⁾²⁶⁾. 検討したのは I 型受容体として, TGF-β I 型受容体, アクチビン I お

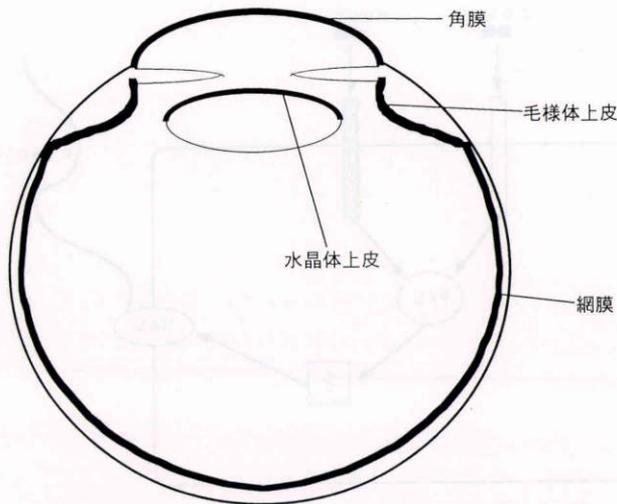


図 11 眼組織における TGF- β スーパーファミリー受容体ファミリーの分布。

図に示した部位での蛋白質レベルでの発現が強く認められた。

よび IB 型受容体, BMP IA, IB 型受容体, ALK-1 であり, II 型受容体としては TGF- β II 型受容体, アクチビン II 型受容体, BMP II 型受容体である。BMP II 型受容体にはカルボキシ末端側に約 530 アミノ酸から成る長いペプチド鎖のついた long version と, それのない truncated version が存在していることが知られている²⁷⁾²⁸⁾。BMP II 型受容体に対しては, 2 種類の抗体を作製して long version と truncated version の発現が検出できるようにした。蛋白質レベルでの発現は, 免疫組織化学的にラット眼を用いて凍結切片で検討した。抗体は上記各受容体のアミノ酸配列から合成したペプチドに対して, 家兎で作製したポリクローナル抗体を用いた²⁸⁾。反応の特異性は各受容体 cDNA を COS-1 細胞に一過性導入して, 確かに受容体を認識しているのを確認した。

2. ラット成体眼における発現

TGF- β , アクチビン, BMP のそれぞれに対する I 型受容体, II 型受容体(表 1)は広範囲の細胞に分布している。角膜(角膜上皮細胞, 実質細胞, 内皮細胞), 毛様体上皮, 水晶体上皮細胞, 網膜色素上皮細胞には表 1 に示した受容体がアクチビン IIB 型受容体を除いて発現が確認された(図 11)²⁵⁾²⁶⁾。アクチビン IIB 型受容体の抗体は入手できず, まだ確認されていない。網膜における発現をみると, 神経節細胞から外顆粒層, 視細胞内節までは上記と同じ受容体が発現していた。上で述べたように, TGF- β スーパーファミリーの因子のシグナルは I 型受容体, II 型受容体がともに存在することが必要である²⁾²⁰⁾。眼の種々の組織に TGF- β , アクチビン, BMP の因子が作用を及ぼすことが示された(図 11)。

I 型受容体, II 型受容体の発現が異なっていたのは視細胞外節における受容体の発現である。すなわち, 視細胞外節で発現がみられたのは TGF- β II 型受容体と BMP

II 型受容体 truncated form のみであり, I 型受容体はみられなかった²⁶⁾²⁹⁾。網膜視細胞外節での TGF- β および BMP II 型受容体 truncated form の発現の意義は現在不明である。二つの可能性が考えられる。一つは, II 型受容体のみを介するシグナルの存在の可能性である。もう一つは, TGF- β または BMP のシグナル伝達が外節形成過程で遮断されたあとの状況を見ている可能性である。今後の研究が必要である。

3) 網膜発生過程での発現

網膜における TGF- β , アクチビン, BMP に対する受容体の発現がみられることから, 成体網膜での機能がこれらの因子により制御されていることを示している。次に網膜の発生過程における作用について検討するため, 各受容体の発現の変化をラット網膜において検討した²⁹⁾。ラット網膜は出生前は層状構造は未分化であり, 出生前後の段階で, まず神経節細胞が分化する。この段階の網膜細胞には視細胞とアマクリン細胞, 双極細胞, ミュラー細胞に分化できる多能性のある細胞が存在している³⁰⁾。我々の観察では, 内・外顆粒層の分離は生後 3~6 日の間に起きる。生後 6 日頃から視細胞層の形成が見られるようになる。しかし, 生後 9 日の段階では視細胞外節の発達は始まっているが, ロドプシンの発現は未だほとんどみられなかった²⁹⁾。Fulton ら³¹⁾³²⁾によると, 視細胞外節の発達が始まるのは生後 9~10 日頃からで, 生後約 2 週間で視細胞外節はほぼ adult と同じ大きさになるが, ロドプシンの発現は生後約 19 日で adult の 50%, そして約 40 日で adult のレベルにまで増加する。このような網膜発生経過と TGF- β スーパーファミリー受容体ファミリーの発現を免疫組織学的に検討した²⁹⁾。I 型受容体, II 型受容体が揃ってシグナルが伝達されるようになるタイミングは, TGF- β スーパーファミリーの各因子に対する I 型受容体, II 型受容体の組み合わせで異なっており, その発生過程における生理的な役割が異なっていることが示唆された。TGF- β I 型, II 型受容体は出生前後から網膜細胞に蛋白質レベルで発現され, この頃には遅くとも TGF- β の作用が受容されるようになると考えられた。アクチビンの作用のうち, アクチビン I/アクチビン II 型受容体を通しての作用は生後 9 日頃から発揮され, アクチビン IB/アクチビン II 型受容体を通しての作用は出生前後から発揮されることが考えられた²⁹⁾。BMP については BMP R-IA/BMP R-II を介するシグナルは出生前後から, BMP R-IB/BMP R-II を介するシグナルは生後 9 日頃から発揮されることが考えられた²⁹⁾。

TGF- β スーパーファミリーの網膜発達における作用は, 現時点では不明である。TGF- β スーパーファミリーの神経組織における作用としては, アクチビン A の神経栄養作用³³⁾や神経発生制御³⁴⁾, 神経細胞へのアポトーシス誘導(BMP-4)³⁵⁾, 神経細胞突起の伸長促進作用(OP-1)³⁶⁾, 網膜発生への Radar (BMP ファミリーに属する

growth/differentiation factor-6 のゼブラフィッシュにおける相同分子)の関与³⁷⁾などが知られており、網膜においても fibroblast growth factor-2 (FGF-2, basic FGF)³⁸⁾などと並んで重要な作用を持つことが考えられた。このようなエビデンスを併せて考えると、網膜発生過程における検討から TGF- β スーパーファミリーの神経組織機能制御についての重要な情報が得られると考えられる。

IV TGF- β スーパーファミリーと 眼疾患の病態

1. 病態研究のストラテジー

正常眼組織における TGF- β スーパーファミリー受容体発現は広範に及んでおり、生理的に重要な働きをもつことが示唆された。生体の恒常性を維持するためには、多くの因子が複雑に絡み合ったネットワークを形成して機能していると考えられる。それが機能不全を起こした状態が種々の疾病である。ということは、病態の解明を目指すには多くの因子が複雑に絡み合ったネットワークの構造を解明しなければならないことになる。そして、これによって生理的な状態での恒常性維持機構を解明することにもなると考えられる。細胞生物学的な手法は、病態解明の中心となるものである。TGF- β スーパーファミリーの因子はどのような作用をもつのかということについて、細胞生物学的手法を用いて検討した。

研究のストラテジーとしては、以下のような項目についての検討が必要である。

- (1) 臨床的研究により病態を検討する。
- (2) 分子、細胞レベルでの情報をできるだけ詳しく集め、病態モデルを作る。
- (3) 生体レベルで上記モデルの検証を行う。

本稿では増殖糖尿病網膜症の網膜・硝子体新生血管と角膜創傷治癒をとりあげ、それぞれの病態と TGF- β スーパーファミリーの働きを検討した。

2. 増殖糖尿病網膜症の網膜・硝子体新生血管

1) 臨床的な検討

糖尿病網膜症が進行し、新生血管が発症する重症網膜症は増殖糖尿病網膜症と呼ばれ、重篤な視力障害を来す³⁹⁾。今日、後天性失明原因のトップを緑内障と分け合っている⁴⁰⁾。厚生省調査研究班によると、糖尿病患者は現在600万人に及ぶと考えられ、糖尿病網膜症の有病率は糖尿病患者の38%、失明者は3%という推定もある⁴¹⁾。その病態は血管新生を含む結合組織性増殖膜が形成されることによる³⁹⁾⁴²⁾。臨床的な観察により、網膜血管の閉塞に伴った網膜の虚血状態と新生血管が関連があることが明らかにされた^{43)~45)}。

増殖網膜症の硝子体手術時に得られた眼内液(前房、硝子体)や増殖膜を用いた検討によってどのような増殖因子が存在しているかがわかる。Aiello ら⁴⁶⁾は眼内液中の血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor,

