

第 109 回 日本眼科学会総会 特別講演 I

細胞増殖調節機構の解明と治療への応用

大西 克尚, 雑賀司珠也, 山中 修, 岡田 由香, 白井 久美
宮本 武, 西川 為久, 田中 剛, 宮崎 賢一

和歌山県立医科大学医学部眼科学教室

共同研究者

近江 俊作, 橋爪奈津子, 田中 才一, 大川記羊美, 加藤 格, ワリド・バルブール, 荒井 真由
崎 充生, 井上貴久彦, 芦田 淳, 小田 盛司, 宇野 智美, 友寄 勝夫, 石川 伸之
洪 成勲, 小門 正英, 住岡 孝吉, 藤田 識人, 北野 愛, 藤田 恭子, 藤田 周子

和歌山県立医科大学医学部眼科学教室

要 約

眼部の腫瘍性疾患と手術や外傷後の組織の修復過程での細胞増殖と関連した細胞の挙動を研究した結果と、それに基づいた新しい治療方法を探索した。細胞増殖因子のシグナル伝達に注目した。眼腫瘍では組織病理学的に類似している場合でも、細胞増殖に関するシグナルの状態は異なり、細胞増殖に関するシグナルの亢進は腫瘍の悪性度を示唆すると考えられた。細胞増殖に関するシグナルの制御によって、実験的眼瞼腫瘍の治療が可能であると考えられた。創傷治癒過程の異常による眼手術後の合併症は、細胞の増殖、細胞外マトリックスの過

剰沈着と細胞表現形の変化、すなわち上皮間葉系移行によることを明らかにした。この合併症の予防と治療に遺伝子導入の技術を利用したシグナル伝達の制御が有用であると考えられた。(日眼会誌 109 : 865-884, 2005)

キーワード：細胞増殖, 増殖因子, 悪性腫瘍, 上皮間葉系移行, 形質転換成長因子ベータ, アクチベータプロテイン-1, ソニックヘッジホッグ, Smad シグナリング

A Review

Investigation of Mechanism of Cell Proliferation Regulation and its Clinical Application

Yoshitaka Ohnishi, Shizuya Saika, Osamu Yamanaka, Yuka Okada, Kumi Shirai
Takeshi Miyamoto, Iku Nishikawa, Takeshi Tanaka and Kenichi Miyazaki

Department of Ophthalmology, Wakayama Medical University

Abstract

Cell proliferation and related cellular behavior in ocular neoplastic disease and in the healing process in ocular surgery or post-injury management, as well as new treatment strategy were investigated. The roles of growth factors and their signal transduction pathways were studied. Cell proliferation-related signals were found to be activated to a greater extent in malignant ocular tumors than in

benign tumor cells regardless of the similarity of simple histological findings. Suppression of cell proliferation-related signals can be a new treatment for ocular neoplastic diseases. The causes of complications associated with tissue repair response include acceleration of cell proliferation and extracellular matrix expression and cellular phenotypic alteration, *i. e.*, epithelial-mesenchymal transition.

別刷請求先：641-0012 和歌山市紀三井寺 811-1 和歌山県立医科大学医学部眼科学教室 大西 克尚
(平成 17 年 8 月 8 日受付, 平成 17 年 9 月 9 日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshitaka Ohnishi, M. D. Department of Ophthalmology, Wakayama Medical University,
811-1 Kimiidera, Wakayama 641-0012, Japan

(Received August 8, 2005 and accepted in revised form September 9, 2005)

These cellular activities can be controlled by modulation of growth factor signaling by employing such strategy including gene introduction.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi(J Jpn Ophthalmol Soc 109 : 865—884, 2005)

Key words : Cell proliferation, Growth factor, Malignant tumor, Epithelial-mesenchymal transition, Transforming growth factor β , Activator protein 1, Sonic hedgehog, Smad signalling

I 緒 言

腫瘍は良性、悪性を問わず細胞の増殖制御機構からの逸脱によって、無秩序な増殖を来したことで発症する疾患である¹⁾。眼腫瘍に限らず組織病理学的に同一の診断の眼腫瘍であっても、個々の腫瘍細胞は症例ごとに様々な細胞増殖形態をとる。本総説では、まず眼の腫瘍細胞で細胞増殖の制御メカニズムを各種の増殖因子と、それらの因子由来のシグナル伝達に焦点を当てて、良性、悪性の差異との関連から研究した結果を記載する。次いで、眼腫瘍でのこれらの結果を踏まえて角結膜、水晶体、網膜の創傷治癒過程での細胞増殖促進、抑制に関与する各種の増殖因子と、それらの因子由来のシグナル伝達の研究を述べる。最後に各種のノックアウトマウスを用いたシグナルの役割に関する検討と、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療や各種のシグナル阻害物質の眼腫瘍と、眼手術や外傷後の創傷治癒の異常による合併症や疾患の治療への応用の可能性についての著者らの研究結果を記載する。

増殖因子とは、細胞が分泌する細胞増殖を制御する物質の総称である。インターロイキンやインターフェロン、コロニー刺激因子などのサイトカインも細胞増殖に働くが、これらは主に血球・リンパ球の増殖と分化に関わる成分であり、増殖因子を含めてサイトカインと呼ばれている。一般に細胞は増殖因子などの液性因子であるサイトカインや細胞接着分子などからの刺激を受けると、その受容体からシグナル伝達物質を介し細胞核にシグナルが伝わり²⁾、増殖、遊走あるいは細胞外マトリックスなどの蛋白質を分泌する。創傷治癒過程では増殖因子の刺激により細胞の増殖、遊走、細胞外マトリックスの沈着は生じるものの、正常または正常に近い状態の組織が再構築されるように制御されている。一方、細胞外マトリックスとインテグリンの結合も単なる細胞接着や足場形成といった機能のみならず、インテグリンを介したシグナルが能動的に核に伝えられている³⁾。腫瘍形成においては同じように増殖因子の刺激が生じるが、増殖因子からの刺激に対する受容体やシグナルレベルでの制御が効かなくなり、その結果、細胞の増殖、遊走、細胞外マトリックスの沈着などが無秩序に生じるようになった状態であると考えられる。

増殖因子には細胞増殖に関わるものとして、上皮増殖因子(epidermal growth factor, EGF)や線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor, FGF)、角化細胞増殖因

子(keratinocyte growth factor, KGF)などがあり、ソニックヘッジホッグ⁴⁾のような器官形成物質も細胞増殖に関わっている⁵⁾。また、細胞増殖を抑制するものとして、形質転換成長因子ベータ(transforming growth factor β , TGF β)などがあげられる。これらの増殖因子にはそれぞれに特有の受容体(レセプター)が存在し、レセプターからシグナル伝達物質を介して核に刺激が伝わり、細胞増殖、あるいは抑制に働く。それぞれの増殖因子には特有のレセプターを介してシグナルのレベルでもそれぞれに主なシグナル経路が異なっている。細胞外環境での増殖因子のレベルで考えると、細胞の増殖はEGF, FGF, KGFなどの細胞増殖を促進するものとTGF β のような増殖を抑制するものの、バランスのどちらが優位になるかによって調節されている。生体内では増殖因子をはじめ様々なサイトカインが同時に協調して働いている。細胞増殖に関しては促進と抑制のどちらの因子が強く働くかによって増殖に働くか、増殖抑制に働くかが制御される。以下、まず眼腫瘍での増殖制御に関与する分子と悪性度の関係について、動物での誘発腫瘍とともに検討した。

II 眼腫瘍での細胞増殖促進・抑制の研究

まず、眼腫瘍での細胞増殖促進・抑制に関与する各種の増殖因子と、それらの因子由来のシグナル伝達の研究成果について述べる。臨床例としては、ともにメラニン色素に富み、時に眼底観察だけでは視神経乳頭部に発症した場合で増大傾向のある場合などに鑑別が困難で、さらに組織学的にも類似している黒色細胞腫と悪性黒色腫を例に、発現する細胞増殖関連因子の違いについて検討した結果を記載する。また、眼表面に発症した扁平上皮癌での増殖促進因子の発現と *in vitro* で、その因子の培養扁平上皮癌細胞株を用いた培養細胞での検討について述べる。

1. 黒色細胞腫と悪性黒色腫の比較に関する検討

黒色細胞腫(1例)と悪性黒色腫(3例)のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(以下、HE染色)を行った。黒色細胞腫はメラノサイトに富むが、核小体はめだたず、細胞の未分化性を示唆する所見は観察されなかった。悪性黒色腫は大型円形から卵円形の核に核小体がめだち、細胞質に豊富なメラニンを有する腫瘍細胞が充実性に増殖していた。しかし、HE染色のみでは増殖の評価は不完全であるため、免疫組織化学的染色が必要であると考え、以下の検討を追加した。Erk-

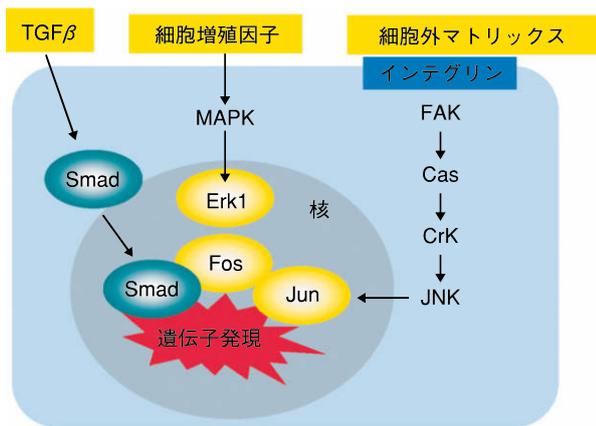


図 1 細胞内シグナル伝達機構による細胞増殖関連の遺伝子発現制御。

一般に細胞増殖因子は古典的 MAP キナーゼ系を介し Erk-1 シグナルを核に伝え細胞増殖に働く。その際に Fos ファミリーの蛋白も働く。また、細胞内ではインテグリンを介し JNK を活性化させ、Jun ファミリー蛋白を発現させる。Fos ファミリー蛋白と Jun ファミリー蛋白が 2 量体を形成し遺伝子発現に参与する。形質転換成長因子ベータ (TGFβ) には古典的 MAP キナーゼ系、その他の MAP キナーゼ系以外に Smad 蛋白という TGFβ に特異的なシグナル伝達物質があり、TGFβ による刺激を受けた際には TGFβ-Smad 系も遺伝子発現に参与する。

1, cyclin D1, activator protein-1 (AP-1) の構成成分について検討した。Erk-1 は古典的 MAP キナーゼ系のシグナル伝達の最終段階を担う蛋白質である。一般に細胞増殖因子は古典的 MAP キナーゼ系を介し Erk-1 シグナルを核に伝え細胞増殖に働く。その際に Fos ファミリーの蛋白も働く。また、細胞内ではインテグリンを介し c-Jun N-terminal キナーゼ (JNK) を活性化させ、Jun ファミリー蛋白を発現させる。Fos ファミリー蛋白と Jun ファミリー蛋白が 2 量体を形成し遺伝子発現に参与する。これらは一般に細胞増殖促進に働くことが多い⁶⁾。一方、上皮系細胞の増殖抑制を担う増殖因子として TGFβ が知られている。TGFβ ファミリーには古典的 MAP キナーゼ系、その他の MAP キナーゼ系以外に Smad 蛋白という TGFβ に特異的なシグナル伝達物質があり、TGFβ による刺激を受けた際には TGFβ/Smad 系も遺伝子発現に参与する (図 1)。

次に、AP-1 を介した細胞増殖促進効果の機序について解説する。各種の増殖因子によって誘導された c-Jun, c-Fos, FosB や JunB は、転写因子 AP-1 を構成し、それぞれの組み合わせによって p53 を経て p21 を、あるいはサイクリン D1 や p16 などを誘導し細胞周期を調節している⁷⁾ (図 2)。したがって、これらの AP-1 の構成成分の発現上昇が細胞周期の促進、すなわち細胞増殖の亢進につながっていると考えられている⁸⁾ (図 2)。

黒色細胞腫と悪性黒色腫に対して免疫組織化学染色に

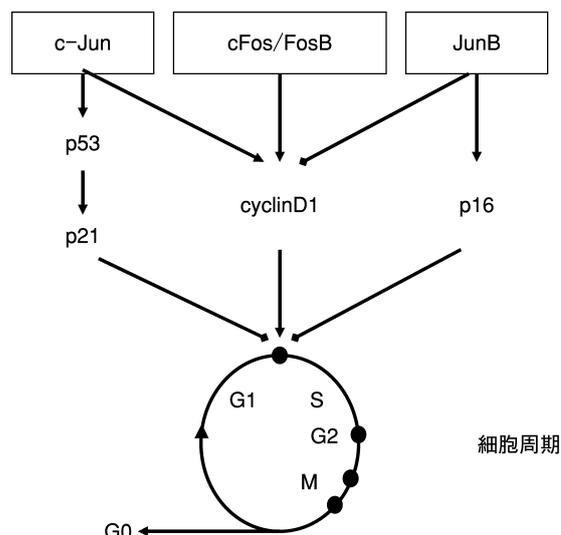


図 2 Activator protein-1 (AP-1) を介した細胞増殖促進効果の機序。

各種の増殖因子によって誘導された c-Jun, c-Fos, FosB や JunB は、転写因子 AP-1 を構成し、それぞれの組み合わせによって p53 を経て p21 をあるいは、サイクリン D1 や p16 などを誘導し細胞周期を調節している。

による Erk-1 と cyclin D1 について、両者での発現パターンを比較した。Erk-1, cyclin D1 の発現は悪性黒色腫において強かった (図 3)。発現は一部細胞質を含んだ細胞核にみられた。細胞増殖は、より悪性度の高い方で強かった。黒色細胞腫と悪性黒色腫はともにメラノサイトに富んだ腫瘍であるが、細胞増殖を促進するシグナルはより悪性黒色腫で強いという結果を得た。グラフは Erk-1, cyclin D1 の陽性細胞率で、免疫組織像に一致した陽性細胞率であった。今後、これらのマーカーが診断に苦慮する症例で診断の補助として活用できると考えられた。

AP-1 の代表構成因子である c-Fos と c-Jun についても、黒色細胞腫と悪性黒色腫に対して免疫組織化学染色による発現パターンを比較し、細胞増殖の評価を行った。c-Jun の核内移行は AP-1 経路の活性化を意味すると考えられる。c-Fos, c-Jun の発現は悪性黒色腫において強かった。発現は一部細胞質を含んだ細胞核にみられた。細胞増殖はより悪性度の高い方で強いという結果を得た。グラフは c-Fos と c-Jun の陽性細胞率で悪性黒色腫において高かった (図 3)。

