総　説

網膜の細胞増殖制御におけるp27(KIP 1)の役割

加瀬　諭, 吉田　和彦, 大野　重昭
北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻感覚器病学講座眼科学分野

要　約

細胞の増殖は主として細胞周期に依存している．p27(KIP 1)は細胞周期の進行を制御する蛋白質として，1994年にクローニングされた．ヒト網膜は胎生期には盛んに増殖，分化し，出生時には3層の有核細胞層を形成する．実際に，網膜は発達に伴いp27(KIP 1)発現細胞が増加し，増殖細胞は次第に減少し，消失する．代表的な網膜疾患である網膜芽細胞腫は胎生期の，増殖硝子体網膜症は出生後の増殖制御機構の異常により発症，進展する．これらにp27(KIP 1)の発現変化が重要な役割を果たすことが，近年明らかになってきた．本稿では，網膜の発生，病理，眼底疾患におけるp27(KIP 1)のかかわりを述べ，p27(KIP 1)の発現機序の解明が新しい疾患治療標的になり得ることを示したい．(日眼会誌111：577—586，2007)

キーワード：網膜，p27(KIP 1)，cyclin D1，網膜芽細胞腫，網膜剝離

A Review

Role of p27(KIP 1) in Regulation of Retinal Cell Proliferation

Satoru Kase, Kazuhiko Yoshida and Shigeaki Ohno
Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Hokkaido University Graduate School of Medicine

Abstract

Cell proliferation mainly depends on cell cycles. p27(KIP 1) was cloned as a cell cycle inhibitor in 1994. In the retina, a variety of cells come to express p27(KIP 1) as development progresses, while the number of proliferating cells decreases. Human retinal cells show proliferation activity during embryonic stages, and subsequently differentiate into three neural retinal layers at the neonatal phase, when proliferating cells are no longer detected. The pathogenesis of retinoblastoma and proliferative vitreoretinopathy, major fundus disorders, is correlated with aberration of retinal cell proliferation. Recent research has shown that p27(KIP 1) plays important roles in this pathogenesis. In this review, we discuss the role of p27(KIP 1) in retinal development, and in the pathology of fundus disorders. We conclude that the clarification of the mechanisms of p27(KIP 1)expression might contribute to the discovery of a novel therapy targeting for human retinal diseases.
Nippon Ganka Gakkai Zasshi(J Jpn Ophthalmol Soc 111：577—586, 2007)

Key words：Retina, p27(KIP 1), Cyclin D1, Retinoblastoma, Retinal detachment

I　はじめに

ヒト網膜細胞は前駆細胞より発生し，神経細胞やグリア細胞へ分化，増殖する．胎生後の網膜は通常細胞増殖を停止し，生涯にわたり生理活性を全うする．つまり，我々の視覚を担う重要な組織の一つである網膜は，出生前後における緻密な細胞増殖の制御により正常な組織構築，機能発現が可能となる．しかし，その機構の障害は

別刷請求先：060-8638　札幌市北区北15条西7　北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻感覚器病学講座眼科学分野
加瀬　諭　E-mail：kaseron@med.hokudai.ac.jp
(平成18年11月29日受付，平成19年2月28日改訂受理)
Reprint requests to：　Satoru Kase, M. D., Ph. D.　Department of Ophthalmology & Visual Sciences, Hokkaido University Graduate School of Medicine. N 15, W 7, Sapporo city, Japan
(Received November 29, 2006 and accepted in revised form February 28, 2007)