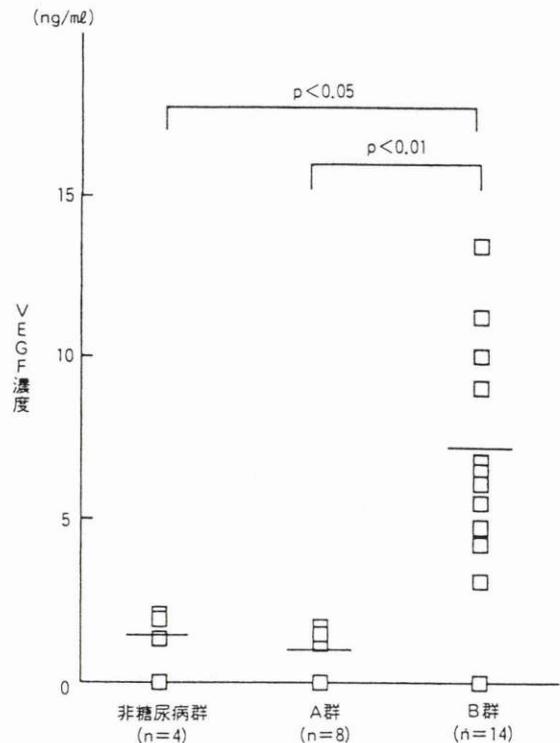


図12 糖尿病網膜症重症度別の眼内液(前房水、硝子体液)の VEGF 濃度。

VEGF 濃度はラジオイムノアッセイにより測定した。非糖尿病群：糖尿病を有しない患者、A 群：網膜症なし、単純網膜症を有する眼、B 群：活動性の増殖網膜症を有する眼。n：眼数。平均値の差の検定は t 検定による。(文献 47, 眼紀から許可を得て転載)

VEGF) 濃度が活動性増殖糖尿病網膜症で上昇することを報告し、我々⁴⁷⁾⁴⁸⁾も確認した。図 12 に我々が先に報告した結果を示すが、VEGF 濃度は非糖尿病、単純および増殖前糖尿病網膜症眼に比べて、活動期の増殖網膜症眼では有意に高値を示した⁴⁷⁾。TGF- β アイソフォームの中では TGF- β 2 が上昇していたという報告⁴⁹⁾がある。我々は眼局所における TGF- β スーパーファミリーの因子の産生を調べる目的で、硝子体手術時に摘出した増殖膜における発現を組織化学的に観察した⁵⁰⁾。増殖膜構成細胞で観察されたのは TGF- β アイソフォームの中では TGF- β 2 であり、他にアクチビン A の発現が観察された。網膜での TGF- β の産生は動物種によって異なるが、TGF- β 1, β 2, β 3 ともに発現している⁵¹⁾。血液中にも TGF- β は存在しているが、TGF- β 1 が多い⁵²⁾⁵³⁾。しかるに、TGF- β 1 は眼内液中での濃度は極めて低いことが確認された⁵⁴⁾。これらのことから、糖尿病網膜症眼での血液眼網機能障害による血液由来の TGF- β がたまたま眼内に流入したのみではなく、眼局所で TGF- β が産生されていることがわかった。その他にも FGF-2 FGF, PDGF, insulin-like growth factor-I (IGF-I), TGF- β , TGF- α , epidermal growth factor (EGF) および各種ケモカイン、

表2 サイトカイン, 増殖因子の特徴と糖尿病網膜症の臨床像

因子	眼内濃度 上昇	低酸素による 誘導	血管新生 (<i>in vivo</i>)	作用対象
VEGF	+	+	+	血管内皮, 周皮細胞, 血球
PDGF	+	+	+	血管内皮, 平滑筋細胞, 線維芽細胞
FGF-2	+	-	+	血管内皮, 線維芽細胞
IGF-I	+	-	+	血管内皮, 線維芽細胞
TGF- β	+	-/+*	+	血管内皮, 線維芽細胞, 平滑筋細胞, 上皮細胞, 血球

VEGF: vascular endothelial growth factor, PDGF: platelet-derived growth factor, FGF: fibroblast growth factor, IGF-I: insulin-like growth factor-I,

*: 条件による

サイトカイン(IL-8, monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), macrophage-colony stimulating factor (M-CSF))などが眼内液で増加していることが報告^{42)55)~60)}されている。

これらサイトカイン, 増殖因子の特徴と糖尿病網膜症の臨床像を表2にまとめた。血管新生については, 糖尿病網膜症の臨床像として大切な網膜虚血による血管新生を説明できるのは VEGF と PDGF である⁵⁶⁾。このうち, VEGF は増殖期に眼内液濃度が上昇するという臨床データ⁴⁶⁾⁴⁷⁾⁵⁵⁾および網膜虚血による血管新生疾患モデルでの血管新生との関連が確認されている⁶¹⁾⁶²⁾。VEGF は *in vitro* の検討で主に血管内皮細胞, 周皮細胞などに作用して血管新生を引き起こす。しかし, 新生血管とともに形成される結合組織の形成促進は VEGF のみでは説明できない。結合組織を形成するために線維芽細胞に作用する因子として, PDGF, FGF-2, IGF-I, TGF- β などが考えられる(表2)。また, 高濃度酸素負荷網膜症モデルで

は, 成長ホルモン-IGF-I 系を抑制すると VEGF には影響を与えないで網膜血管新生発症を減少させることができるとの生体内での研究の報告があり, 血管新生においても一つのサイトカイン・増殖因子で糖尿病網膜症の臨床像をすべて説明することはできないことがわかる⁶³⁾。

2) 糖尿病網膜症における血管新生の分子細胞生物学

前項のような実験的, 臨床的な検討をふまえて, 糖尿病網膜症における血管新生の病態の分子細胞生物学レベルでの解明の試みを我々のデータを中心に紹介する。ここで用いた手法は, 培養血管内皮細胞および *in vivo* における血管新生促進作用アッセイ系を用いて, 種々のサイトカイン・増殖因子の血管新生制御作用およびその分子機構を積み上げて病態モデルを作るというものである。検討したのは TGF- β スーパーファミリーに属する因子として TGF- β 1, アクチビン A, そして眼内血管新生を促進する因子の代表として VEGF である。TGF- β のうち, 増殖糖尿病網膜症など網膜・硝子体病変を持つ眼の眼内液に存在するのは TGF- β 2 がドミナントであるが⁴⁹⁾⁵⁰⁾, *in vitro* では用量依存性が異なるのみで作用はほとんど同じであるため⁶⁴⁾, *in vitro* 実験には入手が容易であった TGF- β 1 を用いた。

血管新生制御因子は *in vivo* と *in vitro* で作用が一見矛盾するように見えることがある²⁾⁶⁵⁾⁶⁶⁾。TGF- β は生体内に投与すると血管新生を促進する⁶⁷⁾⁶⁸⁾(図13)。しかるに, TGF- β 1 は培養ブタ大動脈内皮細胞に作用させると強力な増殖抑制因子として働く(図14)。そのため, ある因子の血管新生制御作用を検討する際には *in vivo* と *in vitro* の実験系を用いる必要がある。

3) *In vivo* における血管新生制御作用

まず, 鶏卵漿尿膜(chick chorioallantoic membrane, CAM)における血管新生制御作用を検討した。Brooksら⁶⁹⁾の方法に従って, 孵化10日目の卵CAM上に検討したい因子を含む濾紙製のディスクを置き, その周囲の血管を観察した。TGF- β 1を含むディスクの周りには血管

Rabbit cornea assay:TGF- β 1

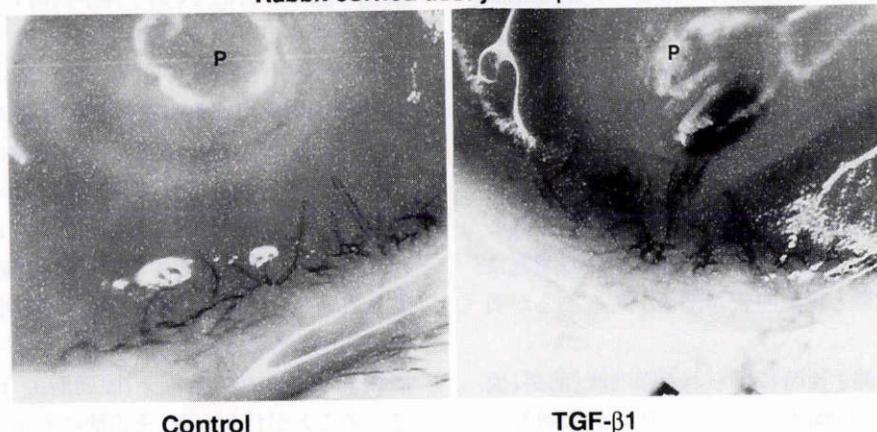


図13 家兎角膜法により TGF- β 1 の生体内血管新生促進作用が示された。
P: ペレット, TGF- β 1 (1 μ g) またはバッファー (Control) を含む。

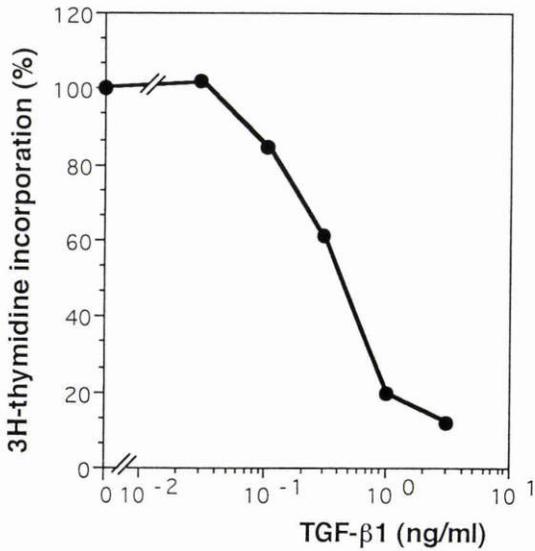


図14 TGF-β1による培養ブタ大動脈内皮細胞増殖抑制効果.

³Hサイミジン取り込みにより観察した.対照を100%としてTGF-β1による取り込み抑制を示した.