2. 眼表面悪性上皮性腫瘍での sonic hedgehog の役割について

Sonic hedgehog (Shh) とは、hedgehog ファミリー蛋白質の一つで分子量約 20 キロダルトンの分子量から成る形態形成に参与する液性因子である⁴⁾。Shh は細胞の増殖、分化を調節し、胎生期における諸臓器の形態形成や発癌に関連しているといわれている⁹⁾。著者らの扁平

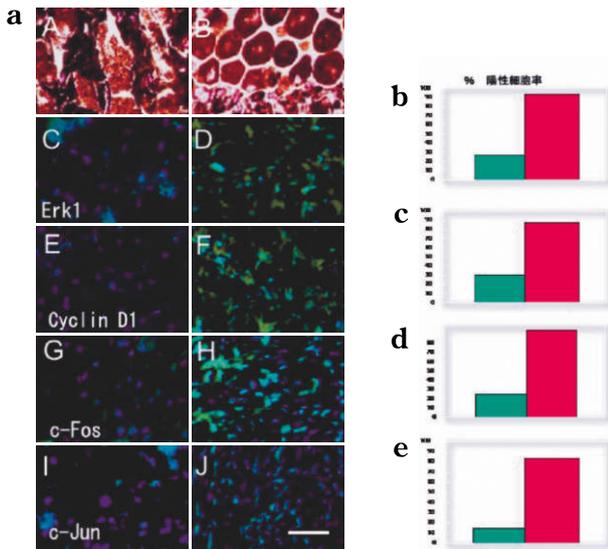


図3 黒色細胞腫と悪性黒色腫の免疫組織化学による細胞増殖の評価。

aA: 黒色細胞腫のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色。メラノサイトに富むが、核小体はめだたない。
 aB: 悪性黒色腫の HE 染色。大型円形から卵円形の核に核小体がめだち、細胞質に豊富なメラニンを有する腫瘍細胞が充実性に増殖している。ほぼ壊死細胞でしめられている。
 aC, aD: Erk-1, aE, aF: cyclin D1, aG, aH: c-Fos, aI, aJ: c-Jun について、両者での免疫組織化学染色像。発現は一部細胞質を含んだ細胞核にみられるが、いずれも悪性黒色腫において強い。
 b: Erk-1, c: cyclin D1, d: c-Fos, e: c-Jun の免疫染色の陽性細胞率で、免疫組織像に一致した陽性細胞率である。黒色細胞腫(緑色)より悪性黒色腫(赤色)において高い。より悪性度の高い方で細胞増殖は強い。バーは 50 μ m

上皮癌での免疫組織化学的検索で細胞質に著明な Shh の発現がみられ、癌細胞の発現に Shh が関与している可能性が示唆された(未発表)。著者らのこれまでの研究から、結膜上皮は角膜上皮と異なり Shh を恒常的に発現していることが判明しているが、角膜内に侵入した腫瘍にも強く発現されていた。これは、大腸癌や膵臓癌での Shh の異常発現と同様に悪性腫瘍細胞の増殖促進に関係している可能性があると考えられた。実際、著者らの試験的研究では、リコンビナント Shh は、扁平上皮癌から得た株細胞の増殖能を濃度依存的に有意に増加させた(未発表)。In vivo で扁平上皮癌に発現されている Shh も増殖促進効果を発揮していると考えられた。結膜に発生した異型上皮でも Shh の発現が上昇しており、その症例をマイトマイシン C(MMC)点眼で治療したところ、透過電子顕微鏡観察を含めて形態学的に治療効果があったことが判明したが、その際 AP-1 構成因子の発現減弱以外に Shh 発現も減弱した(未発表)。これらの因子の発現の低下が異型上皮の増殖活性の低下と関連があると考えられる。

また、著者らは以前に、創傷治癒過程にある角膜上皮では、TNF α 由来の JNK 経路が上皮細胞の増殖を促進し、一方で同じ TNF α 由来の nuclear factor kappa B(NF- κ B)経路がこの JNK を抑制していることをマウス角膜アルカリ外傷で NF- κ B 阻害薬を用いて明らかにした¹⁰⁾。このことは、アルカリ外傷角膜での NF- κ B 阻害による治療効果が NF- κ B を介した抗炎症効果以外に上皮治癒の促進が関与していることを示唆する。同様の上皮細胞の増殖調節機序が腫瘍細胞でも機能しているか否かを検討する目的で、眼表面の扁平上皮癌で TNF α のシグナルの状態を検討した。その結果、眼扁平上皮癌では、TNF α 受容体の亢進と JNK 活性の発現が検出されたが、リン酸化 p 65(NF- κ B)は検出されず、腫瘍細胞は増殖促進に傾いていることが判明した(投稿中)。

III 眼組織各部での創傷治癒過程での細胞増殖促進・抑制に関する研究

1. 眼表面における創傷治癒での検討

次に細胞の増殖が活発に起こっていると考えられる創傷治癒過程での細胞増殖促進・抑制について、腫瘍細胞と同様の因子が関与しているか否かを検討した。まず、角結膜における創傷治癒での細胞増殖促進・抑制の研究について、in vitro で角膜上皮細胞の培養での検討と、実験動物を用いた検討について述べる。一般に角膜上皮の創傷治癒は、第1相の上皮欠損部への遊走(migration)、第2相の基底細胞の増殖(proliferation)、第3相の表層細胞への分化(differentiation)の3段階から成ることが広く知られている¹¹⁾。その際、上皮細胞は AP-1 のような転写因子によってまず調節を受け、その後に細胞の遊走、増殖や各種細胞外マトリックス発現などの組織再構築のための挙動をしていると考えられる。まず、培養角膜上皮細胞株を用いた単純な実験系での検討を行った。ここでは、培養細胞で最も有名な増殖因子である EGF の影響を検討した。SV 40 を用いて不死化したヒト角膜上皮細胞株¹²⁾を用い、EGF 添加の創傷治癒に及ぼす影響と、その時の転写因子 AP-1 構成成分である c-Fos 蛋白の発現について検討した。チャンバースライドに単層の角膜上皮細胞シートを作製し、シリコン針を用いて線状の細胞層欠損を作製した。その結果、EGF は細胞シート欠損部の修復と c-Fos 発現を増強した(未発表)。このことから、EGF は c-Fos 蛋白の発現を誘導し、このことが創傷治癒を促進している可能性が示唆された。同様の結果は、c-Jun の活性化に関与する JNK 阻害薬を用いた検討でも得られた。すなわち、JNK 阻害薬は器官培養系でマウスの角膜上皮の創傷治癒を遅延させた(未発表)。一方、培養角膜実質細胞で c-Jun の遺伝子導入による強制発現が細胞遊走を促進したと報告されたが、c-Fos シグナルの細胞遊走への関与をさらに指示するデータである¹³⁾。これらのことは、次

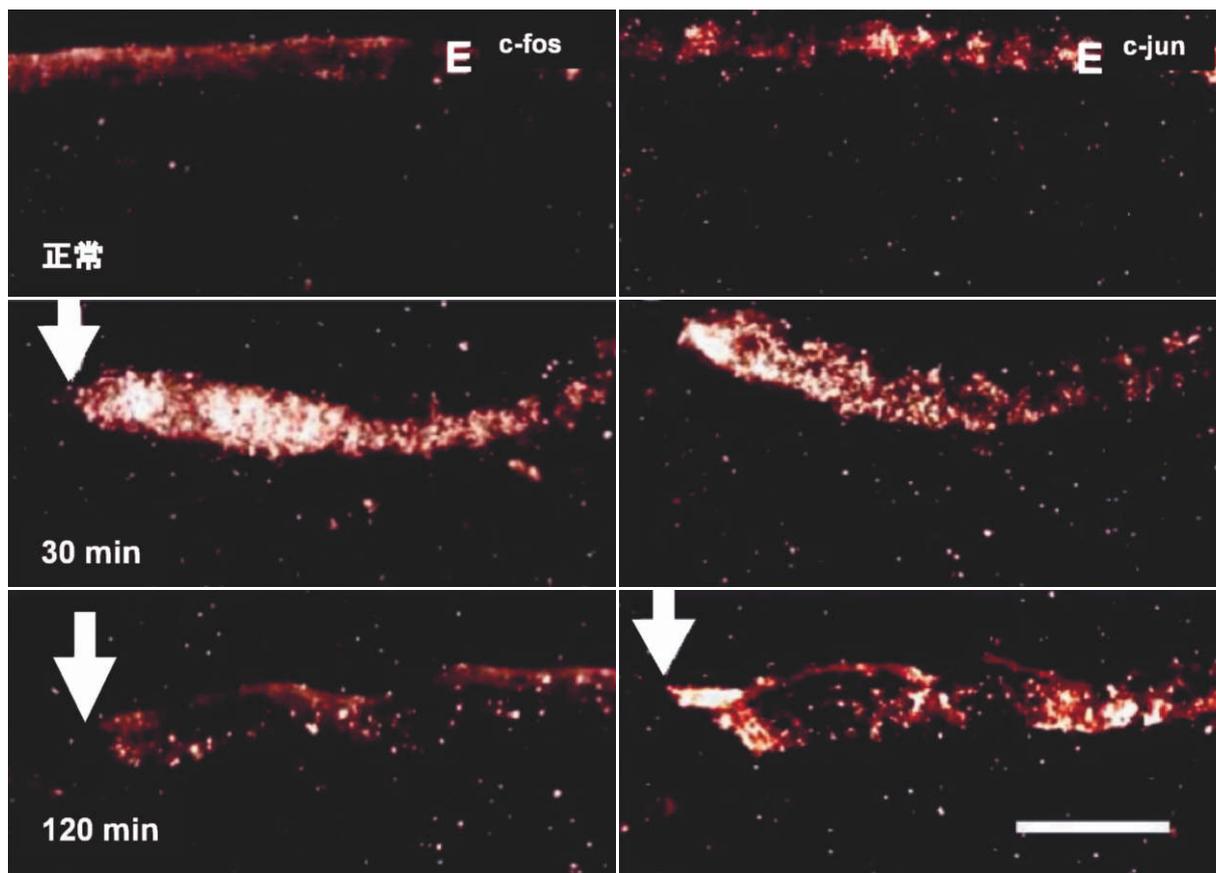


図 4 ラット角膜上皮欠損後の c-fos, c-jun の mRNA の発現。

正常ラット角膜上皮には c-fos, c-jun の mRNA は認めなかったが, 上皮欠損作成 15~60 分後欠損部周辺の上皮細胞にこれらの mRNA が一過性に発現し, 120 分後には消失した. 正常: ラット正常角膜, 30 分: 上皮欠損 30 分後, 120 分: 上皮欠損 120 分後, E: 角膜上皮, ↓: 角膜上皮欠損部のエッジ, バーは 200 μm

に *in vivo* でも同様に AP-1 が関与しているのかをその発現パターンから検討した。

ラット角膜に上皮欠損を作製し, 転写因子 AP-1 構成成分である c-Fos, c-Jun mRNA の発現を *in situ* hybridization 法を用いて検討した. 正常ラット角膜上皮にはこれらの mRNA は認められなかったが, 上皮欠損作成 15~60 分後欠損部周辺の上皮細胞にこれらの mRNA が一過性に発現し, 120 分後には消失した¹⁴⁾. これらの所見から, 悪性腫瘍組織と同様に, 角膜上皮創傷治癒過程において受傷後早期に一過性に転写活性の亢進が起こっており, AP-1 の発現がその後の様々な遺伝子の発現につながっていくと考えられた(図 4). また, 胎児発生過程でも角膜上皮にこれらの転写因子の発現上昇が観察され, 創傷治癒過程と胎児での器官形成過程との類似性が指摘された¹⁵⁾.

転写因子 AP-1 の発現の後, 様々な創傷治癒に関与する分子が他の転写因子と協調した転写制御で発現される. 例えば, TGF β 受容体の発現増強が観察されると報告¹⁶⁾されているが, 器官培養系でマウスの角膜上皮細胞の遊走は抗 TGF β 中和抗体で抑制されることを報

告¹⁷⁾した. この受容体発現は, 著者らの研究によって抑制性 Smad である Smad7 の発現増強を介して Smad シグナルを抑制すると同時に p38 MAP キナーゼを活性化することで, 上皮細胞の遊走を制御していることが明らかにされている¹⁸⁾. p38 MAP キナーゼの上皮系細胞の遊走への関与は培養皮膚表皮細胞などでも報告¹⁹⁾されている. また, 種々のリガンドの発現も制御していると考えられ, 例えばラットの角膜上皮欠損後の遊走上皮では Shh が発現される²⁰⁾. 図 5 に示すごとく 12 時間後で矢印のように, 上皮先端に発現されている. この時, 上皮欠損を持つ角膜では輪部の上皮も Shh の発現を増強させていた²⁰⁾. また, この Shh の細胞増殖への関与を器官培養で検討した結果, 上皮欠損を作製して器官培養されたマウス角膜上皮での増殖細胞核抗原(PCNA)発現が Shh の添加で著明に増加し, 細胞増殖促進効果が証明された(図 5). 悪性上皮性腫瘍細胞だけでなく, 正常細胞の増殖にも Shh が関与していることが証明された. Shh の創傷治癒過程での発現は角膜上皮に限定されず, 水晶体上皮細胞やレーザー光凝固後の網膜色素上皮細胞にも検出された(未発表).