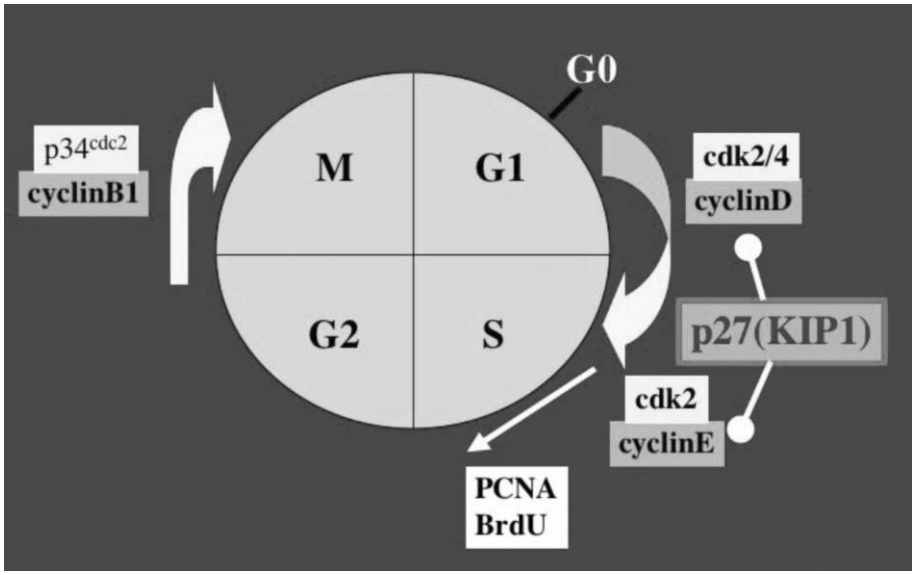

図 1 細胞周期関連蛋白質の概略.
細胞周期はDNA合成期(S期)，核分裂期(M期)，およびその間のG1，G2期と呼ばれるGap期よりなる．またG1期間に細胞周期を逸脱し，休止期に入った細胞はG0期にあるとみなされる．細胞増殖の起こりはG1に始まり，この期間に増殖シグナルが入った場合，細胞周期は進行し，細胞が分裂，増殖する．細胞周期の進行は主として二種類の因子に依存している．一つは細胞周期の進行を促進するサイクリン(cyclin)およびサイクリン依存性キナーゼ〔cyclin-dependent kinase(CDK)〕である．他方，進行を制御する因子としてサイクリン依存性キナーゼインヒビター〔CDK inhibitor(CKI)〕がある．これまで図に示すように，細胞周期の各期間で役割を果たす種々のcyclinsやCKIsが同定されてきた．proliferating cell nuclear antigen(PCNA)は主としてS期で合成される蛋白質であり，bromodeoxyuridine(BrdU)はS期にある細胞に取り込まれるため，両者は増殖活性マーカーとして知られている．

細胞の増殖異常を来し，重大な眼底疾患を発症する．例えば網膜芽細胞腫(retinoblastoma：RB)は胎生期網膜の[1)2)]，増殖硝子体網膜症(proliferative vitreoretinopathy：PVR)は生後の網膜細胞増殖の異常[3)~5)]により発症，進展することが知られている．細胞の増殖は主として細胞周期に依存しており，その進行には多くの蛋白質，酵素が関与している．近年，その細胞周期調節機構の解明が進みつつあるが，依然眼組織での解析は十分ではない．本稿ではまず細胞周期の概論を述べ，細胞周期の進行を制御するp27(KIP 1)(以下p27)の機能，発現機序，眼底疾患とのかかわりについて示す．

II 細胞周期と眼組織

細胞周期はDNA合成期(S期)，核分裂期(M期)，およびその間を埋めるGap期よりなる．M期からS期にかけてはG1期，一方S期からM期にかけてはG2期と呼ばれる(図1)．またG1期間に細胞周期を逸脱し，休止期に入った細胞はG0期にあるとみなされる．細胞増殖の起こりはG1に始まり，この間に増殖シグナルが入った場合，細胞は細胞周期にエントリーし分裂，増殖する[6)]．細胞周期の進行は主として二種類の因子に依存している．一つは細胞周期の進行を促進するサイクリン(cyclin)およびサイクリン依存性キナーゼ〔cyclin-dependent kinase(CDK)〕である．他方，進行を制御する因子としてサイクリン依存性キナーゼインヒビター〔CDK inhibitor(CKI)〕がある．つまり，前者は細胞周期を進行させるアクセル役，後者はブレーキ役として働き，両者により細胞周期のバランスを整えている．これまで細胞周期の各期間で，役割を果たす種々のcyclinsやCKIsが同定されてきた．主要なものを図1に示す．加えて，proliferating cell nuclear antigen(PCNA)は主としてS期で合成される蛋白質であり[7)8)]，bromodeoxyuridine(BrdU)はS期にある細胞に取り込まれるため[9)]，両者は増殖活性マーカーとして知られている(図1)．我々は，眼組織を構成する角膜や水晶体，毛様体組織においてG1-S期の進行や制御にかかわる細胞周期関連蛋白質として，主にCKIの一つであるp27が重要な役割を果たすことを報告してきた[10)~15)]．

III p27の発現，分解機構

p27は分子量27 kDaを有し，G1期で細胞周期を停止させる蛋白質として，1994年にクローニングされた[16)]．これまで細胞周期において，p27のmRNA発現量は変化しないことが明らかになっており[16)]，p27は主として蛋白質に翻訳された後の修飾によって，その発現が調節されていると考えられている．体細胞では，ユビキチン誘導性のプロテオソーム経路がp27の分解に関与していることが報告されている[17)]．その主要な機序と