が密に形成されている.陽性対照としておいたFGF-1(acidic FGF), VEGF においても血管が密に形成されているが,アクチビン A には血管新生促進作用はみられ

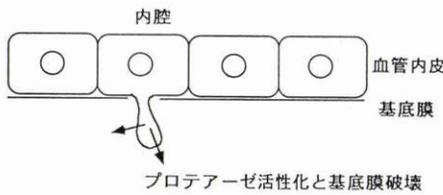
なかった.TGF-β スーパーファミリーの中で血管新生を促進するのはTGF-β 1とBMPファミリーに属するgrowth/differentiation factor-5(GDF-5)であった⁶⁶⁾.アクチビンAの他にGDF-5と同じBMPファミリーに属するBMP-2には血管新生促進効果はみられなかった.TGF-β 1による血管新生を家兎角膜法で確かめた.図13に示すように,TGF-β 1を含むペレットへの血管新生がみられた.

4) *In vitro*における検討—血管内皮に対する直接作用—

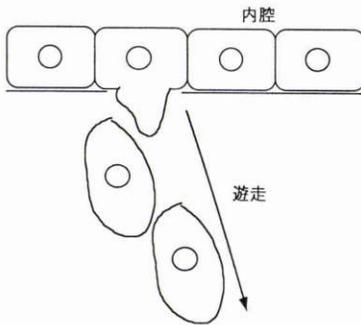
血管新生の分子メカニズムを検討する際には,血管新生を4つのステップに分けて検討するとよい(図15)⁶⁵⁾⁷⁰⁾⁷¹⁾.この4つのステップは,①血管内皮細胞からのプロテアーゼの分泌による基底膜の分解,②血管内皮細胞の遊走,③血管内皮細胞の増殖,④管腔形成である.それぞれを培養血管内皮細胞を用いて検討する実験系があるので,本研究でもこの系を用いて血管新生制御のメカニズムを検討した.培養細胞としては,ヒト皮膚毛細血管由来内皮細胞,ウシ大動脈内皮細胞,ブタ大動脈内皮細胞を適宜用いて検討した.

血管内皮細胞からのプロテアーゼの分泌:ヒト皮膚毛細血管由来内皮細胞,ウシ大動脈内皮細胞におけるウロキナーゼ型プラスミノゲン・アクチベーター(uPA)の

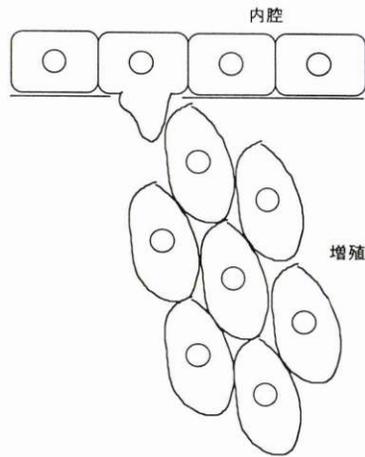
1) プロテアーゼ活性化



2) 内皮細胞遊走



3) 内皮細胞増殖



4) 管腔形成

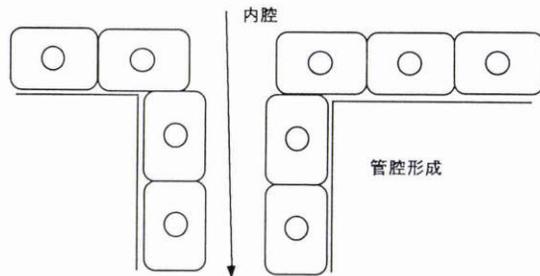


図15 Folkmanによる血管新生の4つのステップの模式図(文献70,71参照).
詳細は本文参照.

Tube formation of capillary endothelial cells

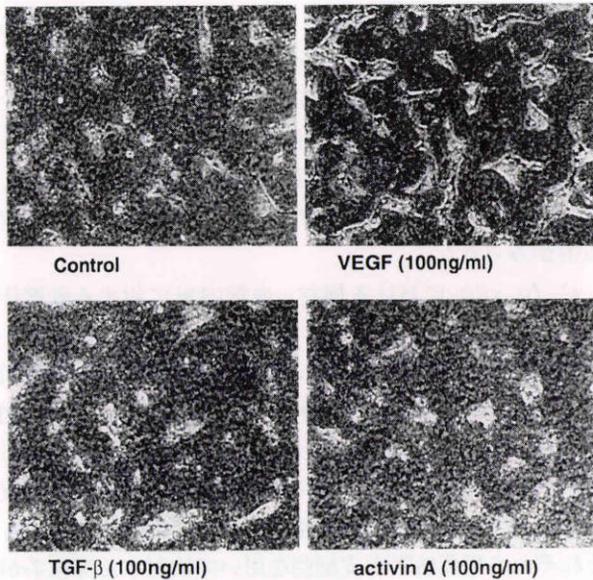


図16 I型コラーゲンゲル内におけるヒト皮膚毛細血管由来血管内皮細胞による管腔形成。VEGFによって毛細血管様構造の形成が促進された。TGF- β 1, アクチビンA によつては促進されなかった。

活性誘導を zymography を用いて観察した⁷²⁾。TGF- β 1 は uPA の活性を抑制した。一方、GDF-5 と陽性対照の VEGF が uPA 活性化を誘導した⁶⁶⁾。

血管内皮細胞の遊走：ポイデンチャンパー法を用いて検討した⁶⁶⁾。TGF- β 1 は内皮細胞遊走を抑制し、GDF-5 は遊走を促進した。GDF-5 の遊走促進作用は、チェックボード解析によると濃度差に応じて促進する化学走性 (chemotactic) 的であった。

血管内皮細胞の増殖：³H]サイミジンの取り込みによって検討した。TGF- β 1 はウシ大動脈内皮細胞、ブタ大動脈内皮細胞の増殖をともに抑制した (図14)。しかし、ヒト皮膚毛細血管由来内皮細胞は TGF- β 1 に対して、低濃度では抑制、高濃度では促進というような二相性の反応を示した。GDF-5 はブタ大動脈内皮細胞、ヒト皮膚毛細血管由来内皮細胞およびウシ大動脈内皮細胞に対して増殖制御効果はみられなかった。VEGF による増殖促進効果は、ヒト皮膚毛細血管由来内皮細胞で顕著にみられた。ウシ大動脈内皮細胞での VEGF に対する反応がみられなかったのは、培養条件下で VEGF に対する受容体の発現が低下したためと考えられる⁷³⁾。

管腔形成：I型コラーゲンゲルの二層の間に血管内皮細胞を培養して毛細血管網様のネットワークの形成の促進作用により観察した⁶⁶⁾⁷²⁾。細胞としては、ヒト皮膚毛細血管由来内皮細胞、ブタ大動脈内皮細胞およびウシ大動脈内皮細胞を用いたが、実際に管腔形成がみられたのはヒト皮膚毛細血管由来内皮細胞の系のみであった。VEGF は管腔形成を促進したが、TGF- β 1, GDF-5 のい

表3 TGF- β , GDF-5 と VEGF の血管新生制御作用と *in vitro* における血管内皮細胞に対する直接作用

因子	血管新生 (<i>in vivo</i>)	血管内皮への作用 (<i>in vitro</i>)			
		PA 活性化	遊走	増殖	管腔形成
TGF- β	+	-	-	-	-
GDF-5	+	+	+	-	-
VEGF	+	+	+	+	+

PA: plasminogen activator, GDF-5: growth/differentiation factor-5, VEGF: vascular endothelial growth factor

ずれも管腔形成促進作用はみられなかった。アクチビンA によつても管腔形成促進作用はみられなかった (図16)。

TGF- β 1, GDF-5 と VEGF による血管新生制御作用と血管内皮細胞に対する直接作用を表3にまとめた。VEGF は *in vitro* で血管内皮細胞の機能を活性化し、*in vivo* での血管新生促進は血管内皮細胞への直接作用によることが考えられる。GDF-5 も4ステップのすべてではないが、血管内皮細胞の遊走と uPA の活性化作用を示すため、*in vivo* での血管新生促進は血管内皮細胞への直接作用によることが考えられる。しかし、TGF- β 1 は血管内皮細胞に直接作用としては抑制的に作用するが、生体内での作用としては TGF- β 1 は血管新生を促進した (表3)。どのようなメカニズムで TGF- β 1 は生体内 (*in vivo*) で血管新生を促進するのであろうか？

5) *In vitro* における検討—血管内皮に対する間接作用—

TGF- β 1 は種々の細胞に作用して VEGF の産生を促進する⁷⁴⁾⁷⁵⁾。今回は網膜を構成するグリア系の細胞であるミュラー細胞をラット網膜から分離培養して TGF- β 1 を作用させて VEGF の産生を測定した⁷⁶⁾。培養ラット網膜ミュラー細胞は RT-PCR 法による検討で TGF- β 1, II 型受容体を発現しているのを確認した。TGF- β に容量依存性に反応して VEGF の産生が促進された⁷⁶⁾。すなわち、対照では培養液中に VEGF はラジオイムノアッセイ法で測定するとほとんど検出されなかったが、TGF- β 1 (1 ng/ml) を24時間作用させると、培養液中の VEGF 濃度は 8.1 ± 6.9 (平均値 \pm 標準偏差) ng/ml, TGF- β 1 (10 ng/ml) で、VEGF は 24.7 ± 4.4 ng/ml と用量依存性に VEGF 産生の増加がみられた。

他に、血管新生制御との関連では TGF- β 1 は多くの細胞外基質の産生を促進し、また、それに対する細胞の受容体であるインテグリンなどの発現を制御 (多くの場合促進) する⁷⁵⁾。我々の観察によると、TGF- β 1 は線維芽細胞に作用してヒアルロン酸の産生が促進する²⁴⁾。高分子量ヒアルロン酸は血管新生を抑制し、低分子量ヒアルロン酸は促進することが知られている⁷⁷⁾。このように、細胞外基質を介する血管新生にも TGF- β は関与する可能性がある。