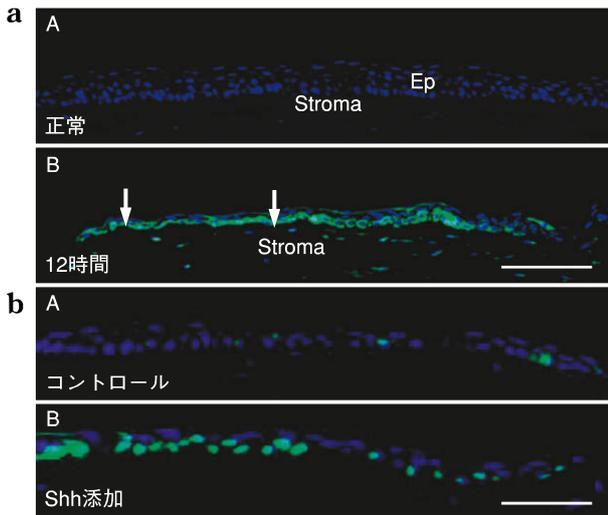


図5 ラット角膜上皮創傷治癒過程での sonic hedgehog の発現と増殖促進効果と Shh 添加器官培養角膜上皮での増殖細胞核抗原(PCNA)の発現。

a. ラットの角膜上皮欠損後の遊走上皮では Sonic hedgehog が発現される。12 時間後で矢印のように、上皮先端に発現されている。b. Sonic hedgehog の細胞増殖への関与を器官培養で検討した結果、上皮欠損を作成して器官培養されたマウス角膜上皮での PCNA 発現が Sonic hedgehog の添加で著明に増加し、細胞増殖促進効果が証明された。バーは 100 μm 。(文献 20 から引用)

2. 水晶体創傷治癒過程での水晶体上皮の挙動と細胞増殖因子の制御

1) 水晶体創傷治癒の結果としての後発白内障

白内障手術は水晶体にとっては囊を残存させた状態で内容を除去するという一種の創傷であり、後発白内障は創傷治癒反応とみなすことができる。そこで、まずヒト白内障術後のカプセルについて術後に残存した水晶体囊に創傷治癒反応関連の蛋白質の発現が検出されるか否かを検討した。次に、実験動物を用いて、水晶体外傷モデルを作製し、水晶体の創傷治癒過程でも上述の角膜での創傷治癒過程での組織反応と類似したことが起こっているのか否かを検討した。

まず、摘出されたヒト後発白内障組織を各種細胞外マトリックスに対する免疫組織化学染色を行うと、眼内レンズに接する水晶体囊内面に本来、水晶体には存在しない各種のコラーゲン 1 型、3 型、6 型といった線維性コラーゲンやフィブロネクチンなどの沈着が検出された(図 6)。さらに、オステオポンチン、フィブリリン、ヒアルロナンも検出された^{21)~23)}。これらの細胞外マトリックスは囊内での唯一の細胞成分である水晶体上皮細胞が産生したものであり、すなわち後発白内障は一種の線維化の癩痕組織であると考えられた。同様の細胞外マトリックスの沈着は動物眼での外傷性白内障でも検出された。この際、水晶体上皮細胞はもはや上皮細胞として

の形質を示さず、 α 平滑筋アクチンを発現した筋線維芽細胞の表現型を示す^{21)~23)}。

2) 水晶体創傷治癒での早期転写因子発現

次に実験動物を用いて、水晶体外傷後の水晶体上皮細胞による創傷修復反応のモデルとして、ラット眼に水晶体前囊切開を行い、その創傷修復過程での水晶体上皮細胞の活性化の経時的、位置的变化を調べるために、角膜上皮と同様に転写因子 AP-1 の発現について、mRNA レベルと免疫組織化学による蛋白質のレベルで検討した。その結果、正常水晶体には c-fos の mRNA のシグナルは認められなかったが、前囊切開の 30 分、1 時間および 8 時間後の水晶体上皮細胞全域にそのシグナルが認められた²⁴⁾。10 時間後には消失していた(図 7)。c-Jun の mRNA についても同様であった。この mRNA 発現に引き続いてそれぞれの蛋白質発現が上昇し、同時に核内に移行していた。このことは水晶体外傷時には、水晶体上皮細胞全域で、極めて早期から何らかの転写活性の亢進が起こっていると考えられた。転写因子の発現に引き続き様々な遺伝子の発現が上昇すると思われる。著者らの試験的研究では水晶体上皮細胞も角膜上皮細胞同様に Shh を発現したり(未発表)、TGF β レセプターや TGF β リガンドの発現も亢進させる²⁵⁾。また、胎児発生過程でも水晶体上皮にこれらの転写因子の発現上昇が観察され、創傷治癒過程と胎児での器官形成過程との類似性が指摘された¹⁵⁾。

3) 水晶体創傷治癒での TGF β シグナルの役割

TGF β は先に記述したように細胞増殖抑制に働くサイトカインの一つであるが、細胞増殖抑制以外に線維芽細胞などでの細胞外マトリックス発現の制御、細胞運動の亢進や上皮系細胞の上皮間葉系移行にも関わっている²⁶⁾。上皮間葉系移行により上皮細胞も線維芽細胞様に変化し、細胞外マトリックスを沈着させる。TGF β が適度に働けば正常治癒に至るが、過剰に働くと細胞外マトリックスが過剰に沈着し、癩痕化を生じる。このサイトカインは、いわゆる両刃の剣である。

上記のように、TGF β は MAPK 系、JNK 系、p38 MAPK 系などの様々なシグナル伝達経路を活性化するが、TGF β /BMP スーパーファミリーのシグナル伝達特異的な経路として Smad 系がある。TGF β のレセプターへの結合によって、Smad 2 または Smad 3 がリン酸化された後、Smad 4 と 2 量体を形成し、核内移行の後、細胞内の遺伝子プロモーターに結合する。そして遺伝子発現を調節する²⁷⁾。

TGF β /Smad シグナルが水晶体外傷でも上皮細胞で活性化されるか否かを水晶体前囊穿刺実験で検討した。正常では Smad 4 は細胞質に局在するが、12 時間以内に、前囊が穿刺された部分に隣接した水晶体上皮細胞の核に Smad 4 が集積し、水晶体外傷が TGF β /Smad シグナルを活性化することが証明された²⁸⁾²⁹⁾。同様の所見

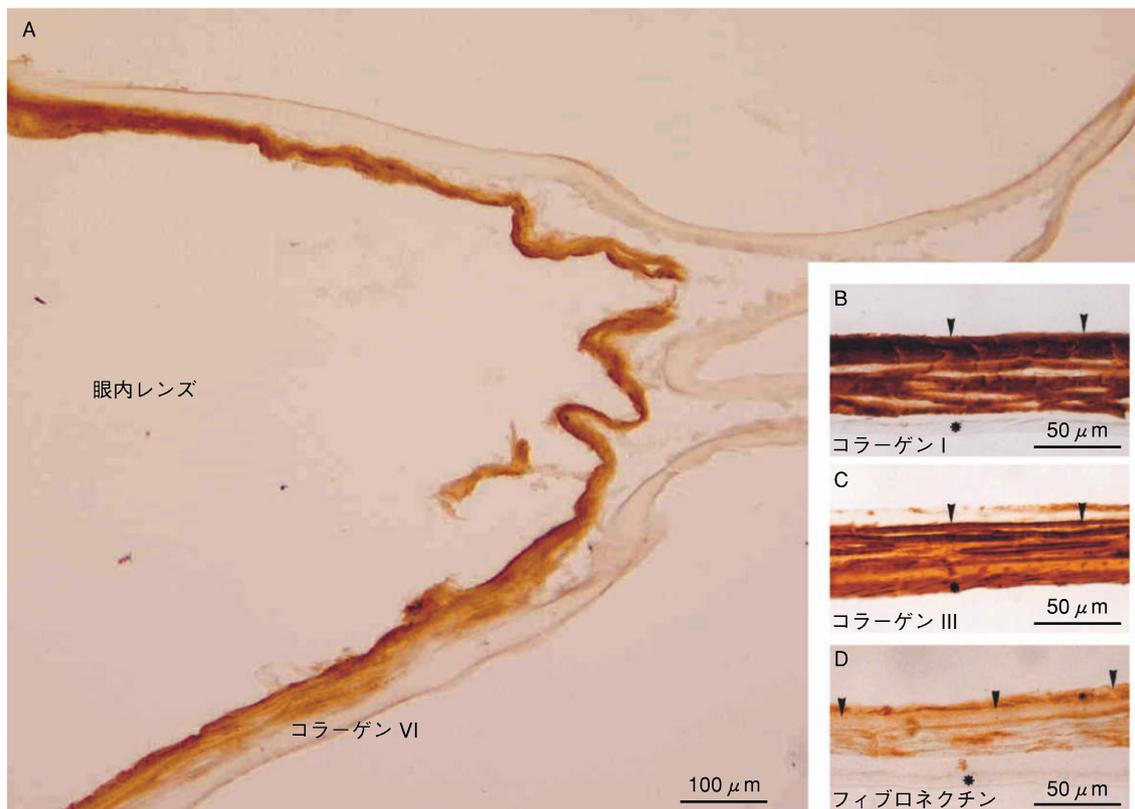


図 6 ヒト後発白内障の細胞外マトリックス沈着.

眼内レンズ (IOL) 挿入 9 か月後、糖尿病網膜症に対する硝子体手術時に摘出。水晶体嚢内面の IOL に接する部分にコラーゲン IV 型の沈着が検出された (A)。同部には、コラーゲン I 型 (B)、コラーゲン III 型 (C)、コラーゲン IV 型やフィブロネクチン (D)、プロテオグリカン、ヒアルロン酸も検出されている。

* : 水晶体嚢, → : 免疫組織化学染色陽性部位 (文献 21 から引用)

は Smad 2/3 の免疫組織化学でも得られている。この時、著者らは眼内への $TGF\beta 2$ に対する中和抗体の投与でこの Smad の核内移行を阻害できることから、眼内で外傷時に水晶体上皮細胞に影響している isoform は $TGF\beta 2$ であると結論付けた。すなわち、眼外傷では眼内の $TGF\beta 2$ の迅速な活性化に伴い水晶体上皮細胞は速やかに $TGF\beta$ の影響を受けると考えられる。 $TGF\beta$ の上皮系細胞に対する制御は一般に、① 増殖抑制、② 細胞外マトリックス発現亢進、③ 細胞遊走の活性化などが挙げられる。著者らのこれまでの研究でも、眼内で $TGF\beta 2$ がこれらの役割を担っていることが証明された。細胞増殖に関しては、 $TGF\beta 2$ に対する中和抗体の局所投与は Smad 3/4 の核内移行抑制に伴って分裂細胞数を増加させた²⁸⁾²⁹⁾。このことは、水晶体上皮細胞の増殖を眼内の $TGF\beta$ が抑制していることを示す。一方、細胞外マトリックス発現や細胞外マトリックス発現への $TGF\beta$ /Smad シグナルの関与は、以下のごとく Smad 3 ノックアウトマウス³⁰⁾で検討した。Smad 3 ノックアウトマウスに水晶体外傷または水晶体嚢外摘出を行い、残存上皮細胞の上皮間葉系移行の有無を組織学的に検討した。その結果、両方のモデルにおいても、

Smad 3 の欠失は上皮間葉系移行を阻害した³¹⁾。手術後 7 日の HE 染色像と線維化のマーカーである α 平滑筋アクチンの蛍光抗体法による免疫組織化学の結果をみると、Smad 3 の対照マウスでは、HE 染色では紡錘状に水晶体上皮細胞が変化しているが、ノックアウトマウスでは、細胞は比較的に上皮様の形態を保っていた。 α 平滑筋アクチンの発現でも対照では細胞は α 平滑筋アクチン強陽性であるが、ノックアウトマウスでは陰性であった。さらに、同様の所見はこのノックアウトマウスから得た培養水晶体上皮細胞でも確認できた。

以上の著者らの研究から、この上皮間葉系移行の過程は次のようにまとめることができる。すなわち、外傷を契機として、眼内の $TGF\beta 2$ が活性化され、Smad 3 シグナルを介して、水晶体上皮細胞は、転写因子スネイルやプロテオグリカンのルミカン³²⁾などの上皮間葉系移行に関係する分子を発現し、 α 平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞に変化し、さらにコラーゲンなどの細胞外マトリックスを沈着させて線維性の混濁組織を嚢内に形成する。この過程は水晶体上皮細胞に特別なことでなく、腎尿管上皮などでも同様に組織の線維化に大きく関与していることが知られている。しかしながら、眼球への

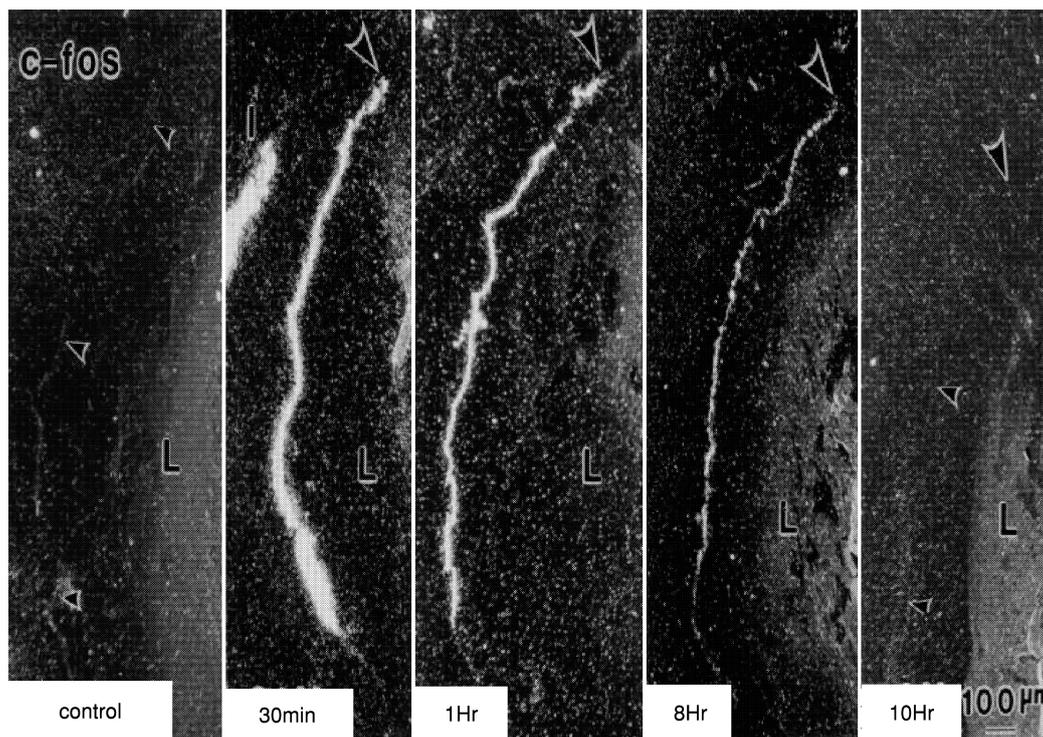


図 7 前囊穿孔外傷後の *c-fos* mRNA の発現.