して，細胞周期にエントリーした細胞では，p27はG1の後期からS期にかけて，CDK2の活性化に伴いスレオニン187にリン酸化(T187-phospho-p27)が起こり，その後Fボックス蛋白質であるSpk2を含むSkp1—Cullin—F-Box protein(SCF)複合体により認識され，蛋白基質にユビキチンという蛋白質が多数結合し，核内で分解される[18)~21)]．一方では，この期間に分解されなかったp27はセリン10のリン酸化(S10-phospho-p27)により，核から細胞質へ移送され，p27の発現が調節されていることが示唆されている[22)23)]．これまで，p27ノックアウト(-/-)マウスの解析では，甲状腺や副腎，生殖器系の過形成，下垂体腫瘍が発生することが報告された[24)]．Skp2$^{-/-}$マウスでは，気管支や腎尿細管上皮の肥厚，核の腫大，肝細胞や線維細胞のDNA量の異常などが表現型として確認された[25)]．近年，T187-phospho-p27はG1/S期における関与のみならず，G2からM期への移行にも重要な役割を果たすことが示されている[26)]．また，p34/cdc2(cdc2)がcyclin Bと協調しM期の進行に寄与し(図1)，p27との関連も示唆されている[27)28)]．我々はこれまで，角膜上皮，角膜内皮細胞および水晶体上皮細胞の発生過程においてp27を発現し，増殖活性が低下，消失することを報告してきた[11)12)14)]．さらに，Skp2によるp27の分解が角膜上皮の創傷治癒メカニズムに寄与すること，また後発白内障の発生病理にp27の分解が関与していることも示してきた[11)12)14)]．これらの背景を踏まえ，網膜の細胞増殖制御における細胞周期制御蛋白質であるp27の役割について，これまでの研究成果および今後の展望について述べたい．

Ⅳ　網膜の発生におけるp27の役割

Levineらは，p27陽性細胞はマウス胎生13日(E13)で網膜の中央付近に検出されると報告した[29)]．E14ころに眼杯内側と外側が癒合し，将来の感覚網膜と網膜色素上皮(RPE)の源基が構成される．このころから眼杯内側は神経芽細胞層(neuroblastic layer：NBL)や神経上皮層と呼ばれる[30)]．NBLの大部分は細胞密度が高く，楕円形の核を有するほぼ単一の細胞であり，外側に核分裂細胞が散在している(図2a)．E14では，p27陽性細胞は網膜中央付近では減少し，内層に散在性にみられ(図2b)，p27のリン酸化(T187-phospho-p27)は最外層の細胞に検出された(図2c)．大多数の細胞はBrdU陽性でS期にあり，盛んな細胞増殖活性を有している(図2d)．E21では，内層のp27陽性細胞層は2層に分かれ，外層にも薄い陽性細胞層が検出される[29)]．マウス生後1日(P1)ころには，NBLの内層では類円形の細胞に分化を示し，まず神経節細胞層(GCL)を構築する[31)](図2e)．この段階では，GCL細胞はp27蛋白質を発現し(図2f，*)，S期のマーカーであるBrdUは陰性となり(図2h)，細胞周期を逸脱したことが示唆される．NBLの最外層には核分裂像を呈する細胞が一列に配列している[30)31)]．すなわち最外層の細胞の多くはM期に存在する．我々はこれらを光学顕微鏡的に確認し，M期の細胞が陽性を示すリン酸化ヒストンH3蛋白質の免疫組織化学的検討にて，これらの網膜細胞が陽性になることを明らかにした[30)]．さらに生後網膜において，NBLの最外層の核分裂細胞にT187-phospho-p27が陽性になることを確認した(図2g，矢印)．これらから網膜の発生過程におけるG2期からM期の移行に，p27のリン酸化が関与していることが示唆された．

さらにマウス生後5日(P5)では，p27陽性細胞はGCLおよび網膜外層で著しく減少し，ほとんどが網膜内層の細胞だけとなる[29)]．2週ころには，GCLは一層の細胞層となり，残りのNBLが二層に分化し，各々外顆粒層(ONL)，内顆粒層(INL)を構成する(図2i)．免疫組織化学的検討により，INL内の核に散在性にp27の免疫活性を示す細胞が混在している(図2j)．併せて，これらの細胞はBrdU(図2l)およびPCNAは陰性であり，細胞増殖活性は消失していた[13)]．Müller細胞の軸索に特異的に発現されるglutamine synthetase(GS)の発現との比較により，INLにおけるp27を発現する細胞がMüller細胞であることが判明した[13)](図3c)．