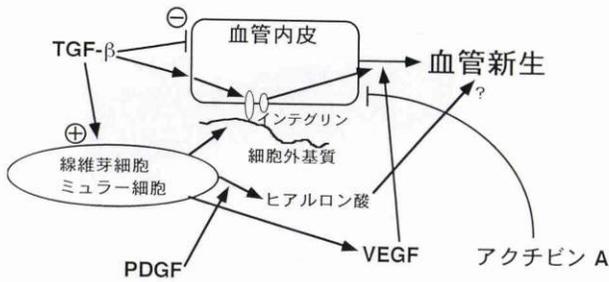


図17 血管新生をめぐる各種サイトカイン・増殖因子の相互作用。

詳細は本文参照。

⊕：促進，⊖：抑制，？：促進または抑制の作用が不定。

6) 網膜血管新生の病態モデルとその考察

前項までの結果を基に、血管新生の過程における血管内皮細胞の多くの因子による制御機構を図17にまとめた。血管内皮細胞に対する直接作用は、VEGFは血管新生促進的であり、TGF- β は抑制的である。しかし、TGF- β は血管内皮以外の細胞に作用してVEGFの産生を促進し、さらには細胞外基質の産生を促進するなどして間接的に血管新生を促進するように作用する。アクチビンAは血管内皮細胞に抑制的に働くこと¹²⁾、CAM法による*in vivo*血管新生の検討でその促進作用がみられなかったことから、血管新生に少なくとも促進的には働かない。

生体内での血管新生は多くの血管新生促進および抑制因子の相互作用により最終的に促進されるか、抑制されるかが決まる⁷⁸⁾。いわば血管新生促進および抑制因子のバランスの上に立って生体の血管新生が起こるかどうか決定されることになる。眼内血管新生促進因子としては表2にあげた因子があり、血管新生の生体内での抑制因子としては血小板因子4 (PF4)、インターフェロン、既知の蛋白質分子の一部(プラスミノゲンの一部であるアンジオスタチン、XVIII型コラーゲンの一部であるエンドスタチンなど)、ケモカインの一部などがある⁷⁹⁾。これらの因子が眼疾患に関与していることは、まだ確定していない。インターフェロンを老人性黄斑変性の黄斑下血管新生の治療に応用する試みがあることから、インターフェロンが眼内血管新生の抑制因子として作用し得ることが示唆される⁸⁰⁾。これまでの研究がどちらかというと促進因子の作用に重点がありすぎたが、今後は種々の因子のバランス、言葉を換えればサイトカイン・増殖因子のネットワークの解明が大切である⁷⁸⁾。そして、このネットワークでTGF- β スーパーファミリーの因子は生体内で非常に複雑な影響を血管新生過程に及ぼす。TGF- β の作用のみをとっても、結果として生体内で血管新生促進的か抑制的かは非常に複雑なバランスの上に成り立っている(図17)。

TGF- β の生体内血管新生促進作用をみると、生体内で

の血管新生制御作用は血管内皮細胞に対する直接作用によるだけでなく、二次的な作用も重要であることがわかる。最近クローニングされた angiopoietin-1 は血管内皮細胞の増殖、管腔形成などを促進しないが⁸¹⁾、血管内皮細胞と周囲の細胞や細胞外基質との相互作用を制御することにより血管新生制御因子として作用する⁸¹⁾⁸²⁾。また、tissue factor も血管内皮細胞には直接に作用しないが⁸³⁾、血管周囲の細胞の機能を制御することにより血管形成を制御するのではないかと考えられる⁸³⁾。これらの因子の作用は血管新生の過程で血管内皮細胞が血管系を作るためのいわば環境作りと、できた血管の成熟、再構築(remodelling)に関与すると考えられている⁸²⁾⁸⁴⁾。TGF- β も細胞外基質蓄積制御、細胞外基質に対する受容体(インテグリンなど)の発現制御作用を持ち、angiopoietin-1や tissue factor と同様の作用を持つ可能性がある。

7) 今後の課題—生体内モデルでの検討—

血管新生制御の研究のためには、生体内での作用を併わせて検討することが必要であることは上に繰り返し述べた通りである。あるサイトカイン・増殖因子の生体内での作用を検討するには、発生工学的な手法を用いて、サイトカイン・増殖因子を多量に発現させるトランスジェニック動物や、ある因子の発現を抑制するノックアウト動物での研究がある。培養系では血管内皮細胞に全く作用を及ぼさない angiopoietin-1 が血管新生の制御因子として重要であること⁸¹⁾、培養系では血管内皮に抑制的に働く TGF- β 1 が生体内での血管形成過程に関与していること⁸⁵⁾を明らかにしたのはノックアウトマウスでの検討による。ただし、この場合に観察されるのは血管形成のうち、血管系が全く存在しない状態から発生する過程である vasculogenesis と、元々血管が存在している所に血管が新生する angiogenesis の二つのメカニズムが合わさっていることに注意しなければならない⁸⁶⁾。

分子細胞生物学的なデータを基に構築された血管新生制御モデルは、眼内で網膜症の病態で本当に機能しているかを必ずチェックしなければならない。先にもふれたが、現時点での網膜虚血に伴う眼内血管新生動物モデルとしては、先にふれた網膜静脈をレーザー照射で閉塞させた網膜静脈閉塞症モデル⁶¹⁾や未熟児網膜症のモデルである出生直後の動物の高酸素暴露モデル⁶²⁾などがある。これらを用いて VEGF の作用をブロックすると眼内血管新生発症が阻止されたことから、その血管新生に VEGF が主たる役割を果たしていることが示された^{86)~88)}。しかし、実用的な増殖糖尿病網膜症モデルを用いた研究により検討された後に、初めて VEGF が臨床的にも増殖糖尿病網膜症の血管新生の主役であるかがわかる。言葉をかえると、VEGF をブロックすれば増殖糖尿病網膜症に伴う血管新生を抑制できるかという問題が解明されて初めて、VEGF の阻害因子が治療薬としての臨床的な検討へと進められると考えられる。これまでに糖

代謝異常の動物モデルとして種々の動物でストレプトゾトシン投与動物, ガラクトース投与動物, 膵臓摘出動物などがある。しかし, このモデルでは血管新生を伴う網膜症を作ることは不可能ではないが難しい⁸⁹⁾。比較的短期間に高率に網膜血管新生を発生する実用的な増殖糖尿病網膜症モデルの開発の必要性はますます高くなっている。

3. 角膜創傷治癒と TGF- β スーパーファミリー

1) 角膜創傷治癒のメカニズム

角膜は眼球の最表層に位置しているため外界に接しており, 常に外傷の危険にさらされている。このため, 眼球の恒常性を維持するためには形成された創傷を速やかに治癒する必要がある^{90)~92)}。この創傷治癒過程は種々の因子により制御されている^{90)~93)}。サイトカイン・増殖因子は其中で重要な働きをしている。ここでは角膜の創傷治癒機構について検討する。

角膜上皮の欠損部の治癒は, その周囲の上皮細胞が遊走, 増殖, 分化を経て欠損部が覆われる⁹⁰⁾⁹²⁾。この過程は極めて多くの因子により制御されている。これまでに角膜上皮の創傷上皮治癒を促進する因子として, EGF, keratinocyte growth factor (KGF), hepatocyte growth factor (HGF) などが報告^{90)~93)}されている。これらは主に角膜上皮細胞の遊走, 増殖などを促進し, 角膜上皮創傷治癒過程を促進する。角膜実質の創傷治癒過程では角膜実質を構成するコラーゲン, プロテオグリカンの合成, 分解が重要であると考えられている⁹⁰⁾。実際には実質の傷害部に周辺の角膜実質細胞が活性化され球形細胞に変化し, III型コラーゲンなどが産生される。その後, 角膜実質細胞が増殖し, 異常な結合組織を産生して欠損部を補うことになる。この過程にも多くの因子が関与していると考えられる⁹⁰⁾。

TGF- β は角膜構成細胞に発現しており^{94)~96)}、涙液にも存在している⁹⁷⁾。その受容体も角膜構成細胞に発現されている²⁵⁾²⁶⁾(図 18 a)。今回, 我々は TGF- β スーパーファミリーの生体内での作用を検討するモデルとして, 角膜上皮および実質の創傷治癒過程での作用について観察した。TGF- β スーパーファミリー(TGF- β 1, β 2, β 3, アクチビン A)およびその受容体(TGF- β I, II 型受容体, アクチビン I, IB, II 型受容体, BMP IA, IB, II 型受容体)の発現を蛋白質レベルで検討した⁹⁸⁾⁹⁹⁾。

2) 角膜上皮創傷治癒メカニズムと TGF- β スーパーファミリー

ルイスラット角膜に n-ヘプタノールを用いて 3 mm 径の上皮剝離を形成し⁹⁸⁾、上皮創傷治癒過程を観察した。創傷作製後 1 日では 1 層の再生上皮が形成されていた。この再生上皮では TGF- β スーパーファミリーの受容体の発現がみられなかった(図 18 b)。2 日後には再生上皮の多層化がみられるようになり, 5 日後以降では形態学的には創傷作製以前の状態に戻った。この過程で TGF- β スーパーファミリーの受容体の発現は回復した(図 18