左から正常水晶体, 前囊切開 30 分後, 1 時間後, 8 時間後, 10 時間後. 正常水晶体には *c-fos* の mRNA のシグナルは認められなかったが, 前囊切開の 30 分, 1 時間および 8 時間後の水晶体上皮細胞全域にそのシグナルが認められた. 10 時間後には消失していた. (矢じり大; 前囊切開縁, 矢じり小; 前囊, バーは 100 μm). (文献 24 から引用)

アルカリ暴露による炎症といった非常に強い傷害を用いた著者らのその後の研究結果やクリスタリンプロモーター³³⁾やアデノウイルス³⁴⁾による活性型 TGF β 1 の水晶体上皮細胞での強制発現では, Smad 3 欠損は完全には上皮間葉系移行を阻止できず, ごく軽度の上皮間葉系移行が観察される場合があり, 強い TGF β 刺激に暴露した場合は Smad 2 などの他のシグナルが代償して働いて上皮間葉系移行が起こる (程度は弱い) が可能性が考えられている.

4) 水晶体創傷治癒での細胞の増殖と FGF 2

水晶体上皮細胞は, 上記のように創傷治癒過程で TGF β の影響を受ける. TGF β は一般に細胞増殖に抑制的に働く. しかし, 創傷治癒過程では, この細胞は増殖活性を亢進させる. したがって, 他の増殖因子の存在がこの増殖促進に関与していると考え, 以下の実験を継続した. 他組織での創傷治癒過程同様に水晶体創傷治癒の過程でも, TGF β 以外にも様々な細胞成長因子が水晶体上皮細胞の挙動を調節していると考えられているが, その中でも特に TGF β 2 および FGF 2 について注目した. TGF β 群の中で TGF β 2 に注目したのは, 水晶体創傷治癒には眼房水も大きく関与していると思われるが, TGF β 群の中でも TGF β 2 は特に眼房水中で濃度が高く³⁵⁾, TGF β 2 は眼の器官形成にも深く関与しており, さらに TGF β 2 のみが水晶体上皮細胞に作用し,

Samd 系を活性化させると同時に, その細胞増殖を抑制する³⁶⁾と報告されているからである. また, FGF ファミリーは, 23 種の異なる遺伝子にコードされた分枝種から構成されている³⁷⁾. その中でも, FGF 1, FGF 2 はともに水晶体上皮細胞の創傷治癒反応に関わっているのだが, FGF 2 の方が低濃度でも作用する.

Wistar ラットの片眼の水晶体前囊中央を経角膜的に 26 G 針で切開して水晶体外傷を作製した³⁸⁾. そして, 2 時間後, 1, 3, 5, 7, 14 日後に水晶体を摘出し, TGF β 2 と FGF 2 の濃度を免疫アッセイで定量した. 正常ラット水晶体中では, TGF β 2 は水晶体 1 個当たり 72.5 pg, FGF 2 は 13.0 pg であった. TGF β 2 は外傷後徐々に減少し, FGF 2 は徐々に増加した. 5 日後には両者の濃度は逆転し, TGF β 2 の濃度の方が FGF 2 より低くなった. 14 日後には, TGF β 2 は 21.5 pg にまで減少し, FGF 2 は 171.5 pg にまで増加した (図 8). さらに著者らは, FGF 2 ノックアウトマウス³⁹⁾では, 水晶体穿孔外傷後の水晶体上皮細胞の増殖能は低下することを報告³⁸⁾した. さらに, TGF β と FGF 2 の発現の関係を培養細胞で検討した. 培養ウシ水晶体上皮細胞に, TGF β 2 を添加すると, 培養液中の FGF 2 の濃度は, 非添加群と比べて有意に増加した³⁸⁾. そのため, TGF β 2 は FGF 2 を誘導していると考えられる. そして, TGF β 2, FGF 2 ともに水晶体上皮細胞の挙動に影

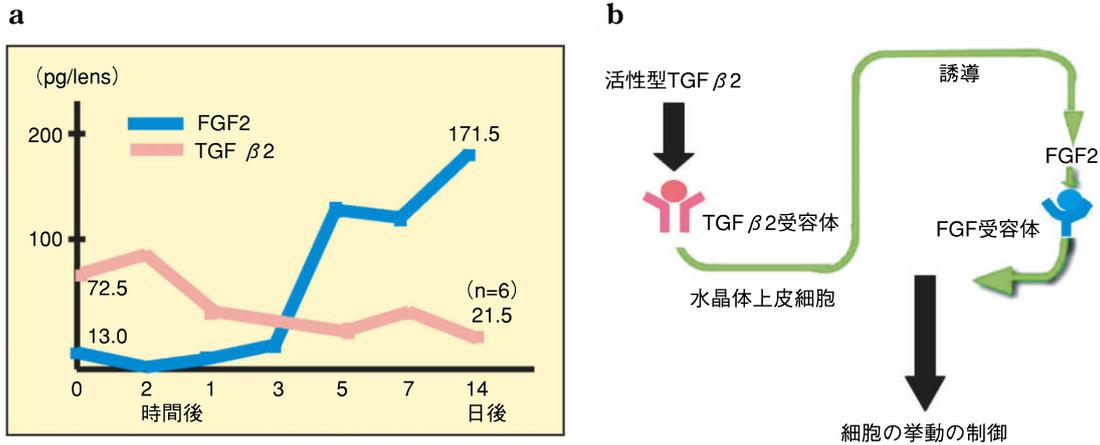


図 8 a: ラット眼水晶体外傷後の水晶体中の形質転換成長因子(TGF)β2 および FGF2 の定量。外傷後の水晶体組織では、TGFβ2 は徐々に減少し、FGF2 は徐々に増加した。5 日後には両者の濃度は逆転し、TGFβ2 の濃度の方が FGF2 の濃度より低くなった。14 日後には、TGFβ2 は 21.5 pg にまで減少し、FGF2 は 171.5 pg にまで増加した。文献 39 から改変。b: TGFβ2 や FGF2 は、水晶体上皮細胞の受容体に結合し、水晶体上皮細胞の増殖の対照、線維芽細胞様細胞への変化の促進、様々な細胞成長因子の産生の対照、細胞外マトリックスの合成促進などの作用を担っている。また、FGF2 は TGFβ2 の作用によっても発現が誘導される。

響しているのだが、培養細胞、FGF2 ノックアウトマウスを用いた実験により、TGFβ2 は細胞増殖を抑制し、FGF2 は細胞増殖を促進していることが明らかになった³⁸⁾。その他にも、細胞外マトリックスの産生、上皮間葉系移行にも影響していると思われる。

5) 後発白内障と前囊下白内障の類似性と増殖因子の関与

前囊下白内障部には線維芽細胞様に上皮間葉系移行した水晶体上皮細胞が細胞外マトリックスとともに存在している。この組織像は後発白内障と類似している⁴⁰⁾。細胞外マトリックスを構成する成分は各種コラーゲンやフィブロネクチンなどで、これらは上皮間葉系移行した水晶体上皮細胞から産生されると考えられている⁴¹⁾⁴²⁾。また、TGFβ や FGF などの成長因子がラットのの前囊下白内障発症に関係していると報告⁴³⁾⁴⁴⁾されている。そこで、我々は白内障手術時に採取したヒト前囊下白内障部のパラフィン切片を作製し、Ras/MAP キナーゼ/ErK 系については ErK 1 の免疫染色によって、TGFβ/Smad 系については Smad 3 の免疫染色によって、それぞれのシグナル伝達系の関与について検討を行った。その結果、ErK 1, Smad 3 ともに水晶体上皮細胞で核内移行が認められた⁴⁵⁾。Ras/MAP キナーゼ/ErK 系、TGFβ/Smad 系の両方が前囊下白内障の発症に関与していることが示唆された⁴⁵⁾。

3. 網膜での創傷治癒、特に網膜色素上皮細胞に焦点を当てて

次に、網膜における創傷治癒での細胞増殖促進・抑制の研究について、特に網膜色素上皮細胞に焦点を当てて検討した。我々は日々臨床で網膜剥離の患者に遭遇し、

時に難治性の増殖変化である増殖硝子体網膜症に陥り、治療に難渋する⁴⁶⁾。増殖硝子体網膜症は網膜色素上皮細胞やグリア細胞の増殖、創傷治癒反応であるとみなすことができるが、特に硝子体や網膜下液へ散布された網膜色素上皮細胞が剥離網膜表面で線維化を惹起することが知られている。そこで、我々は培養網膜色素上皮細胞での検討と実験動物を用い網膜剥離モデルを作製し、非外科的治療を模索する目的でその細胞挙動を検討した。

上記で記載した水晶体上皮細胞の上皮間葉系移行の調節機構は網膜色素上皮細胞にもあてはまることが報告⁴⁷⁾されている。網膜色素上皮細胞も図9のように、TGFβ2 添加による刺激でα平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞に変化する。筋線維芽細胞は組織の収縮や細胞外マトリックスの沈着を介して剥離網膜に線維化を起こし、網膜の可動性を低下させる。この機構が他の網膜の細胞(glia 細胞など)と共同で増殖硝子体網膜症組織に関与する。

臨床例でまず検討した。培養網膜色素上皮細胞と同様に、網膜剥離後の増殖硝子体網膜症組織でもα平滑筋アクチンの発現をマーカーにして上皮間葉系移行は確認できた。硝子体手術中に摘出した網膜下索状組織の光学顕微鏡写真で、HE 染色でも一部の細胞が紡錘型に変形しているのが観察できるが、蛍光抗体法でα平滑筋アクチンが検出された(未発表)。このことは、水晶体上皮細胞同様に TGFβ/Smad 3 シグナルを介している可能性を示唆するので、Smad 3 ノックアウトマウスに実験的に網膜剥離を作製し、その時の網膜色素上皮細胞の上皮間葉系移行を検討した。その結果、図10のように、野生型マウスでは1週で剥離網膜下に紡錘形細胞の色素

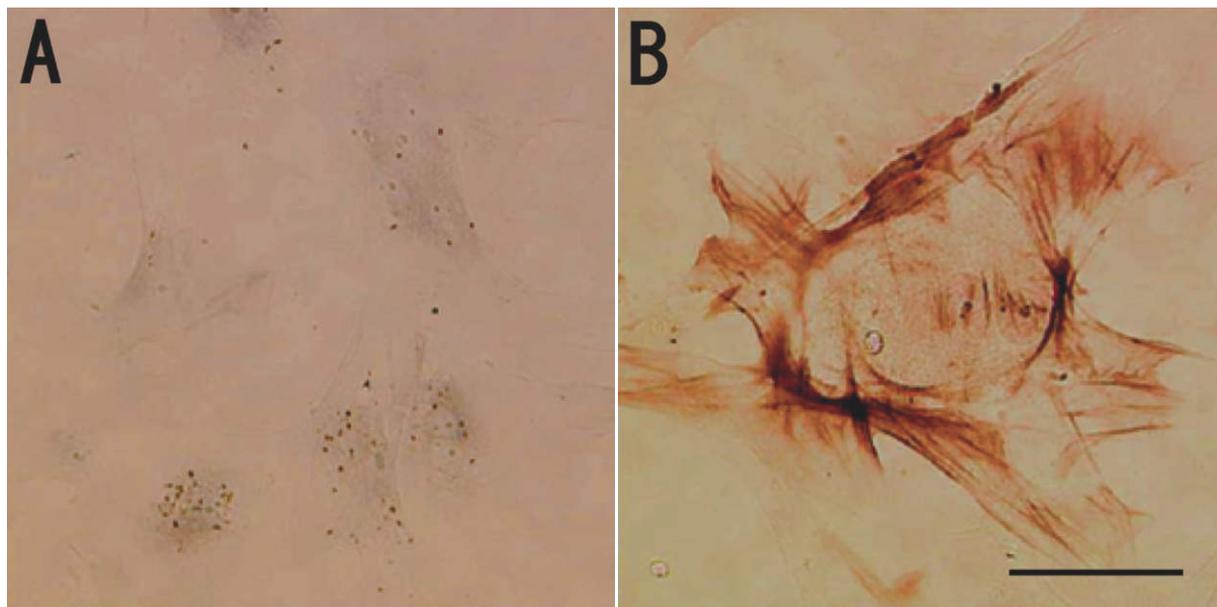


図 9 プタ網膜色素上皮細胞の上皮間葉系移行.

網膜色素上皮細胞(A)を $TGF\beta 2$ (10 ng/ml) 添加培養液で 48 時間培養した結果, α 平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞(B)に変化する. バーは 100 μ m. (文献 48 から引用)

を持った細胞の重層化による線維性の組織が形成され, それが 8 週まで増殖したが, Smad 3 ノックアウトマウスではこのような組織は形成されなかった⁴⁸⁾. さらに, この重層化した細胞が網膜色素上皮細胞の上皮間葉系移行によるものか否かを α 平滑筋アクチンと細胞外マトリックスの発現の免疫組織化学的手法で検討した. 正常では野生型マウス, Smad 3 ノックアウトマウスともに網膜色素上皮細胞に α 平滑筋アクチンは検出されなかったが, 経過中 8 週後までの間, 剝離網膜下の HE 染色で観察された紡錘形細胞の色素を持った重層化細胞に α 平滑筋アクチンの発現が検出されたものの, 図 10 のようにノックアウトマウスでは発現されていないかった. コラーゲン VI 型も同様の傾向であった. この実験結果から, $TGF\beta$ /Smad 3 シグナルを阻害することが増殖硝子体網膜症の発症の予防につながる可能性が示唆された. 他施設からの研究で Rho などの細胞運動に関与するシグナルの網膜色素上皮細胞の上皮間葉系移行での必要性も報告されているので, この現象には複数のシグナル伝達系が平行して関与していると考えられる. しかし, 一般に $TGF\beta$ /Smad シグナルは細胞増殖を抑制するにも拘らず, 増殖硝子体網膜症では網膜色素上皮細胞は上皮間葉系移行と平行して増殖活性も亢進させる. 著者らは培養網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 を用いて, $TGF\beta$ が誘導する platelet-derived growth factor B が同細胞の増殖を促進させていると報告した.