さらにp27遺伝子半接合(+/−)マウスでは，p27陽性細胞がINLに検出されるが，p27$^{-/-}$では消失することが確認された[29)]．我々は，p27$^{-/-}$マウスを使用し，生後網膜について病理学的検討をしたところ，生後12週では野生型と比較し網膜の形態に大きな相違はなかったものの，多数のBrdU陽性の網膜細胞が検出された[30)]．p27$^{-/-}$マウスにおける免疫組織化学的検討では，これらの増殖細胞は視細胞やMüller細胞であり，加えて視細胞の分化異常，グリアの凝集が示唆された[29)]．Greenらは網膜前駆細胞に発現され網膜の細胞数を調節する転写因子*Chx10*を欠失させることにより，著明な小眼球を発症することを確認し，*Chx10*/*p27*のダブルノックアウトマウスにて小眼球の発症を抑制し得ることを報告した[32)]．これらの結果より，網膜の発達に伴う細胞増殖の停止に，p27が中心的な役割を果たすことが裏付けられた．

Ⅴ　RBの増殖とp27

RBは約1万5千人から2万人に一人の割合で発生するといわれている[33)34)]．患者は視覚を失う可能性ばかりでなく，その生命予後をも脅かされる重大な疾患である．ヒトあるいはマウスRBは各々*RB1*遺伝子，*RB*/*p107*の遺伝子変異により発症することが報告されている[35)36)]．もう一つの代表的な癌抑制遺伝子*p53*は細胞周期の停止やアポトーシスに関与し，ヒトRBでは野生型であると考えられている[1)]．*RB*/*p107*欠損マウスの解析では，主に神経節細胞や双極細胞，視細胞で細胞死