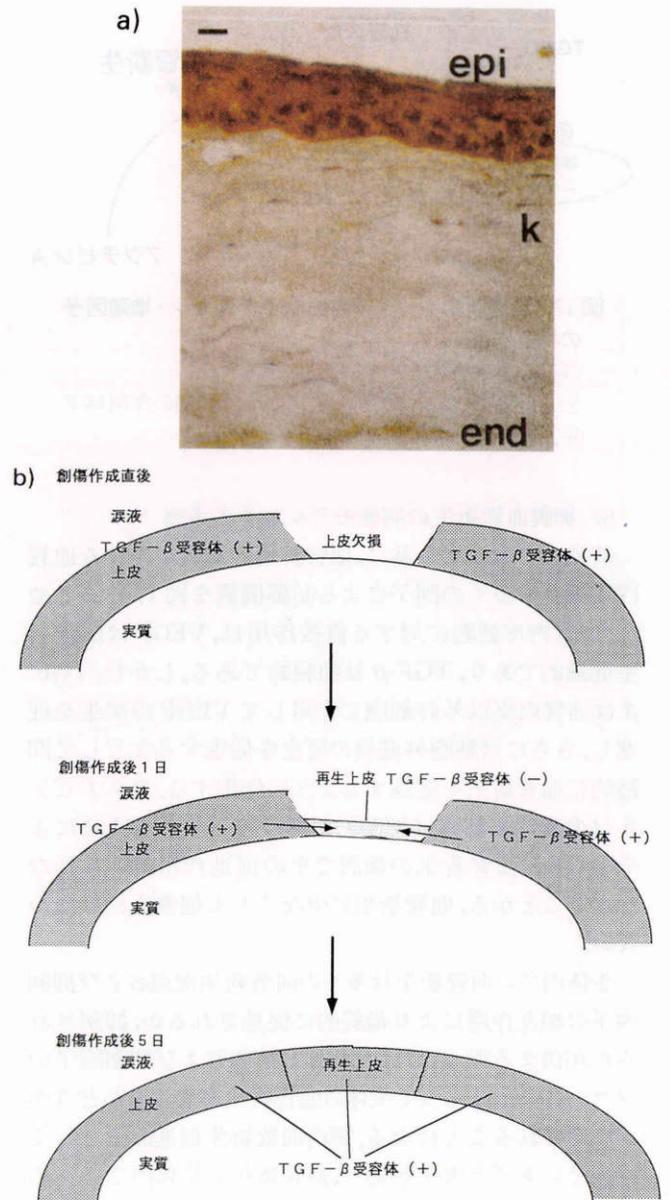


図 18 ラット角膜上皮創傷治癒過程と TGF- β 。

a) ラット角膜における TGF- β I 型受容体の発現。角膜上皮細胞, 実質細胞, 内皮細胞において発現がみられた。免疫組織化学的に観察した。epi: 角膜上皮, k: 角膜実質細胞, end: 角膜内皮細胞, X 400, bar は 10 μ m
b) 創傷作製後 1 日には一層の再生上皮が創傷部を覆った。この再生上皮には TGF- β 1, β 2, β 3, TGF- β I 型および II 型受容体の発現はみられなかった。創傷作製後 5 日には一層の再生上皮が創傷部を覆った。この再生上皮には TGF- β 1, β 2, β 3, TGF- β I 型および II 型受容体の発現の回復がみられた。図には TGF- β 受容体の発現を示したが, TGF- β の発現も受容体発現と平行した。詳細については本文参照。

b). 正常状態での角膜上皮は先に述べたように, TGF- β スーパーファミリーの受容体を発現しており²⁵⁾²⁶⁾、角膜上皮創傷治癒過程で一時的に発現が低下するが, 多層化の過程で発現が回復することは, その過程に重要な働きをしていることが示唆された。そして, TGF- β 以外のア

クチピン, BMP の I, II 型受容体も角膜上皮に発現していることから, これらの因子が角膜上皮恒常性維持に多重に作用していることが示唆された⁹⁸⁾.

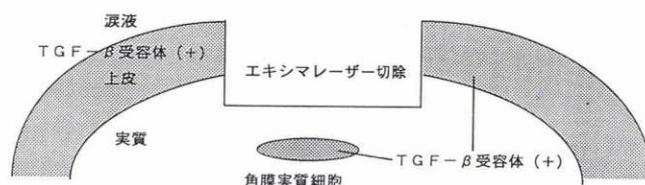
角膜上皮創傷治癒過程での TGF- β の作用としては, 角膜上皮細胞の増殖, 遊走の制御^{100)~103)}, 分化の制御¹⁰²⁾, 細胞-細胞間または細胞基質間の接着制御などが考えられる. EGF による再生上皮の増殖, 遊走促進を TGF- β が抑制するというブレーキとしての作用が報告¹⁰⁰⁾された. 細胞と細胞外基質の接着を司っているのがインテグリンで, 細胞表面に発現している α サブユニットと β サブユニットから成っている¹⁰⁴⁾. 現時点で α サブユニット 16 分子, β サブユニット 8 分子がクローニングされており, $\alpha \cdot \beta$ の組み合わせとして 20 種類の複合体が知られている. インテグリンは角膜上皮にも多くが発現しており, 創傷治癒過程で重要な働きをしていることが示唆されている¹⁰⁵⁾¹⁰⁶⁾. TGF- β 1 はこれらのインテグリンの発現を促進する場合と抑制する場合がある²⁾¹⁰⁷⁾. 細胞や培養条件によって促進, 抑制が異なるので²⁾¹⁰⁷⁾, 角膜上皮細胞で TGF- β によりどのような接着分子が制御されているかはこれからの問題であるが, インテグリンの発現が TGF- β により制御されることが上皮細胞接着機構の生体内での作用である可能性が考えられる.

皮膚の創傷治癒に TGF- β ^{108)~111)}の他にもアクチビン A, B¹¹²⁾, BMP-2¹¹³⁾は関与していることがこれまでに示唆されている. そのメカニズムとしては, 細胞接着の制御, 細胞外基質の産生などであり, 角膜創傷治癒にもこのようなメカニズムが関与していることが示唆される. これまでも述べたように, 角膜上皮創傷治癒過程で TGF- β 以外の TGF- β スーパーファミリーの因子に対する受容体の発現が角膜上皮細胞にみられたことから, 皮膚同様に TGF- β 以外の因子の関与が考えられる.

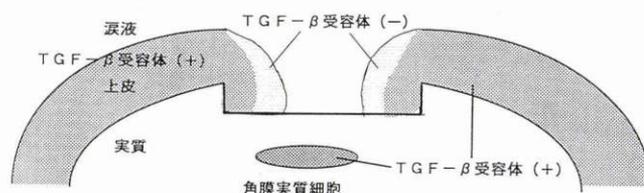
3) 角膜実質創傷治癒メカニズムと TGF- β ファミリー

角膜実質の創傷治癒としては, 外傷, 感染症などの他に最近では屈折矯正手術での回復過程が問題となっている. 屈折矯正手術は放射状角膜切開とエキシマレーザーを用いたエキシマレーザー角膜切除 (photorefractive keratectomy, PRK) が日本でも慎重に臨床的な検討が行われている. 本研究では PRK の創傷治癒過程と TGF- β の関連について検討した. PRK で臨床的に問題となるのが創傷治癒過程でみられる上皮下混濁 (corneal haze) と再近視化である. これらは上皮下に形成される異常な結合組織形成や, その収縮などによる. TGF- β は線維芽細胞の遊走促進, 増殖の制御 (条件によっては増殖を促進する), 細胞外基質蓄積促進, 結合組織の収縮などの作用を持ち, 皮膚の創傷治癒に関与することが知られている²⁾¹¹⁰⁾¹¹¹⁾¹¹⁴⁾¹¹⁵⁾. そして, 角膜創傷治癒過程で EGF, FGF などとともに TGF- β が発現し関与している可能性が報告⁹³⁾⁹⁶⁾¹¹⁶⁾¹¹⁷⁾されている.

1) エキシマレーザー角膜切除直後



2) 切除後1日



3) 切除後5日

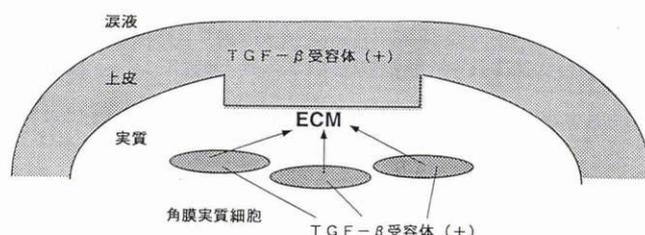


図19 ラット角膜におけるエキシマレーザー角膜切除後の創傷治癒過程と TGF- β .

創傷治癒の過程の詳細については本文参照.

ECM: 細胞外基質.