IV 増殖因子シグナルの制御による眼疾患 (腫瘍性, 非腫瘍性) の治療方法の探索

最後に, これまで明らかにしてきた腫瘍での結果および創傷治癒での細胞増殖機構を参考にして, 増殖に関与するであろう因子やシグナルを制御することで, 治療への応用の可能性について述べる. 方法としては, ウイルスベクターによるシグナル阻害分子の遺伝子導入または合成シグナル阻害物質を用いた. 著者らは眼表面へのウイルスベクターによる遺伝子導入に, アデノウイルスベクターを用いた. アデノウイルスベクターを利用した遺伝子治療は細胞への毒性などの問題も未解決である反面, 肝臓などでは, 動物実験上導入効率が良い. アデノウイルスベクターは, 二本鎖 DNA ウイルスで, 高い遺伝子導入効率を発揮する. 増殖に必要な遺伝子は削除されている. 高濃度のベクター感染では細胞毒性が観察される. 我々は Cre リコンビナーゼを発現するベクターと, Cre/LoxP システムを利用した共感染系を用いている. これは細胞毒性の高い蛋白質を発現させるベクターの作製が可能であり, かつ Cre リコンビナーゼを発現するベクターのプロモーターを細胞特異的なものに変更することで, 組織内で特定の細胞に選択的に遺伝子発現を行える.

一方, アデノ随伴ウイルスベクターでは, 非病原性ウイルスなので, 安全であることと, 特に静止期にある細胞で高い遺伝子導入効率を発揮すること, アデノウイルスベクターより導入遺伝子の発現期間が長い(年単位)ことが長所である. 二本鎖で遺伝子発現が起こるため大量

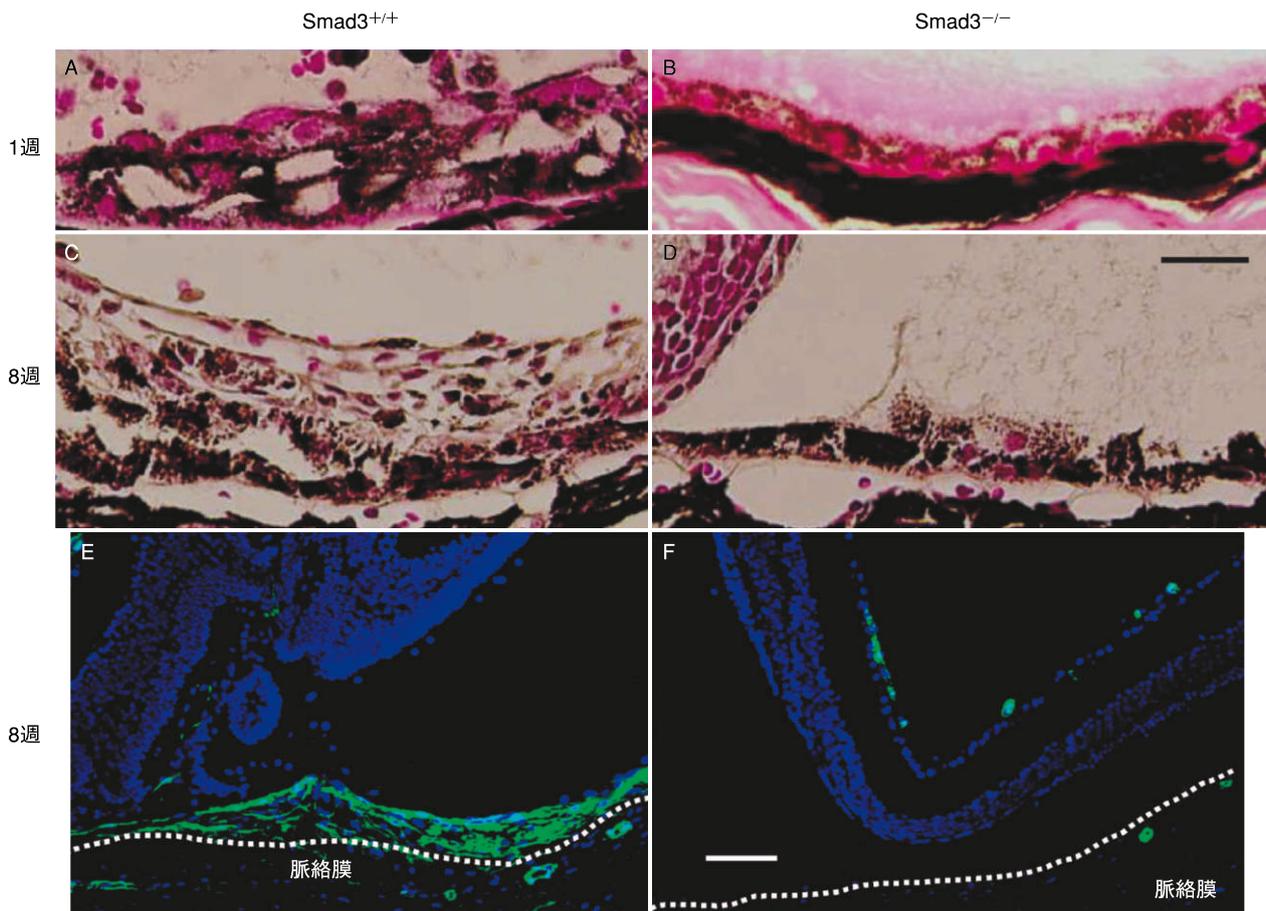


図 10 Smad 3 ノックアウトマウスでの網膜剥離後の網膜色素上皮の増殖。

実験的網膜剥離作成 1 週間で Smad 3^{+/+}マウスで剥離網膜下に紡錘形細胞の色素を持った細胞の重層化による線維性の組織(A)が形成され、それが 8 週まで増強するが(C), Smad 3^{-/-}マウスではこのような組織は形成されなかった(B, D)。この重層化した細胞は α 平滑筋アクチン陽性(E)で網膜色素上皮に上皮間葉系移行が起こったことが示されるが、Smad 3^{-/-}マウスでは同細胞は陰性(F)であった。バーは 20 μ m (A-D), 50 μ m (E, F)。(文献 48 から引用)

のベクターを必要とし、また発現に 1~2 週を必要とする上、標的臓器、組織によって異なった血清型のベクターを使用しないと高い遺伝子導入効率が期待できない。レトロウイルスベクターとは、それに属するオンコウイルスやレンチウイルスなどを遺伝子組み替え技術で遺伝子治療用のベクターとしたものである。導入遺伝子が染色体に組み込まれるので、長期間の導入遺伝子の発現が期待でき、細胞分裂を繰り返す血液前駆細胞の遺伝子治療などに有効であると考えられるが、白血病などの発癌性が問題である。

1. 遺伝子治療による創傷治癒過程に関する合併症の増殖因子シグナルの制御による予防、治療方法の探索

上記のように、TGF β /Smad 3 シグナルの抑制が後発白内障形成過程や水晶体創傷治癒過程での水晶体上皮細胞においてや、増殖硝子体網膜症における網膜色素上皮細胞の上皮間葉系移行を阻害したり、あるいは線維芽細胞の TGF β 刺激を阻害して、それぞれの組織での過剰な線維化による合併症の発症の予防につながると考え

られる。Smad 7 は、Smad 2 または 3 のリン酸化を抑制することで、TGF β のシグナル伝達を抑制する抑制性 Smad の一つである⁴⁹⁾。この Smad 7 の作用を利用することで、TGF β のシグナルの調節を介した治療法を開発できる可能性がある。Nakao ら⁵⁰⁾はアデノウイルスベクターによる Smad 7 遺伝子導入の抗線維化効果をブレオマイシンを用いた肺線維症モデルを用いて初めて報告し、その後、他の施設から実験的肝硬変での治療効果も報告⁵¹⁾された。

例えば、角膜アルカリ外傷などの炎症性、瘢痕性の眼表面疾患では様々なサイトカインが発現、または活性化されていると考えられ、その病態の本体は炎症、瘢痕化と血管新生である。輪部の障害に伴い角膜上に侵入した結膜上皮は、その下の実質の炎症とサイトカインの状況によって杯細胞と血管侵入を伴った結膜状の状態を保持するのか、それらの特徴を消失させ、サイトケラチンなどの発現パターンは結膜上皮の性質を保ったままで、一見、角膜上皮に類似した上皮に変化させる。眼表面疾患の病態に関与すると考えられる炎症性サイトカインは、

各種インターロイキン, EGF, KGF, HGF, TNF α , TGF β , VEGF, monocyte/macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1)などが主たるものであると考えられる。中でも、著者らはマクロファージの遊走, 侵入による炎症と実質細胞の筋線維芽細胞への形質転換を介した細胞外マトリックス発現による癒痕化と組織宿主を直接的に調節するだけでなく, 二次的に他のサイトカインを誘導する⁵²⁾ことによって病態をより複雑にしていると考えられる成長因子である TGF β に注目した。実際, 角膜アルカリ外傷の創傷治癒過程での組織の癒痕化と過剰な炎症を, TGF β リガンド可溶性受容体の過剰発現で阻害することで治療できることが以前に報告⁵³⁾された。この方法は局所にウイルスベクターが投与されないという点で, ウイルスによる障害角膜のさらなる炎症増強などの作用を回避できる上に, 肝臓などの遠隔臓器にも遺伝子治療効果を発揮できた⁵⁴⁾という点で良い方法であると考えられる。しかし, その際にどのシグナル伝達系の関与が大きいか不明であったために, 創傷治癒過程での予後改善に必要な TGF β 由来のシグナルのみ阻害するという試みは報告されていなかった。一方, 皮膚の創傷治癒では Smad 3 シグナルの阻害が早期の上皮治癒と癒痕化の抑制に有用であることが Smad 3 ノックアウトマウスを用いた実験で報告された。

そこで, 著者らはマウスに 1 規定水酸化ナトリウム点眼で作製した角膜アルカリ外傷をアデノウイルスベクターの点眼投与を用いて, Smad 7 遺伝子を導入することによる Smad シグナルの阻害の治療効果を検討した。フルオレセイン染色で治癒過程にある角膜を観察すると, 対照では 3 日後では, 角膜全体が上皮欠損で, その後 20 日後では, 著明な角膜混濁を残して治癒した(図 11)一方, Smad 7 をアデノウイルスベクターで導入した群では, 3 日後ですでに上皮欠損面積は縮小し, 20 日後ではほぼ透明治癒を得た(図 11)。さらに, HE 染色による光学顕微鏡写真で観察した結果, 前眼部所見に一致した組織像が観察された。すなわち, 3 日では, 対照では, 上皮治癒は開始されていなかったが, Smad 7 導入角膜では上皮治癒が開始されており, 20 日後では, 対照は角膜が肥厚し, 炎症も残存しているが, Smad 7 導入角膜はほぼ正常の組織像を呈していた⁵⁵⁾(図 11)。

HE 染色による光学顕微鏡観察で Smad 7 の遺伝子導入の治療効果が確認できたが, さらに免疫組織化学的に角膜の創傷治癒を詳しく検討した。Smad シグナルの状態はリン酸化 Smad 2 で, 角膜実質細胞の活性化は筋線維芽細胞のマーカーである α 平滑筋アクチンで, 炎症の状態は F4/80 抗体によるマクロファージの有無で, 血管新生は血管内皮細胞のマーカーである CD31 で検討した。その結果, Smad 7 遺伝子導入は Smad 2 のリン酸化シグナルを抑制すると同時に実質細胞の α 平滑筋アクチンの発現, マクロファージの侵入, 血管新生の

すべてを抑制していることが確認できた(図 11)。さらに, real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) による検討で TGF β 1, MCP-1 などの炎症に関与する cytokine, chemokine の発現が抑制されると同時に, Smad 7 は炎症に関与するシグナルである NF- κ B の p 65 のリン酸化は抑制しないものの, その核内移行を阻害することも見出した。NF- κ B p65 の核内移行もアルカリ外傷角膜の治癒過程での癒痕化の抑制に関与することは, 著者らの別の研究での NF- κ B 阻害ペプチドを用いた研究からも支持される⁵⁶⁾。

上記の結果は, TGF β /Smad シグナルの阻害が角膜アルカリ外傷での癒痕治癒の防止に有用であることを示すことから, 著者らは他の TGF β /Smad シグナルを阻害するサイトカインとして, bone morphogenic protein-7 (BMP-7) 遺伝子導入のアルカリ外傷角膜モデルでの効果も検討し, Smad 7 遺伝子導入と比較するとその効果は劣るものの治療効果を確認できた⁵⁷⁾。

水晶体上皮細胞の増殖に標的をしばった研究も多数報告されている。MMC や 5 FU などの抗癌剤の他, トラニラストなどの抗アレルギー剤⁵⁸⁾, ミノキシジル⁵⁹⁾などの蛋白合成阻害剤など薬剤を用いるもの, また眼内レンズの素材の工夫で接着, 増殖を阻害⁶⁰⁾させるなどである。しかしながら, 投与方法や投与期間, 他の組織への毒性の観点から未だ満足のいく効果を得ていない。他に, 水晶体上皮細胞の遊走を標的としたものとして, 眼内レンズの形状(シャープエッジ)を工夫することはすでに臨床で広く行われているが⁶¹⁾, 完全に後発白内障を防ぐには至っていない。

一方, 上述した白内障術後や水晶体外傷後の水晶体上皮細胞の上皮間葉系移行による嚢の線維化に TGF β /Smad シグナルが関与することを Smad 3 ノックアウトマウスを用いた実験から明らかにしたが, このことは Smad 系の遮断の治療効果を強く示唆する。そこで, マウスに水晶体前囊外傷を作製する際に, 著者らがマウス角膜アルカリ外傷モデルの治療に利用した Smad 7 発現アデノウイルスベクターを水晶体内に注入して, その後の創傷治癒過程を水晶体上皮細胞の上皮間葉系移行と細胞増殖に焦点を当てて検討した⁶²⁾。その結果, 結論としては Smad 7 遺伝子導入は, 水晶体外傷時の上皮細胞の上皮間葉系移行による嚢の線維化を抑制した。HE 染色で, 野生型マウスの傷害水晶体では, 上皮細胞は紡錘型に変化していたが, Smad 7 遺伝子導入の組織では, bromo-deoxyuridine の取込みで検出した細胞の増殖は亢進していたものの, 細胞は上皮様の形態を保っていた。さらに, α 平滑筋アクチンの発現を免疫組織化学的に検討すると, 対照では, 紡錘形の細胞は染色され, 筋線維芽細胞に変化しており, 上皮間葉系移行が完成していたが, Smad 7 導入はこの変化を阻止した(図 12)。したがって, 臨床的に水晶体上皮細胞の過剰な上皮間葉

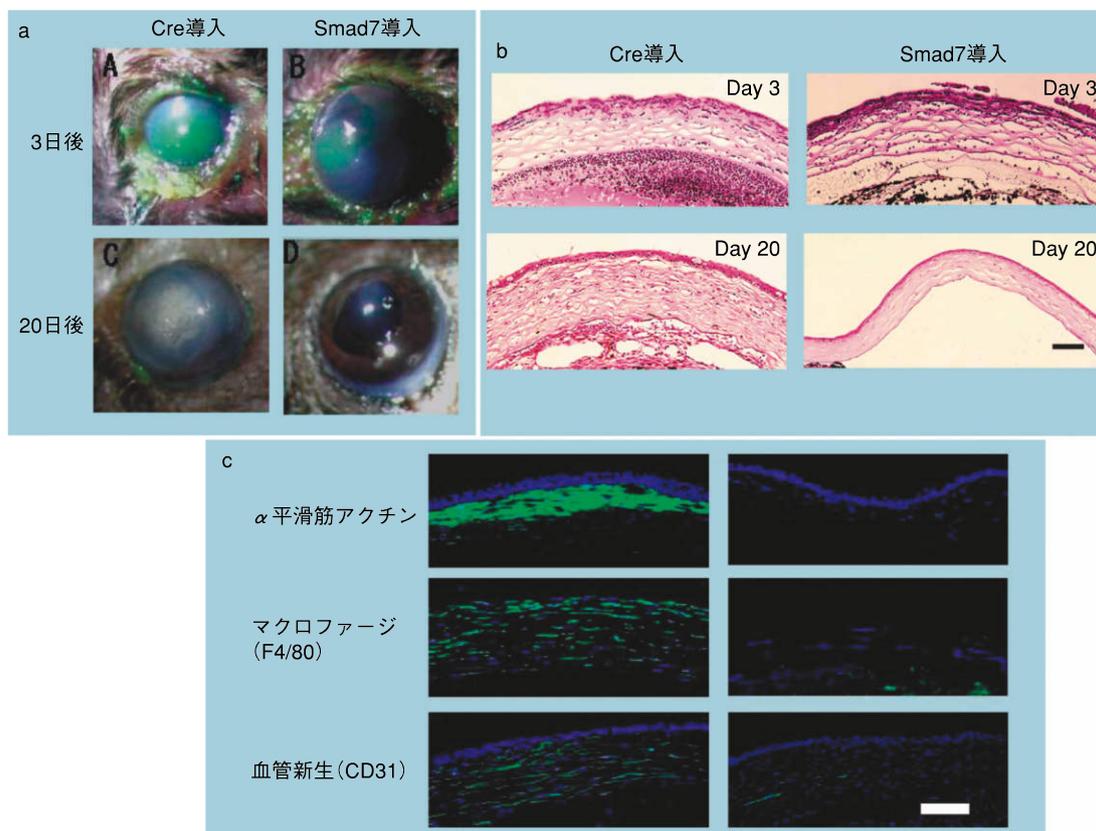


図 11 アデノウイルスベクターによる Smad 7 強制発現のマウス角膜アルカリ外傷に対する治療効果。マウスに 1 規定水酸化ナトリウム点眼で作成した角膜アルカリ外傷をアデノウイルスベクターの点眼投与を用いて Smad 7 遺伝子を導入することによる Smad シグナルの障害の治療効果を検討した。a. フルオレセイン染色で治療過程にある角膜を観察するとコントロールでは 3 日後では (A)、角膜全体が上皮欠損で、その後 20 日後では、著明な角膜混濁を残して治療した (C)。一方、Smad 7 をアデノウイルスベクターで導入した群では、3 日後ですでに上皮欠損面積は縮小し (B)、20 日後ではほぼ透明治療を得た (D)。b. HE 染色による光学顕微鏡写真で観察した結果、前眼部所見に一致した組織像が観察された。3 日では、コントロールでは、上皮治療は開始されていなかったが、Smad 7 導入角膜では上皮治療が開始されており、20 日後では、コントロールは角膜が肥厚し、炎症も残存しているが、Smad 7 導入角膜はほぼ正常の組織像を呈していた。c. 20 日後の免疫組織化学的検討では、筋線維芽細胞のマーカーである α 平滑筋アクチン、マクロファージのマーカーである F 4/80、血管内皮細胞のマーカーである CD 31 の検索から、筋線維芽細胞の出現、マクロファージの浸潤、新生血管形成が Smad 7 遺伝子導入でコントロールに比較して著明に抑制されているのが判明した。バーは 50 μ m。(文献 55 から引用)

系移行による囊の混濁や収縮を Smad 系の障害で予防、または治療できる可能性が示唆された。今後、より安全なベクターや低分子の Smad 阻害薬の開発が望まれる。また、上記の結果は、 $TGF\beta$ /Smad シグナルの障害が角膜アルカリ外傷での瘢痕治療の防止に有用であることを示すことから、著者らは他の $TGF\beta$ /Smad シグナルを障害するサイトカインとして、BMP-7 遺伝子導入のマウス水晶体外傷モデルでの効果も検討し、Smad 7 遺伝子導入と比較すると、その効果は劣るものの治療効果を確認できた。さらに近年、BMP-7 による $TGF\beta$ /Smad 2/3 シグナルの障害は、Smad 1/5/8 を介した Inhibitor of differentiation 2/3 (Id 2, Id 3) という転写補助因子の誘導によることが示唆され、実際 Miyazono らのグループはマウス水晶体上皮細胞株 a-TN 4 を用いて Id 2, または Id 3 の遺伝子導入が *in vitro* で上皮間葉系

移行を障害することを報告したが、著者らも *in vivo* マウス水晶体外傷モデルを用いて、これらの遺伝子のアデノウイルスベクターによる導入の上皮間葉系移行に対する障害効果を確認した。

さらに、実験的マウス増殖硝子体網膜症モデルでの線維組織の形成に Smad 3 の関与は水晶体上皮細胞の上皮間葉系移行と同様に Smad 7 遺伝子導入で抑制されると予想され、我々の予備的実験もその予想にそったものである (未発表)。一方、近年、Smad 系が 100% 活性化するためには、複数のシグナルが平行して活性化され、Smad の linker 部がリン酸化されている必要があることが報告された。例えば、網膜色素上皮細胞やグリア細胞による剝離網膜の線維化発症時に Rho キナーゼの阻害⁶³⁾や p38 MAP キナーゼの阻害⁶⁴⁾も剝離網膜の線維化に抑制的な効果を発揮したと報告された。Kimoto ら⁶⁴⁾

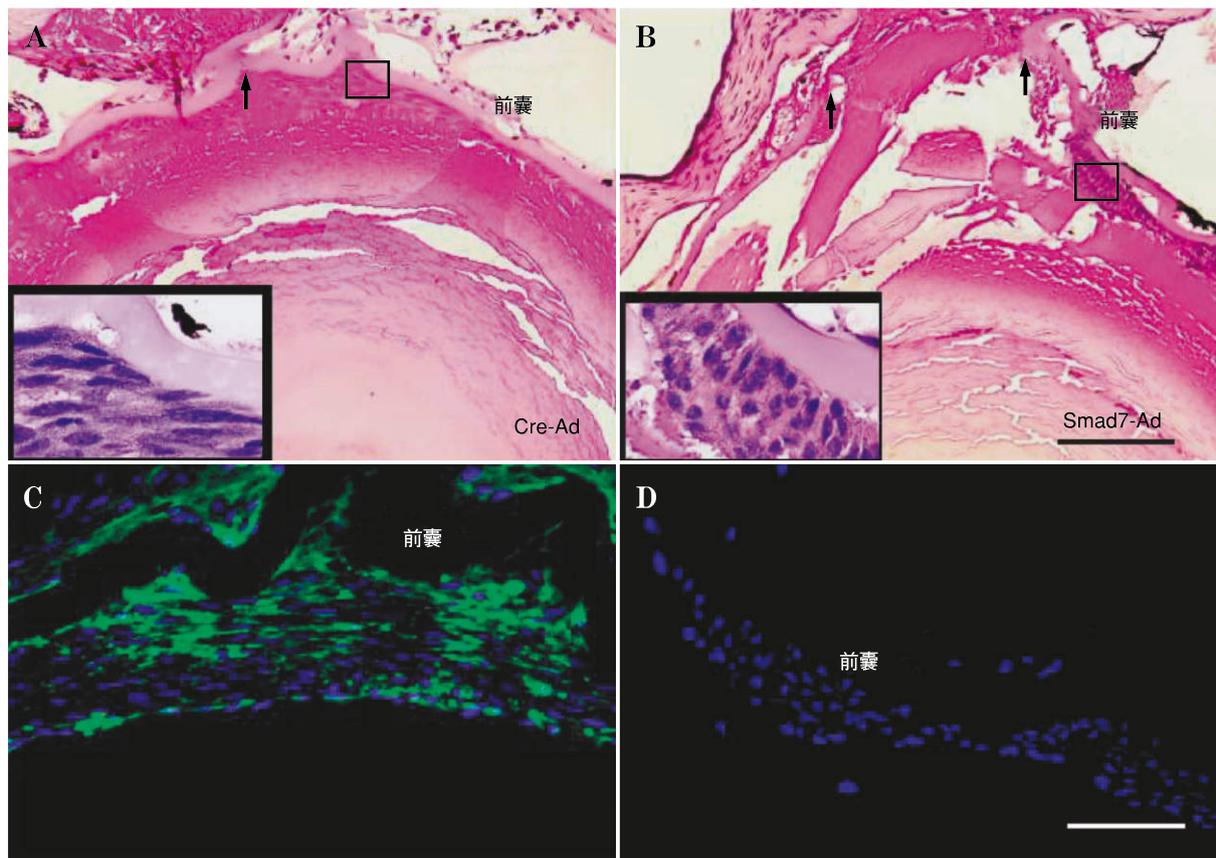


図 12 Smad 7 導入による水晶体上皮細胞の上皮間葉系移行の阻害。

HE 染色で、野生型マウスの傷害水晶体では、損傷後 5 日で上皮細胞は紡錘型に変化していたが(A)、Smad 7 遺伝子導入の組織では、細胞は上皮様の形態を保っていた(B)。さらに α 平滑筋アクチンの発現を免疫組織化学的に検討すると、対照では、紡錘形の細胞は染色され(C)、筋線維芽細胞に変化しており、上皮間葉系移行が完成していたが、Smad 7 導入はこの変化を阻止した(D)。バーは 100 μm (A, B), 16 μm (Inserts in A, B), 50 μm (C, D)。(文献 62 から引用)

は ARPE-19 で p38 MAP キナーゼの阻害が I 型コラーゲンの産生とプロモーター活性を抑制することを見出し、p38 MAP キナーゼが TGF β によるコラーゲン発現に必要であると報告した。我々も同様の結果を得た⁶⁵⁾が、さらに Smad 反応性プロモーターの活性のルシフェラーゼアッセイを行い、p38 MAP キナーゼ活性の Smad 系への影響を検討した。その結果、p38 MAP キナーゼ活性の阻害は TGF β /Smad 系に負に働くことが判明した。この結果を受けて、マウスの実験的網膜剝離眼に dominant-negative p38 MAP キナーゼをアデノウイルスベクターで遺伝子導入したところ、色素上皮細胞を中心とした線維化組織の形成が抑制された⁶⁵⁾。同様の実験結果は実験的肝硬変モデルでも報告⁶⁶⁾されており、このシグナルも増殖硝子体網膜症の遺伝子治療の標的となり得ると考えられる。

また、緑内障濾過手術後の濾過胞の創傷治癒を考えた場合も同様の戦略が適応できる。結膜の濾過胞の創傷治癒には眼内から濾過された房水の影響、結膜創局所での線維芽細胞の挙動、マクロファージの浸潤が深く関与している。それらの産生する各種成長因子やサイトカイン

の影響は大きい。著者らはその中でも癒痕化に深く関与している成長因子として TGF β に注目した。房水には TGF β 2 が多く含まれ⁶⁷⁾、結膜創局所では線維芽細胞が中心となって TGF β 1 の産生が行われている⁶⁸⁾。現在、臨床面で MMC が術後癒痕化抑制の目的で使用され一定の成績をあげているが重篤な合併症も報告⁶⁹⁾されている。また、MMC にかわるものとして TGF β 2 中和抗体による癒痕抑制が考えられ、実際欧州では治験が開始されている⁷⁰⁾。しかしながら、TGF β は通常の組織修復にも関与しているため、TGF β の働きをおしなべて抑制するのではなく、癒痕に特異的なシグナルのみ抑制した方が生体にとっては有利である。つまり、Smad 系のシグナル伝達抑制が一つの候補となる。Smad 7 は抑制系の Smad であり、各 TGF β アイソフォームのシグナル伝達を調整しており β 1、 β 2 いずれのアイソフォームのシグナルも制御している。このため、Smad 7 を用いることで TGF β のアイソフォームにとらわれることなく、TGF β のシグナルを抑制することが可能である。著者らはこの概念のもと、以下に試験的結果ではあるが、研究成果を述べる。

まず, *in vitro* で培養ヒト結膜下線維芽細胞の α 平滑筋アクチンと, I 型コラーゲンの発現に対する Smad 7 導入の影響を検討した. α 平滑筋アクチンの発現は対照に比べ, Smad 7 遺伝子導入された培養細胞で減弱していた. また, 線維化に関係する代表的な細胞外マトリックス成分である I 型コラーゲンは免疫染色と ELISA での検討で, 対照では TGF β 1 添加により発現が増強するが, Smad 7 遺伝子導入された細胞では TGF β 1 添加でも発現の増強は認められないという結果であった. つまり, Smad 7 遺伝子導入により外因性の TGF β 1 により誘導されたコラーゲンの産生が抑制されていることがわかった(未発表).

培養細胞での実験結果を受けて, *in vivo* での検討を行った. マウス結膜創傷治療に対する Smad 7 の影響を検討した. 全身麻酔下に C 57 BL 6 マウス結膜をスプリング尖刃で機械的に全周剥離し Smad 7 アデノウイルスベクターを点眼投与した. 創作成後, 経時的に免疫組織化学的に検討した. HE 染色では創作製 5 日後の対照マウス結膜では浮腫が強く結膜上皮欠損部もまだ完全に被覆されていない. それに対し, Smad 7 遺伝子導入されたマウス結膜では浮腫も少なく, 結膜上皮の進展も対照より良好であった(未発表). いくつかのマーカーで創傷治療を詳細に検討した. Smad 7 は正常組織, 対照でもわずかに認められ, Smad 7 遺伝子導入された結膜では強い外因性の Smad 7 の発現とリン酸化 Smad 2 の減弱を認めた. これは, アデノウイルスベクターによって導入された外因性の Smad 7 が内因性の Smad 2 リン酸化を抑制した結果であると考えられる. また, 組織収縮に関与する α 平滑筋アクチン発現の減弱とマクロファージの創傷部の結膜下組織への侵入も抑制されていた(未発表). 以上の結果から, Smad 7 が組織の収縮や炎症に抑制的に働いていることを示す結果であると考えた.