ラットにエキシマレーザー角膜切除を施行し, その創傷治癒過程を組織学的に観察した⁹⁹⁾. ルイスラット角膜に対して COMPAK 200 エキシマレーザー (LASER SIGHT Technology, Florida, 米国) を用いて, 角膜を 3 mm 径で 90 μ m の深さで切除した. 切除後 1 日では創傷部は再生上皮で覆われておらず, 2 日後には再生上皮が覆った. 上皮下に切除後 2~10 日に実質細胞細胞増殖がみられた. 切除後 5~10 日では実質細胞細胞増殖の周囲の実質に細胞外基質として, フィブロネクチン, ラミニンの発現上昇がみられた. 切除後 30 日で実質細胞細胞密度は正常へと回復した. 切除後 1 日で再生角膜上皮先端部の TGF- β I 型受容体および II 型受容体の発現がみられなくなったが, 2 日後に創傷部を覆った再生上皮では発現がみられた (図 19). 切除後 2~10 日にみられた増殖した実質細胞は, TGF- β I 型受容体および II 型受容体を発現していた (図 19). TGF- β は上皮および実質細胞で発現していた. 角膜上皮治癒過程で創傷部を再生上皮が覆うまでは TGF- β 受容体の発現が低下したことは再生上皮の遊走, 増殖に TGF- β の寄与が少ないことが示された. 実質細胞には TGF- β 受容体が発現しており, 上皮お

よび実質細胞に TGF- β の発現もみられたことから、細胞外基質の産生は TGF- β によるのではないかと考えられる。TGF- β の作用を生体内で検証するために上記のモデルに TGF- β に対する中和抗体を腹腔内投与し (50 μ g/日を術直後から 5 日間), 投与終了直後に組織学的に観察したところ, 角膜実質の細胞増殖が抑制された結果もこれを支持する⁹⁹⁾。

ネコ眼角膜のエキシマレーザー角膜切除をエキシマレーザー装置 EC 5000 (NIDEK) を用いて行ったモデルでの観察でも, 角膜実質切除部位に III, IV 型コラーゲン, ラミニンの発現が増加し, 上皮下に増殖した実質細胞に TGF- β 受容体および TGF- β の発現が増加していた。アクチビン受容体, BMP 受容体の発現は変化しなかった¹¹⁸⁾。この実験からも角膜切除部位の実質細胞の活性化, 細胞外基質産生促進に TGF- β が重要な働きをしていると考えられた。

4. 今後の課題

以上, 本研究では角膜創傷治癒過程を生体モデルを用いて, 組織化学的手法を用いて機能分子としての TGF- β スーパーファミリーの役割について検討した。創傷治癒過程に関わる角膜上皮細胞, 活性化実質細胞に TGF- β スーパーファミリーの受容体が発現されており, そのリガンドとなる因子も涙液に存在し, 角膜構成細胞から産生されている^{25)26)94)~97)}。TGF- β の働きについては, 生体モデルでの作用阻害実験からみて実質創傷治癒過程で実質細胞の反応に重大な影響を与えていることが示唆された。今後, 培養角膜上皮細胞や角膜実質由来の培養ケラトサイトを用いた研究によって, *in vitro* のレベルでの TGF- β の機能を分子レベルで研究することが必要である^{100)~103)}。TGF- β スーパーファミリーのうち, TGF- β 以外の因子も角膜上皮創傷治癒に関与していることがアクチビン, BMP に対する受容体の発現パターンから示唆される²⁵⁾²⁶⁾⁹⁸⁾。現時点では詳細は不明であるが, アクチビンの上皮の分化への関与の可能性¹¹²⁾, BMP の上皮-実質の形態形成に関与している可能性¹¹⁹⁾が考えられる。さらに, 血管新生の項でも述べたのと同様に, 角膜創傷治癒過程でも多くのサイトカイン・増殖因子が相互に影響し合ってネットワークを形成している可能性が考えられる⁹²⁾⁹⁶⁾¹⁰⁰⁾¹²⁰⁾。このネットワークに TGF- β スーパーファミリーがどのような役割をしているかを解明していくことも, これからの重要な課題である。

創傷治癒過程については, 上皮のみが切除された場合の創傷治癒過程と異なり, エキシマレーザー角膜切除後の治癒過程は上皮および実質の双方の治癒過程が平行して進行し, お互いに影響し合うことが考えられる。角膜実質細胞は上皮が欠損した状態では活性化したままとなり, 異常な結合組織の形成またはコラゲナーゼ活性化による実質の破壊が起こり得る⁹⁰⁾¹²¹⁾。創傷治癒過程での上皮組織欠損が起きないようにした *laser in situ kerato-*

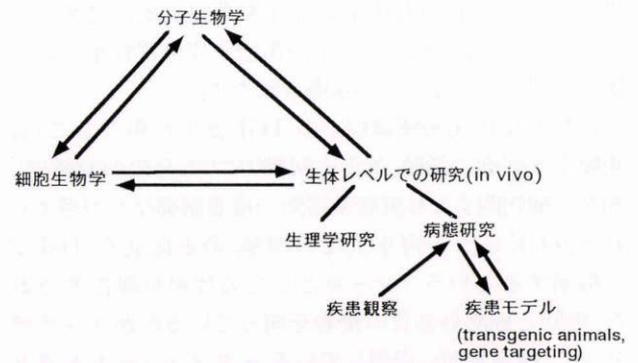


図20 眼における分子細胞生物学的研究のストラテジー。

mileusis (LASIK) 法を用いると角膜混濁発生を抑制する。このことは, 実質の創傷治癒過程は上皮が存在するときにはない場合と異なっていることが考えられる。そのメカニズムおよび TGF- β スーパーファミリーの役割の研究も今後の課題である。

V これからの細胞生物学

TGF- β スーパーファミリーを軸に細胞生物学的な手法を用いた眼研究を今回の発表では紹介した。最初にも述べたように, 我々臨床家の最終目的は疾患の治療法を見つけて出すことである。生命現象のメカニズムの解明とは, 生理的な状態とその破綻である病態の解明を意味する。今回紹介したように, その研究のストラテジーとしては図20に示すように, 分子生物学, 細胞生物学, 生体レベルでの検討の少なくとも3つの研究が不可欠である。現代の生命科学では分子生物学は細胞生物学と切っても切れないように結びついており, 必然的にこの両者は一緒に研究することになる。さらに, 生体レベルへと研究を進めるには2つのルートが考えられる。

一つは, 今回の研究で紹介した血管新生のメカニズムの研究のように病態を構成する細胞を培養して, その性質, 各種の制御物質の作用を詳細に積み上げていく方法である。これは時として不必要な情報を取り入れたり, 各因子の重要度が判断できなかつたりという欠点はあるが, 病態を分子レベルで理解するためには是非必要なものである。今後のこのルートの課題は, 細胞内シグナル伝達経路をなるべく多くの因子について解明して, それぞれの相互作用, クロストークを分子レベルで理解し, かつ予測できるようにすることである。これは, いうのは簡単であるが, 実行するのは極めて難しい。ショウジョウバエ (*fruit fly*) の EGF 受容体機能制御には 50 の経路があることが推測¹²²⁾された。おそらく, これはますます増えてくるであろう。同様のことが各サイトカイン・増殖因子にも当てはまることが示唆されるから, 細胞生物学を単純に積み重ねて行くだけでは目的に到達しない。生体全体を視野に入れた研究法が必要であるのはこのような理

由による。これが第二に考えられる研究法である。今回の研究で角膜上皮創傷治癒に用いた方法がそれである。すなわち、生体モデルである因子のみをブロックするとどうなるかを観察するものである。さらに、今日ではある遺伝子を生体全体または限られた局所で発現を制御する発生物学的な方法(トランスジェニックアニマル, ジーンターゲティング)が利用できる。この方法も生体レベルでの研究であるから、種々の因子が存在している状態である因子のみを動かしている。生体ではある因子がなくなると、当然他の因子が作用を補うことがあり得るので、本当にねらった因子のみが動いているという保証はない。しかし、生体で検討できること、本当にねらった因子は確実に動かし得ることなどから、現時点で最も有力な研究法であることは間違いがない。そして、細胞生物学的な研究と併せて行うことにより、より有益な情報が得られることとなる。

最終的には如何に基礎研究が進んでも、臨床医学の目的はヒトにおける病気を理解し治療することである以上、実際の病気をつぶさにみることに、そこからできるだけ多くの情報を得ることが臨床医学にとって最終的に最も大切なことであることには変わりがない。ここがぐらついては如何に沢山モデルを作ってもどれが本物かを判定できないということが起きかねない。臨床医学について、ヒポクラテス以来先人達のいい古した言葉である“患者さんから学ぶ大切さ”が今回の研究からも改めて浮き彫りにされたと考えている。

稿を終えるに当たり、宿題報告の機会を与えて下さいました日本眼科学会評議員各位、日本眼科学会会員各位ならびに、第101回日本眼科学会総会長宇山昌延教授(関西医科大学)、座長の労をお取りいただいた玉井 信教授(東北大学)に心から感謝申し上げます。本研究はこれまで御指導いただいた三島濟一名誉教授(東京大学)、増田寛次郎名誉教授(東京大学)、新家 眞教授(東京大学)の貴重な御助言、御指導とお励みによるものここに厚くお礼申し上げます。また、本研究において福田雅俊名誉教授(琉球大学)、三嶋 弘教授(広島大学)には貴重な御助言をいただきましたことを厚くお礼申し上げます。

本研究は文部省科学研究費補助金、財団法人三共生命科学振興財団の研究助成を受けたことを付記して謝意を表します。

文 献

- 1) 宮園浩平: 細胞増殖因子のバイオロジー. 羊土社, 東京, 11—31, 1992.
- 2) Miyazono K, ten Dijke P, Ichijo H, Heldin C-H: Receptors for transforming growth factor- β . *Adv Immunol* 55: 181—220, 1994.
- 3) 山下英俊, 宮園浩平: TGF- β スーパーファミリーの分子生物学. 羊土社, 東京, 11—65, 1994.
- 4) Miyazono K: TGF- β receptors and signal transduction. In: Ikehara S, et al (Eds): *Bone Marrow Transplantation-Basic and Clinical Studies*. Sprin-