しかし, TGF β のシグナル伝達経路は Smad 系以外にも JNK や MAP キナーゼや p38 MAP キナーゼといった経路が存在している²⁶⁾²⁷⁾. 先に述べたように, TGF β は通常の組織修復にも深くかかわっており, TGF β の働きをおしなべて抑制するのではなく, 瘢痕化により特異的である Smad 系のシグナルのみを抑制することで TGF β の他の働きを残しつつ, 瘢痕や炎症の抑制効果を期待できるものとする. これは生体維持にとって必要である機能(組織修復)を残しつつ, 生体には不利である部分(線維化)を取り除くという点で合理的であると考えられる. 今回示したように, Smad 7 強制発現による Smad 系の抑制で角結膜, 水晶体, 網膜での瘢痕抑制効果が認められ, 今後の臨床応用への可能性を示している. さらに近年, Smad 経路と他のシグナルのクロストークの Smad 経路による遺伝子発現制御に重要であるという報告も増加しつつあるので, 今後の研究の発展を期待する.

2. 腫瘍特異的なシグナル伝達物質の阻害による腫瘍性疾患の治療方法の探索

上述のように, 正常組織の創傷治療過程でも眼悪性腫瘍でも細胞の増殖には古典的 MAP キナーゼが大きく関与している. このことは, 古典的 MAP キナーゼの抑制による悪性腫瘍の非外科的治療の可能性を示唆するものである. 実際, 古典的 MAP キナーゼ阻害薬による実験的悪性腫瘍の治療効果が報告された. 著者らは先に述べた眼表面の扁平上皮癌での Shh の発現と, その腫瘍細胞増殖促進効果に注目し, このシグナルの阻害による治療効果の検討を計画している. Shh は細胞膜上に存在する Smoothed(Smo)および Patched(Ptc)と呼ばれる 2 種類の膜蛋白質で構成される受容体を介して, 細胞内にシグナルを伝達する. リガンド結合分子である Ptc はシグナル伝達の機能を担う Smo の活性を抑制する分子であり, Shh の Ptc への結合はこの抑制を解除することで結果的に細胞内へシグナルを伝達すると考えられている. Shh シグナル非存在下では, Gli 2/3 はほとんどが細胞質に存在する. Gli 2/3 の一部は PKA 依存的なプロセッシングを受け, 抑制型 Gli 2/3 として核内に移行し, 遺伝子発現を抑えている. Shh シグナル存在下では, Gli 2/3 は活性化されて核内に移行し, コアクチベーター CBP と結合して標的遺伝子の発現を誘導する. シクロパミンは Shh の Smo と Ptc への結合を阻害することでこの経路を遮断する物質である.

著者らの試験的研究では, 培養扁平上皮癌細胞株のリコンビナント Shh 添加による細胞増殖促進効果をシクロパミンが阻害した(未発表). このことは *in vivo* でも眼上皮性悪性腫瘍をシクロパミン投与で治療できる可能性を示唆する. 実験動物レベルでは, 前立腺癌⁷¹⁾や膵臓癌⁷²⁾でシクロパミンによる治療効果の可能性が近年報告された. 著者らは, 野生型マウスでは腫瘍誘発効果が出にくいので, 以下のように XPC ノックアウトマウスを用いた. ヒトの色素性乾皮症は常染色体劣性遺伝性の光線過敏性皮膚疾患で, 短時間の日光照射をうけることにより強い日焼けを生じ, 紅斑, 色素沈着について乾燥, 萎縮を起こす. 結膜や角膜の充血や潰瘍ができるなどの眼症状が知られている. これらの皮膚病変部位に正常の数千倍の高頻度で悪性腫瘍(基底細胞癌 basal cell carcinoma, 扁平上皮癌 squamous cell carcinoma, 悪性黒色腫 melanoma など)を生じる⁷³⁾. UV 照射によって DNA に生じたピリミジン二量体(pyrimidine dimer)を主鎖から切断除去し, 新しいヌクレオチドをうめて DNA を修復するヌクレオチド除去修復(nucleotide excision repair, NER)機構の異常と考えられている. 現在, A~G 群, variant の計 8 つの遺伝的相補群の存在が確認されている. NER は紫外線照射により生じるピリミジン二量体の他に, 化学発癌剤などにより修飾された塩基をもつ DNA を修復する⁷⁴⁾. XPC ノックアウト

マウスでは、この DNA 修復が遺伝子欠損で不十分である。

腫瘍誘発は以下の手順で行った。XPC ノックアウトマウス (KO マウス, 生後 6 週齢) $n=40$ 眼と wild type マウス (WT マウス, 生後 6 週齢) $n=4$ 眼を用いた。暗室飼育下に化学発癌剤 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (以下 DMBA, 濃度 $0.2 \mu\text{g}/0.2 \text{ ml}$ アセトン) と Phorbol 12 myristate 13 acetate (以下 TPA, 濃度 $20 \text{ nM}/200 \text{ ml}$ アセトン) を週 2 回 $50 \mu\text{l}$ ずつ 2~8 か月間、屠殺時まで眼瞼に塗布して上皮性腫瘍を誘発して発生腫瘍の考察を行った⁷⁵⁾。誘発した腫瘍でソニックヘッジホッグの発現を細胞質に認めた (未発表)。

この腫瘍にシクロパミンを局所投与したところ、パラフィン切片での BrdU 取り込みと TUNEL 染色で、それぞれ細胞増殖の低下とアポトーシスの増加を観察した (未発表)。

一方、細胞のシグナル伝達の調節を介した細胞の増殖や分化の制御による眼組織の線維化の治療には、上記のような分子生物学的な先端的手法を用いた治療法のみならず、東洋医学で使用される漢方製剤の化学的成分によっても可能であると考えられる。肝臓の線維化抑制には肝星細胞の増殖と細胞外マトリックス産生が大きな役割を演じているが、漢方製剤の inchin-ko-to の成分である geniposide は体内での代謝の結果、genipin となり⁷⁶⁾、抗線維化効果を発揮することが知られている⁷⁷⁾。著者らは genipin が、培養網膜色素上皮細胞や a-TN 4 水晶体上皮細胞株の増殖や成長因子の発現、細胞外マトリックス産生を抑制することを見出しており (未発表)、今後の実験動物での上記のような創傷モデルを用いた *in vivo* での検討が待たれるところである。

本総説では、腫瘍組織で得られた細胞増殖の調節機構の研究成果を角結膜、水晶体、網膜での創傷治癒の治療方法の開発に応用した。眼腫瘍では、組織病理学的に類似している場合でも、細胞増殖に関与するシグナルの状態は異なり、細胞増殖の亢進は腫瘍の悪性度を示唆すると考えられた。主に増殖因子のシグナル伝達を調節することが腫瘍や外傷、手術後の合併症の新しい治療方法として有望であることを記載した。各種の病態に関与する好ましくない増殖因子シグナルのみを制御 (抑制) することで、細胞増殖を抑制するあるいはそれに関連した細胞の好ましくない挙動を阻害でき、腫瘍の非外科的治療の可能性のみならず、外傷や手術後の創傷治癒に関連する合併症の治療の可能性に焦点を当てた。今後、これらの方向から臨床応用へ向かってさらなる研究を継続したいと願っている。

本研究を行うに当たり、大島 章教授 (和歌山県立医科大学第一病理学教室)、仙波恵美子教授 (和歌山県立医科大学第二解剖学教室)、石橋達朗教授 (九州大学大学院医学部眼科学教室)、田原昭彦教授 (産業医科大学眼科学教室)、吉富健志

教授 (秋田大学医学部眼科学教室)、坂本泰二教授 (鹿児島大学医学部眼科学教室)、村田敏規教授 (信州大学医学部眼科学教室) に御助言をいただきましたことを感謝いたします。

摺筆に当たり、これまで御指導いただきました故生井 浩教授、谷口慶晃教授、猪俣 孟教授、故 Toichiro Kuwabara 教授、上野山謙四郎教授に深謝いたします。

文 献

- 1) **Martin GS** : Cell signaling and cancer. *Med Gen Med* 6 : 24, 2004.
- 2) **Clark RAF** : Wound repair. In : Clark RAF, et al (Eds) : The molecular and cellular biology of wound repair. Plenum Press, New York : 3-50, 1998.
- 3) **Gu J, Nada S, Okada M, Sekiguchi K** : Csk regulates integrin-mediated signals : Involvement of differential activation of ERK and Akt. *Biochem Biophys Res Commun* 3 : 973-977, 2003.
- 4) **Wetmore C** : Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation : Insight gained from human tumors and animal models. *Curr Opin Genet Dev* 13 : 34-42, 2003.
- 5) **Klenkler B, Sheardown H** : Growth factors in the anterior segment : Role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Exp Eye Res* 5 : 677-688, 2004.
- 6) **Yamada KM, Gailit J, Clark RAF** : Integrins in wound repair. In : Clark RAF, et al (Eds) : The molecular and cellular biology of wound repair. Plenum Press, New York 311-338, 1998.
- 7) **Shaulian E, Karin M** : AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20 : 2390-2400, 2001.
- 8) **Jochum W, Passegue E, Wagner EF** : AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* 20 : 2401-2412, 2001.
- 9) **Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz I, Alraba A** : Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signaling pathway in skin tumors. *Nature* 389 : 876-881, 1997.
- 10) **Saika S, Miyamoto T, Yamanaka O, Kato T, Ohnishi Y, Flanders KC, et al** : Therapeutic effect of topical administration of SN 50, an inhibitor of nuclear factor-kB, in treatment of corneal alkali burns in mice. *Am J Pathol* 166 : 1393-1403, 2005.
- 11) **Thoft RA, Friend J** : The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24 : 1442-1443, 1983.
- 12) **Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, et al** : An SV 40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 614-621, 1995.
- 13) **Qiu P, Sosne G** : c-Jun activates wound healing-associated gene promoters and is transcription-

- ally regulated by thymosin $\beta 4$ (T $\beta 4$) in human corneal epithelial cells. ARVO abstract, 2005.
- 14) **Okada Y, Saika S, Hashizume N, Kobata S, Yamanaka O, Ohnishi Y, et al** : Expression of fos family and jun family proto-oncogenes during corneal epithelial wound healing. *Curr Eye Res* 15 : 824–832, 1996.
 - 15) **Okada Y, Saika S, Shirai K, Ohnishi Y, Senba E** : Expression of AP-1 (c-fos/c-jun) in developing mouse corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 241 : 330–333, 2003.
 - 16) **Zieske JD, Hutcheon AE, Guo X, Chung EH, Joyce NC** : TGF- β receptor types I and II are differentially expressed during corneal epithelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1465–1471, 2001.
 - 17) **Saika S, Okada Y, Miyamoto T, Yamanaka O, Ohnishi Y, Ooshima A, et al** : Role of p 38 MAP kinase in regulation of cell migration and proliferation in healing corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 100–109, 2004.
 - 18) **Sharma GD, He J, Bazan HE** : p 38 and ERK 1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing : Evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *J Biol Chem* 278 : 21989–21997, 2003.
 - 19) **Li W, Nadelman C, Henry G, Fan J, Muellenhoff M, Medina E, Gratch NS, Chen M, Han J, Woodley D** : The p38-MAPK/SAPK pathway is required for human keratinocyte migration on dermal collagen. *J Invest Dermatol* 117 : 1601–1611, 2001.
 - 20) **Saika S, Muragaki Y, Okada Y, Miyamoto T, Ohnishi Y, Ooshima A, et al** : Sonic hedgehog expression and role in healing corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 2577–2585, 2004.
 - 21) **Saika S, Kawashima Y, Miyamoto T, Okada Y, Tanaka SI, Ohmi S, et al** : Immunolocalization of prolyl 4-hydroxylase subunits, alpha-smooth muscle actin, and extracellular matrix components in human lens capsules with lens implants. *Exp Eye Res* 66 : 283–294, 1998.
 - 22) **Saika S, Miyamoto T, Tanaka T, Ishida I, Ohnishi Y, Ooshima A** : Latent TGFbeta binding protein-1 and fibrillin-1 in human capsular opacification and in cultured lens epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 85 : 1362–1366, 2001.
 - 23) **Saika S, Miyamoto T, Ishida I, Ohnishi Y, Ooshima A** : Osteopontin : A component of matrix in capsular opacification and subcapsular cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 1622–1628, 2003.
 - 24) **Shirai K, Okada Y, Saika S, Senba E, Ohnishi Y** : Expression of transcription factor AP-1 in rat lens epithelial cells during wound repair. *Exp Eye Res* 73 : 461–468, 2001.
 - 25) **Saika S, Miyamoto T, Kawashima Y, Okada Y, Yamanaka O, Ohnishi Y, et al** : Immunolocalization of TGF- $\beta 1$, - $\beta 2$ and - $\beta 3$, and TGF- β receptors in human lens capsules with lens implants. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238 : 283–294, 2000.
 - 26) **Roberts AB, Sporn MB** : Transforming growth factor- β . In : Clark RAF, et al (Eds) : The molecular and cellular biology of wound repair. Plenum Press, New York 275–308, 1998
 - 27) **Massague J** : How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1 : 169–178, 2000.
 - 28) **Saika S, Okada Y, Miyamoto T, Ohnishi Y, Ooshima A, McAvoy JW** : Smad translocation and growth suppression in lens epithelial cells by endogenous TGF $\beta 2$ during wound repair. *Exp Eye Res* 72 : 679–686, 2001.
 - 29) **Saika S, Miyamoto T, Ishida I, Shirai K, Ohnishi Y, Ooshima A, et al** : TGFbeta-Smad signalling in postoperative human lens epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 86 : 1428–1433, 2002.
 - 30) **Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, et al** : Mice lacking Smad 3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol* 1 : 260–266, 1999.
 - 31) **Saika S, Kono-Saika S, Ohnishi Y, Sato M, Muragaki Y, Ooshima A, et al** : Smad 3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury. *Am J Pathol* 164 : 651–663, 2004.
 - 32) **Saika S, Miyamoto T, Tanaka S, Tanaka T, Ishida I, Ohnishi Y, Ooshima A, et al** : Response of lens epithelial cells to injury : Role of lumican in epithelial-mesenchymal transition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 2094–2102, 2003.
 - 33) **Banh A, Deschamps PA, Gaudie J, Overbeek PA, Sivak JG, West-Mays JA** : Lens specific expression of TGF- β induces anterior subcapsular cataract formation in the absence of Smad 3 signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl)* ARVO abstract 2005. # 2882.
 - 34) **Robertson J, Hajjar A, Martin G, Gill H, Gaudie J, West-Mays JA** : Gene transfer of bioactive TGF- $\beta 1$ to the anterior chamber of the rodent eye induces anterior subcapsular cataracts and alterations to the trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl)* ARVO abstract 2005. # 2883.
 - 35) **Streilein JW, Cousins SW** : Aqueous humor factors and their effect on the immune response in the anterior chamber. *Curr Eye Res* 9 : 175–182, 1990.
 - 36) **Saika S, Okada Y, Miyamoto T, Ohnishi Y, Ooshima A, McAvoy JW** : Smad translocation and growth suppression in lens epithelial cells by endogenous TGF $\beta 2$ during wound repair. *Exp Eye Res* 72 : 679–686, 2001.
 - 37) **Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N** : Identifica-