- ger Verlag, Tokyo, 124—133, 1996.
- 5) Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al: Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multiple inflammatory disease. *Nature* 359: 693—699, 1992.
- 6) Kukkarni AB, Huh C, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, et al: Transforming growth factor- β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 770—774, 1993.
- 7) Sanford LP, Ormsby I, Giffenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, et al: TGF- β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF- β knockout phenotypes. *Development* 124: 2659—2670, 1997.
- 8) Kaartinen V, Vocken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, et al: Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nature Gen* 11: 415—421, 1995.
- 9) Vale W, Hsueh A, Rivier C, Yu J: The inhibin/activin family of hormones and growth factors. In: *Peptide Growth Factors and Their Receptors: Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 95, ed by Spon MA, Roberts AB (Berlin: Springer-Verlag). 211—248, 1990.
- 10) Mathews LS: Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family. *Endocr Rev* 15: 310—325, 1994.
- 11) Yamashita H, ten Dijke P, Heldin C-H, Miyazono K: Bone morphogenetic protein receptors. *Bone* 19: 569—674, 1996.
- 12) McMarthy SA, Bicknell R: Inhibition of vascular endothelial cell growth by activin-A. *J Biol Chem* 268: 23066—23071, 1993.
- 13) Franzén P, ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz P, Heldin C-H, et al: Cloning of a TGF β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF β type II receptor. *Cell* 75: 681—692, 1993.
- 14) ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzén P, Laiho M, Miyazono K, et al: Characterization of type I receptors for transforming growth factor- β and activin. *Science* 264: 101—104, 1994.
- 15) Ryden M, Imamura T, Jornvall H, Beluardo N, Neveu I, Trupp M, et al: A novel type I receptor serine-threonine kinase predominantly expressed in the adult central nervous system. *J Biol Chem* 271: 30603—30609, 1996.
- 16) Attisano L, Wrana JL: Signal transduction by members of the transforming growth factor- β superfamily. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 7: 327—339, 1996.
- 17) Cárcamo J, Weis FMB, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, et al: Type I receptors specify growth inhibitory and transcriptional

- responses to TGF- β activin. *Mol Cell Biol* 14: 3810—3821, 1994.
- 18) Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, et al: Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptor and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* 130: 217—226, 1995.
 - 19) Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J: Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370: 341—347, 1994.
 - 20) Okadome T, Yamashita H, Franzén P, Morén A, Heldin C-H, Miyazono K: Distinct roles of the intracellular domains of transforming growth factor- β type I and type II receptors in signal transduction. *J Biol Chem* 269: 30753—30756, 1994.
 - 21) Massagué J, Hata A, Liu F: TGF β signaling through the Smad pathway. *Trends Cell Biology* 7: 187—192, 1997.
 - 22) Mitsuhiro MRKH, Ishida K, Yamada H, Eguchi S, Kato M, Yamashita H: Regulation of retinal pigment epithelial (RPE) cell function by TGF- β superfamily. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(Suppl): S1130, 1997.
 - 23) Chen X, Rubock MJ, Whitman M: A transcriptional partner for MAD proteins in TGF- β signalling. *Nature* 383: 691—696, 1996.
 - 24) Suzuki M, Asplund T, Yamashita H, Heldin C-H, Heldin P: Stimulation of hyaluronan biosynthesis by platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor- β 1 involves activation of protein kinase C. *Biochem J* 307: 817—821, 1995.
 - 25) Obata H, Kaburaki T, Kato M, Yamashita H: Expression of TGF- β type I and type II receptors in rat eyes. *Curr Eye Res* 15: 335—340, 1996.
 - 26) Obata H, Kaji Y, Kaburagi T, Tsuru T, Kato M, Miyazono K, et al: Expression of transforming growth factor β (TGF- β) type I receptor family in ocular tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (Suppl): S862, 1996.
 - 27) Liu F, Ventura F, Doody J, Massagué J: Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): Extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 15: 3479—3486, 1995.
 - 28) Rozenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten Dijke P, et al: Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7632—7636, 1995.
 - 29) 山田秀之, 小幡博人, 加治優一, 三田知直, 加藤光保, 山下英俊: ラット網膜の発生における TGF- β スーパーファミリー受容体の発現. *日眼会誌* 101(講演抄録集): 120, 1997.
 - 30) Alexiades MR, Cepko CL: Subsets of retinal progenitors display temporally regulated and distinct biases in the fates of their progeny. *Development* 124: 1119—1131, 1997.
 - 31) Fulton AB, Hansen RM, Findl O: The development of the rod photoresponse from dark-adapted rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1038—1045, 1995.
 - 32) Dodge J, Fulton AB, Parker C, Hansen RM, Williams TP: Rhodopsin in immature rod outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 1951—1956, 1996.
 - 33) Schubert D, Kimura H, LaCorbiere M, Vaughan J, Karr D, Fischer WH: Activin is a nerve cell survival molecule. *Nature* 344: 868—870, 1990.
 - 34) Darland DC, Link BA, Nishi R: Activin A and follistatin expression in developing targets of ciliary ganglion neurons suggests a role in regulating neurotransmitter phenotype. *Neuron* 15: 857—866, 1995.
 - 35) Graham A, Francis-West P, Brickell P, Lumsden A: The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature* 372: 684—686, 1994.
 - 36) Lein P, Johnson M, Guo X, Rueger D, Higgins D: Osteogenic protein-1 induces dendritic growth in rat sympathetic neurons. *Neuron* 15: 597—605, 1995.
 - 37) Rissi M, Wittbrodt J, Délot E, Naegeli M, Rosa FM: Zebrafish *Radar*: A new member of the TGF- β superfamily defines dorsal regions of the neural plate and the embryonic retina. *Mech Dev* 49: 223—234, 1995.
 - 38) Pittack C, Grunwald GB, Reh TA: Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryo. *Development* 124: 805—816, 1997.
 - 39) 福田雅俊: 内科医のための糖尿病網膜症眼底図譜分類. 三輪書店, 東京, 1—50, 1997.
 - 40) 中江公裕, 小暮文雄, 長屋幸郎, 三島濟一: わが国における視覚障害の現況. *厚生*の指標 38: 13—22, 1991.
 - 41) 赤澤好温: 糖尿病の疫学に関する研究. 平成6年度糖尿病調査研究報告, 3—9, 1994.
 - 42) 山下英俊: 糖尿病網膜症と増殖因子・サイトカイン. *内分泌・糖尿病科* 3: 407—414, 1996.
 - 43) Michaelson IC: The mode of development of the vascular system in the retina: With some observations on its significance for certain retinal diseases. *Trans Ophthalmol Soc UK* 68: 137—180, 1948.
 - 44) Ashton N, Ward B, Serpell G: Effects of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol* 38: 397—431, 1954.
 - 45) 国定勝郎, 山下英俊, 船津英陽, 白矢勝一: 糖尿病性網膜症における血管新生の統計学的研究. *臨眼* 44: 1294—1295, 1990.
 - 46) Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al: Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal diseases. *N*

- Engl J Med 331: 1480-1487, 1994.
- 47) 田中義和, 加藤 聡, 船津英陽, 北野滋彦, 堀 貞夫, 三浦雅一, 他: 糖尿病患者における血管内皮増殖因子(VEGF)と網膜症進行との関連, 眼紀 48: 46-50, 1997.
- 48) Tanaka Y, Katoh S, Hori S, Miura M, Yamashita H: Vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. Lancet 349: 1520, 1997.
- 49) Hirase K, Sotozono C, Ikeda T, Nishida K, Sawa H, Maeda K, et al: TGF- β 2 in the vitreous in proliferative diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 37 (Suppl): S788, 1996.
- 50) 山本禎子, 田中住美, 加藤秋成, 加藤光保, 菊池方利, 山下英俊: 網膜前形成における TGF- β スーパーファミリーの関与, 第 50 回日本臨床眼科学会講演抄録集, 273, 1996.
- 51) Anderson DH, Guerin CJ, Hageman GS, Pfeffer BA, Flanders KC: Distribution of transforming growth factor- β isoforms in the mammalian retina. J Neurosci Res 42: 63-79, 1995.
- 52) Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR, et al: The serum concentration of active transforming growth factor- β is severely depressed in advanced atherosclerosis. Nature Med 1: 74-79, 1995.
- 53) Ivanovic V, Mesman A, Davis-Joseph B, Valcic M, Geliebter J: Elevated plasma levels of TGF- β 1 in patients with invasive prostate cancer. Nature Med 1: 282-284, 1995.
- 54) 及川眞一: 眼房水の TGF- β 2 と血管内皮細胞増殖抑制作用, および糖尿病性網膜症とアポ蛋白 E 表現型との関係に関する研究, 平成 6 年度糖尿病調査研究報告, 366-368, 1994.
- 55) Frank RN: Vascular endothelial growth factor-Its role in retinal vascular proliferation. New Eng J Med 331: 1519-1520, 1994.
- 56) Battegay EJ: Angiogenesis: Mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. J Mol Med 73: 333-346, 1995.
- 57) Sharp PS: The role of growth factors in the development of diabetic retinopathy. Metabolism 44 (Suppl 4): 72-75, 1995.
- 58) Serri O, Renier G: Intervention in diabetic vascular disease by modulation of growth factors. Metabolism (Suppl 4): 83-90, 1995.
- 59) Klagsbrun M, D'Amore PA: Vascular endothelial growth factor and its receptors. Cytokine & Growth Factor Reviews 7: 259-270, 1996.
- 60) Elnor SG, Elnor VM, Jaffe GJ, Stuart A, Kunkel SL, Stietter RM: Cytokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. Curr Eye Res 14: 1045-1053, 1995.
- 61) Miller JW, Adamis AP, Shima DT, D'Amore PA, Moulton RS, O'Reilly MS, et al: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. Am J Pathol 145: 547-584, 1994.
- 62) Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LH: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. Proc Natl Acad Sci USA 92: 905-909, 1995.
- 63) Smith LEH, Kopchick JJ, Chen W, Knapp J, Kinose F, Daley D, et al: Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. Science 276: 1706-1709, 1997.
- 64) Jennings JC, Mohan S, Linkhart TA, Widstrom R, Baylink DJ: Comparison of the biological actions of TGF-beta 1 and TGF-beta 2: Differential activity in endothelial cells. J Cell Physiol 137: 167-172, 1988.
- 65) Risau W: Angiogenic growth factors. Prog Growth factor Res 2: 71-79, 1990.
- 66) Yamashita H, Shimizu A, Kato M, Nishitoh H, Ichijo H, Hanyu A, et al: Growth/differentiation factor-5 induces angiogenesis *in vivo*. Exp Cell Res 235: 218-226, 1997.
- 67) Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith DM, Roche NS, Wakefield LM, et al: Transforming growth factor type β : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA 83: 4167-4171, 1986.
- 68) Yang EY, Moses HL: Transforming growth factor β 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. J Cell Biol 111: 731-741, 1990.
- 69) Brooks PC, Clark RAF, Cheresh DA: Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. Science 264: 569-571, 1994.
- 70) Folkman J: How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? Cancer Res 46: 467-473, 1986.
- 71) D'Amore PA, Thompson RW: Mechanisms of angiogenesis. Annu Rev Physiol 49: 453-464, 1987.
- 72) Kanda S, Landren E, Ljungstrom M, Claesson-Welsh L: Fibroblast growth factor receptor 1-induced differentiation of endothelial cell line established from tsA58 large T transgenic mice. Cell Growth Diff 7: 383-395, 1996.
- 73) Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin C-H: Differential signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. J Biol Chem 269: 26988-26995, 1994.
- 74) Pertovaara L, Kaipainen A, Musonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksera O, et al: Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- β in fibroblastic and epithelial cells. J Biol Chem 269: 6271-6274, 1994.
- 75) 山下英俊: 細小血管症-網膜症の成因一. Complication 2: 69-80, 1997.