- tion of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 277 : 494–498, 2000.
- 38) **Tanaka T, Saika S, Ohnishi Y, Ooshima A, McAvoy JW, Liu C, et al** : Fibroblast growth factor 2 : Roles of regulation of lens cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in response to injury. *Molecular Vision* 10 : 462–467, 2004.
 - 39) **Zhou M, Sutliff RL, Paul RJ, Lorenz JN, Hoying JB, Haudenschild CC, et al** : Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone. *Nature Med* 4 : 201–207, 1998.
 - 40) **Saika S, Miyamoto T, Ishida I, Barbour W, Ohnishi Y, Ooshima A** : Accumulation of thrombospondin-1 in post-operative capsular fibrosis and its down-regulation in lens cells during lens fiber formation. *Exp Eye Res* 79 : 147–156, 2004.
 - 41) **Lovicu FJ, Schulz MW, Hales AM, Vincent LN, Overbeek PA, Chamberlain CG, et al** : TGF β induces morphological and molecular changes similar to human anterior subcapsular cataract. *Br J Ophthalmol* 86 : 220–226, 2002.
 - 42) **Joo CK, Lee EH, Kim JC, Kim YH, Lee JH, Kim JT, et al** : Degeneration and transdifferentiation of human lens epithelial cells in nuclear and anterior polar cataracts. *J Cataract Refract Surg* 25 : 652–658, 1999.
 - 43) **Srinivasan Y, Lovicu FJ, Overbeek PA** : Lens-specific expression of transforming growth factor β 1 in transgenic mice causes anterior subcapsular cataracts. *J Clin Invest* 101 : 625–634, 1998.
 - 44) **Liu J, Hales AM, Chamberlain CG, McAvoy JW** : Induction of cataract-like changes in rat lens epithelial explants by transforming growth factor beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 388–401, 1994.
 - 45) **Ishida I, Saika S, Ohnishi Y** : Effect of minoxidil on rabbit lens epithelial cell behaviors *in vitro* and *in situ*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239 : 770–777, 2001.
 - 46) **Hinton DR, He S, Jin ML, Barron E, Ryan SJ** : Novel growth factors involved in the pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. *Eye* 16 : 422–428, 2002.
 - 47) **Casaroli-Marano RP, Pagan R, Vilaro S** : Epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy : Intermediate filament protein expression in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2062–2072, 1999.
 - 48) **Saika S, Kono-Saika S, Tanaka T, Yamanaka O, Ohnishi Y, Sato M, et al** : Smad 3 is required for dedifferentiation of retinal pigment epithelium following retinal detachment in mice. *Lab Invest* 84 : 1245–1258, 2004.
 - 49) **Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, et al** : Identification of Smad 7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389 : 631–635, 1997.
 - 50) **Nakao A, Fujii M, Matsumura R, Kumano K, Saito Y, Miyazono K, et al** : Transient gene transfer and expression of Smad 7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Clin Invest* 104 : 5–11, 1999.
 - 51) **Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, et al** : Smad 7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 125 : 178–191, 2003.
 - 52) **Phanish MK, Wahab NA, Hendry BM, Dockrell ME** : TGF-beta 1-induced connective tissue growth factor (CCN 2) expression in human renal proximal tubule epithelial cells requires Ras/MEK/ERK and Smad signalling. *Nephron Exp Nephrol* 25 : 100 : e 156–e 165, 2005.
 - 53) **Sakamoto T, Ueno H, Sonoda K, Hisatomi T, Shimizu K, Ohashi H, et al** : Blockade of TGF-beta by *in vivo* gene transfer of a soluble TGF-beta type II receptor in the muscle inhibits corneal opacification, edema and angiogenesis. *Gene Ther* 7 : 1915–1924, 2000.
 - 54) **Ueno H, Sakamoto T, Nakamura T, Qi Z, Astuchi N, Takeshita A, et al** : A soluble transforming growth factor beta receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther* 11 : 33–42, 2000.
 - 55) **Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, Miyamoto T, Ohnishi Y, Sato M, et al** : Expression of smad 7 in mouse eyes accelerates healing of corneal tissue after exposure to alkali. *Am J Pathol* 166 : 1405–1418, 2005.
 - 56) **Saika S, Miyamoto T, Yamanaka O, Kato T, Ohnishi Y, Flanders KC, et al** : Therapeutic effect of topical administration of SN 50, an inhibitor of nuclear factor-k B, in treatment of corneal alkali burns in mice. *Am J Pathol* 166 : 1393–1403, 2005.
 - 57) **Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, Flanders KC, Nakajima Y, Miyamoto T, et al** : Therapeutic effects of adenoviral gene transfer of bone morphogenic protein-7 on a corneal alkali injury model in mice. *Lab Invest* 85 : 474–486, 2005.
 - 58) **Tobari I, Iwaki Y, Miyake K** : Effect of tranilast eyedrops in preventing posterior capsule opacification : preliminary report. *J Cataract Refract Surg* 25 : 1394–1399, 1999.
 - 59) **Ishida I, Saika S, Okada Y, Ohnishi Y** : Growth factor deposition in anterior subcapsular cataract. *J Cataract Refract Surg*, in press
 - 60) **Mester U, Fabian E, Gerl R, Hunold W, Hutz W, Strobel J, et al** : Posterior capsule opacification after implantation of CeeOn Edge 911 A, PhacoFlex SI-40 NB, and AcrySof MA 60 BM lenses :

- one-year results of an intraindividual comparison multicenter study. *J Cataract Refract Surg* 30 : 978—985, 2004.
- 61) **Nishi O** : Influence of intraocular lens material and design on the development of posterior capsule opacification. *Ophthalmologe* 14, 2005. [Epub ahead of print] German.
- 62) **Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, Sato M, Mura-gaki Y, Ohnishi Y**, et al : Transient adenoviral gene transfer of Smad 7 prevents injury-induced epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium in mice. *Lab Invest* 84 : 1259—1270, 2004.
- 63) **Zheng Y, Bando H, Ikuno Y, Oshima Y, Sawa M, Ohji M**, et al : Involvement of rho-kinase pathway in contractile activity of rabbit RPE cells *in vivo* and *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 668—674, 2004.
- 64) **Kimoto K, Nakatsuka K, Matsuo N, Yoshioka H** : p38 MAPK mediates the expression of type I collagen induced by TGF-beta 2 in human retinal pigment epithelial cells ARPE-19. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 2431—2437, 2004.
- 65) **Saika S, Yamanaka O, Ikeda K, Kim-Mitsuyama S, Flanders KC, Yoo J**, et al : Inhibition of p38 MAP kinase suppresses fibrotic reaction of retinal pigment epithelial cells. *Lab Invest* 85 : 838—850, 2005.
- 66) **Furukawa F, Matsuzaki K, Mori S, Tahashi Y, Yoshida K, Sugano Y**, et al : p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad 3 phosphorylation in rat myofibroblasts. *Hepatology* 38 : 879—889, 2003.
- 67) **Jampel HD, Roche N, Stark WJ, Roberts AB** : Transforming growth factor-beta in human aqueous humor. *Curr Eye Res* 10 : 963—969, 1990.
- 68) **Saika S, Yamanaka O, Baba Y, Kawashima Y, Shirai K, Miyamoto T**, et al : Accumulation of latent transforming growth factor-beta binding protein-1 and TGF beta 1 in extracellular matrix of filtering bleb and of cultured human subconjunctival fibroblasts. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239 : 234—241 2001.
- 69) **Belyea DA, Dan JA, Stamper RL, Lieberman MF, Spencer WH** : Late onset of sequential multifocal bleb leaks after glaucoma filtration surgery with 5-fluorouracil and mitomycin C. *Am J Ophthalmol* 124 : 40—45 1997.
- 70) **Mead AL, Wong TT, Cordeiro MF, Anderson IK, Khaw PT** : Evaluation of anti-TGF-beta 2 antibody as a new postoperative anti-scarring agent in glaucoma surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 3394—3401, 2003.
- 71) **Karthadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Beachy PA**, et al : Hedgehog signaling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 431 : 707—712, 2004.
- 72) **Thayer SP, Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Hebrok M**, et al : Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 425 : 851—856, 2003.
- 73) **塩見忠博** : 色素性乾皮症 G 群遺伝子の機能とその欠損病態. 蛋白質, 核酸, 酵素. 46 : 902—907, 2001.
- 74) **中津可道** : 転写と共役した DNA 修復とその欠損症. 蛋白質, 核酸, 酵素. 46 : 908—915, 2001.
- 75) **Sands AT, Abuin A, Sanchez A, Conti CJ, Bradley A** : High susceptibility to ultraviolet-induced carcinogenesis in mice lacking XPC. *Nature* 377 : 162—165, 1995.
- 76) **Inao M, Mochida S, Matsui A, Eguchi Y, Yulutuz Y, Wang Y**, et al : Japanese herbal medicine Inchin-ko-to as a therapeutic drug for liver fibrosis. *J Hepatol* 41 : 584—591, 2004.
- 77) **Imanishi Y, Maeda N, Otagawa K, Seki S, Matsui H, Kawada N**, et al : Herb medicine Inchin-ko-to (TJ-135) regulates PDGF-BB-dependent signaling pathways of hepatic stellate cells in primary culture and attenuates development of liver fibrosis induced by thioacetamide administration in rats. *J Hepatol* 41 : 242—250, 2004.

Comment : 箕田 健生

大西克尚教授の第 109 回日本眼科学会総会、特別講演 1 “細胞増殖調節機構の解明と治療への応用” は、眼腫瘍と眼の手術や外傷後の組織における細胞増殖因子のシグナル伝達の動態を分子生物学的手法で検討し、さらに遺伝子導入技術を利用してシグナル伝達の制御による治療の可能性を探索した、斬新で意欲的な研究である。

先端的研究であるので、一般の眼科医にとっては目新しい多くの増殖因子の用語が使用され難解な点があるが、その研究成果を筆者なりに要約すると以下のようである。

1. 眼腫瘍に関する知見

1) 黒色細胞腫(良性)と悪性黒色腫とで、細胞増殖因子である Erk 1, Cyclin D1, c-Fos, c-Jun を免疫組織化学的に両者で比較すると、4 者はいずれも悪性黒色腫で顕著であった。視神経乳頭部に発生する黒色細胞腫は稀に悪性化することがあり、また乳頭附近に発生する脈絡膜悪性黒色腫は黒色細胞腫と臨床的に鑑別が困難なことがあるので、このような例では、これらのマーカーが診断補助法として応用できることが示唆された。

悪性黒色腫では従来の病理組織所見から、類上皮型は紡錘型に比べて予後が不良であることが知られているが、両者において上記増殖因子の発現度に差がみられるか否か興味もたれる。

2) 細胞の増殖分化を調節する Shh は Smo および Ptc と呼ばれる受容体を介して細胞内にシグナルを伝達するが、シクロパミンは Shh の Smo と Ptc への結合を阻害する物質である。このシクロパミンの添加によって培養扁平上皮癌の細胞増殖が阻害された(未発表データ)。したがって、眼上皮性悪性腫瘍へのシクロパミン治療の可能性が示唆された。

2. 角膜外傷に関する知見

ラット角膜上皮欠損作成後に周辺の上皮細胞に c-Fos, c-Jun が一過性に発現し、また Shh も上皮先端に発現した。また角膜アルカリ外傷で、対照では著明な上皮混濁を残したのに、アデノウイルスベクターによりシグナル伝達抑制遺伝子 Smad を導入した眼では、角膜の透明治癒が得られ、 α 平滑筋アクチンの発現、マクロファージの侵入、血管新生のすべてが抑制されることが明らかにされた。

3. 水晶体外傷に関する知見

ラット水晶体前囊切開後に c-Fos mRNA の発現がみられ、また水晶体中の TGF β 2 は徐々に減少し、FGF 2 は徐々に増加し、5 日後に両者の濃度は逆転した。すなわち、TGF β 2 は水晶体上皮細胞の増殖を抑制し、FGF 2 は促進していることが明らかになった。またマウスの外傷水晶体で、アデノウイルス Smad 7 導入眼では、上皮細胞の上皮間葉系移行による線維化を抑制し、 α 平滑筋アクチンの発現を阻害した。したがって、ヒトの後発白内障が Smad 系阻害で予防または治療ができる可能性が示された。

4. 実験的網膜剥離に関する知見

マウスの実験的網膜剥離下の色素上皮系細胞は野生型では紡錘形細胞の重層化・線維化、 α 平滑筋アクチンの発現がみられたが、シグナル伝達系の Smad 3 ノックアウトマウスでは線維形成も平滑筋アクチンの発現もみられなかった。したがって、TGF β /Smad 3 シグナル阻害が増殖硝子体網膜症の予防につながる可能性が示唆された。

以上述べたように、本研究は眼腫瘍と眼の手術や外傷後の合併症の予防と治療に細胞増殖因子のシグナル伝達の制御が有用であることを実験的に示したものであり、将来の臨床応用が大いに期待される。