- 76) **Kitano S, Hori S, Yamashita H, Yamashita T, Miura M**: Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- β in cultured Müller cell. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (Suppl): S793, 1996.
- 77) **West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S**: Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 228: 1324-1326, 1985.
- 78) **Hanahan D, Folkman J**: Pattern and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364, 1996.
- 79) 佐藤靖史: C-X-C ケモカインファミリーとアンジオスタチン-血管新生の負の調節因子-細胞工学 16: 972-977, 1997.
- 80) 湯沢美都子: 血管新生黄斑症. A. 老人性円板状黄斑変性症. 増田寛次郎, 他(編): 眼科学大系 5 A (網膜・硝子体), 中山書店, 東京, 281-293, 1994.
- 81) **Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al**: Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the Tie receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87: 1161-1169, 1996.
- 82) **Folkman J, D'Amore PA**: Blood vessel formation: What is its molecular basis? *Cell* 87: 1153-1155, 1996.
- 83) **Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, van Vlaenderen I, et al**: Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 383: 73-75, 1996.
- 84) **Risau W**: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 383: 671-674, 1997.
- 85) **Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karsson S, Akhurst RJ**: Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor- β 1 knock out mice. *Development* 121: 1845-1854, 1995.
- 86) **Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, et al**: Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10457-10461, 1995.
- 87) **Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, Gragoudas ES, Ferrara N, Folkman J, et al**: Inhibition of VEGF prevents ocular neovascularization in a primate. *Arch Ophthalmol* 114: 66-71, 1996.
- 88) **Robinson GS, Pierce EA, Rook SL, Foley E, Webb R, Smith LEH**: Oligonucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4851-4856, 1996.
- 89) **Hatchell DL, Toth CA, Barden CA, Saloupsis P**: Diabetic retinopathy in a cat. *Exp Eye Res* 60: 591-593, 1995.
- 90) 西田輝夫: 創傷治癒. 増田寛次郎, 他(編): 眼科学大系 2 A (結膜・角膜・涙), 中山書店, 東京, 53-62, 1993.
- 91) 小幡博人, 宮田和典: 角膜の創傷治癒. *Biomedical Perspectives* 2: 81-92, 1995.
- 92) 木下 茂: 角結膜上皮: 創傷と修復. *眼紀* 47: 761-769, 1996.
- 93) **Schultz G, Khaw PT, Oxford K, MacCauley S, van Setten G, Chegini S**: Growth factors and ocular wound healing. *Eye* 8: 184-187, 1994.
- 94) **Wilson SE, Lloyd SA, He Y-G**: EGF, basic FGF, and TGF beta-1 messenger RNA production in rabbit corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 1987-1995, 1992.
- 95) **Nishida K, Kinoshita S, Yokoi N, Kaneda M, Hashimoto K, Yamamoto S**: Immunohistochemical localization of transforming growth factor- β 1, - β 2, - β 3 latency-associated peptide in human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3289-3294, 1994.
- 96) **Li D-Q, Tseng SCG**: Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial fibroblast interactions of human ocular surface. *J Cell Physiol* 163: 61-79, 1995.
- 97) **Kokawa N, Sotozono C, Nishida K, Kinoshita S**: High total TGF- β 2 levels in normal human tears. *Curr Eye Res* 15: 341-434, 1996.
- 98) **Kaji Y, Obata H, Tsuru T, Kato M, Miyazono K, Yamashita H**: Changes of expression of transforming growth factor- β receptors in wound healing of rat corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (Suppl): S862, 1996.
- 99) 三田知直, 加治優一, 山下英俊: エキシマレーザー照射後ラット角膜創傷治癒過程における transforming growth factor- β (TGF- β) の作用. 東邦医学会誌 (投稿中).
- 100) **Mishima H, Nakamura M, Murakami J, Nishida T, Otori T**: Transforming growth factor- β modulated effects of epidermal growth factor on corneal epithelial cells. *Curr Eye Res* 11: 691-696, 1992.
- 101) **Grant MB, Khaw PT, Schultz GS, Adams JL, Shimizu RW**: Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor- β on corneal cell chemotaxis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 3292-3301, 1992.
- 102) **Kruse FE, Tseng SCG**: Growth factors modulate clonal growth and differentiation of cultured rabbit limbal and corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 1963-1976, 1993.
- 103) 西田幸二, 大橋裕一, 根津永津, 山本修士, 木下 茂, 藤田和彦: Transforming growth factor- β による器官培養角膜上皮の創傷治癒遅延に関する研究. *日眼会誌* 97: 899-905, 1993.
- 104) 松浦成昭, 高田義一, 辻 勉, 竹内研一, 田下栄子, 山田 亮, 他: インテグリンファミリー. 宮坂昌之(監修): 接着分子ハンドブック. 秀潤社, 東京, 10-83, 1994.
- 105) **Grushkin-Lerner LS, Trinkaus-Randall V**: Localization of integrin and syndecan *in vivo* in a corneal epithelial abrasion and keratectomy. *Curr Eye Res* 10: 75-85, 1991.

- 106) **Watt FM**: Studies with cultured human epidermal keratinocytes: Potential relevance to corneal wound healing. *Eye* 8: 161–162, 1994.
- 107) **Heino J, Massagué J**: Transforming growth factor- β switches the pattern of integrins expressed in MG-63 human osteosarcoma cells and causes a selective loss of cell adhesion to laminin. *J Biol Chem* 264: 21806–21811, 1989.
- 108) **Schmid P, Cox D, Bilbe G, McMaster G, Morrison C, Stahelin H, et al**: TGF- β s and TGF- β type II receptor in human epidermis: Differential expression in acute and chronic skin wounds. *J Pathol* 171: 191–197, 1993.
- 109) **Shan M, Foreman DM, Ferguson MWJ**: Neutralisation of TGF- β 1 and TGF- β 2 or exogenous addition of TGF- β 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* 108: 985–992, 1995.
- 110) **Frank S, Madlener M, Werner S**: Transforming growth factors β 1, β 2, and β 3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 271: 10188–10193, 1996.
- 111) **Wang X-J, Greenhalgh DA, Bickenbach JR, Jiang A, Bundman DS, Krieg T, et al**: Expression of a dominant-negative type II transforming growth factor- β (TGF- β) receptor in the epidermis of transgenic mice blocks TGF- β -mediated growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2386–2391, 1997.
- 112) **Hubner G, Hu Q, Smola H, Werner S**: Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair. *Dev Bio* 173: 490–498, 1996.
- 113) **Nissinen L, Pirila L, Heino J**: Bone morphogenetic protein-2 is a regulator of cell adhesion. *Exp Cell Res* 230: 377–385, 1997.
- 114) **Riikonen T, Koivisto L, Vihinen P, Heino J**: Transforming growth factor- β regulates collagen gel contraction by increasing α 2 β 1 integrin expression in osteogenic cells. *J Biol Chem* 270: 376–382, 1995.
- 115) **Martin P**: Wound healing-Aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276: 75–81, 1997.
- 116) **Gibson MB, Inatomi T**: Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 6: 3–10, 1995.
- 117) **Vesaluoma M, Teppo A-M, Gronhagen-Riska C, Tervo T**: Release of TGF- β 1 and VEGF in tears following photorefractive keratectomy. *Curr Eye Res* 16: 19–25, 1996.
- 118) 加治優一, 山田秀之, 小幡博人, 三田知直, 征矢耕一, 白澤栄一, 他: エキシマレーザー照射後の角膜実質創傷治癒過程における TGF- β スーパーファミリーの役割. *日眼会誌* 101(講演抄録集): 155, 1997.
- 119) **Hogan BLM**: Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10: 1580–1594, 1996.
- 120) **Li D-Q, Tseng SCG**: Differential regulation of cytokine and receptor transcript expression in human corneal and limbal fibroblasts by epidermal growth factor, transforming growth factor- α , platelet-derived growth factor B, and interleukin-1 β . *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 2068–2080, 1996.
- 121) **Amm M, Wetzel W, Winter M, Uthofi D, Duncker GI**: Histopathological comparison of photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis in rabbits. *J Refract Surg* 12: 758–766, 1996.
- 122) **Perrimon N, Perkins LA**: There must be 50 ways to rule the signal: The case of Drosophila EGF receptor. *Cell* 89: 13–16, 1997.