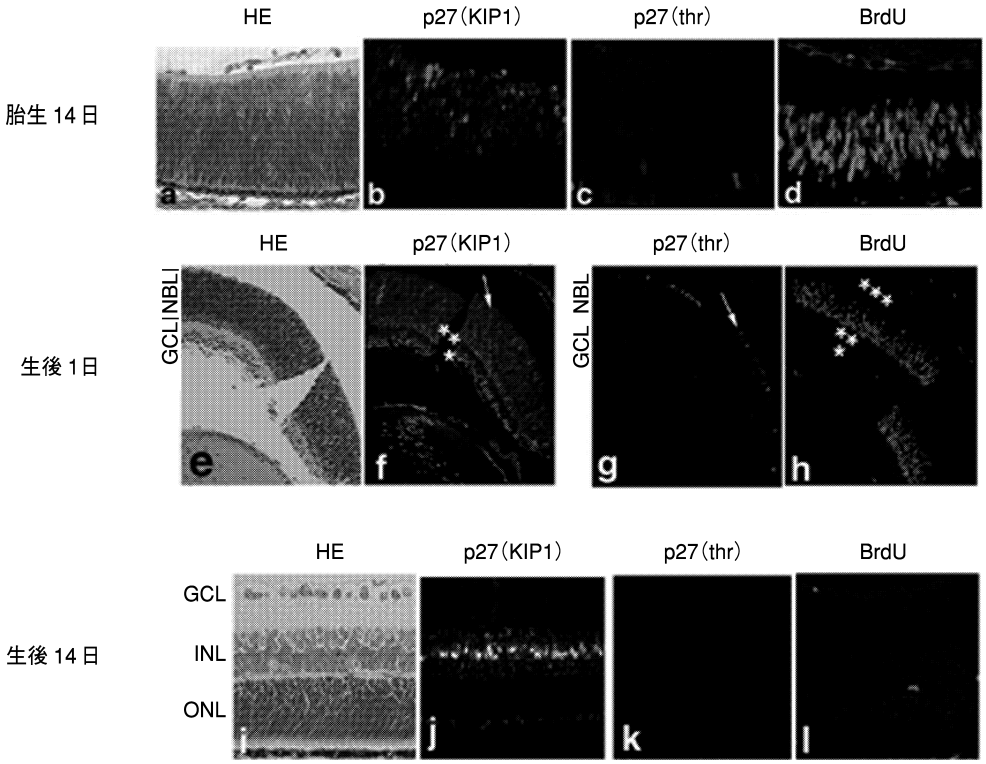

図 2 マウス網膜の発生過程における p27，p27 リン酸化および細胞増殖活性．

上段(a～d)は胎生 14 日，中段(e～h)は生後 1 日，下段(i～l)は生後 14 日の網膜を示す．胎生 14 日では，網膜は類円形の核を有する細胞で構成されており，明らかな分化はみられない(a)．内層で p27(b)，外層で p27 スレオニン 187 リン酸化(p27thr)を示す細胞がごく一部検出される(c)．S 期のマーカーである BrdU は，大部分の網膜細胞の核に陽性である(d)．生後 1 日では，神経芽細胞層(NBL)より類円形の核を有する神経節細胞層(GCL)が分化する(中段，e)．大部分の GCL(*)および NBL の内層(**)の細胞が p27 陽性を示し(中段，f)，p27thr は NBL の最外層の細胞に検出される(g，矢印)．BrdU は主として NBL の外層の細胞に陽性となっているが，GCL(*)，NBL の内層(**)，および最外層(***)では免疫活性が乏しい．生後 14 日では，感覚網膜は GCL，内顆粒層(INL)，外顆粒層(ONL)の緻密な 3 層構造を示している(下段，i)．INL では，核に p27 陽性を示す細胞が配列している(下段，j)．一方，p27 のリン酸化(下段，k)，および BrdU(下段，l)は陰性であった．

HE：ヘマトキシリン・エオジン染色

(文献 30 より引用，一部改変)

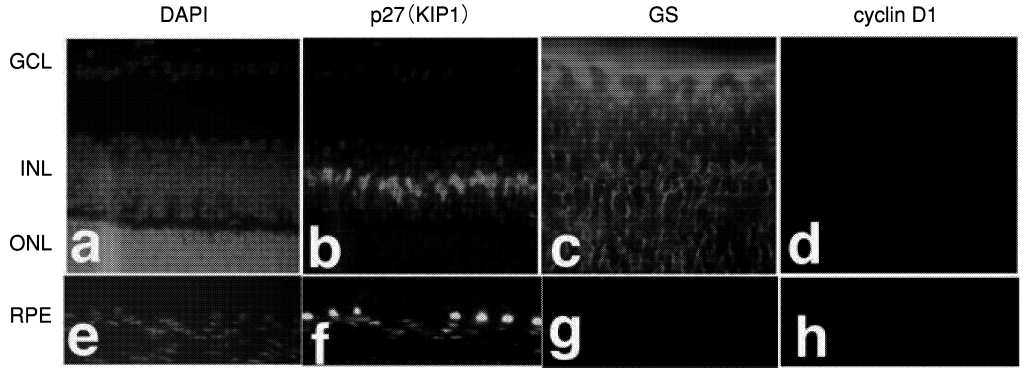

図 3 野生型マウス生後 14 日の感覚網膜(a～d)および網膜色素上皮(RPE)(e～h)における 4'6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)核染色(a，e)，p27(KIP1)(b，f)，glutamine synthetase(GS)(c，g)および cyclin D1(d，h)の発現．

DAPI 核染色により，網膜の 3 層の神経節細胞層(GCL)，内顆粒層(INL)，外顆粒層(ONL)，および一層の RPE が確認できる(a，e)．p27 は INL(b)および RPE(f)の細胞の核に免疫活性がある．GS は Müller 細胞の軸索および終足に陽性反応を示している(c)．感覚網膜および RPE に cyclin D1 の免疫活性は見出されない(d，h)．

(文献 13 より引用)

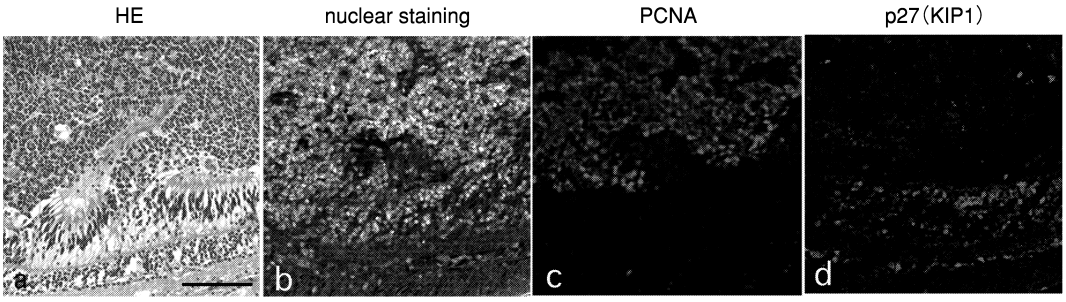

図 4　ヒト正常網膜および網膜芽細胞腫(RB)組織の境界部における核染色(b)，PCNA(c)，および p27(KIP 1)(d)の発現.
HE および核染色では，下方に正常網膜，上方には RB が検出される(a，b)．PCNA は大部分の腫瘍細胞の核に陽性を示しているが，正常網膜は陰性である(c)．p27 は正常網膜の大部分の細胞の核に陽性になっているが，腫瘍組織には陰性になっている(d)．
バーは約 50 μm を示唆する．(文献 40 より引用，一部改変)

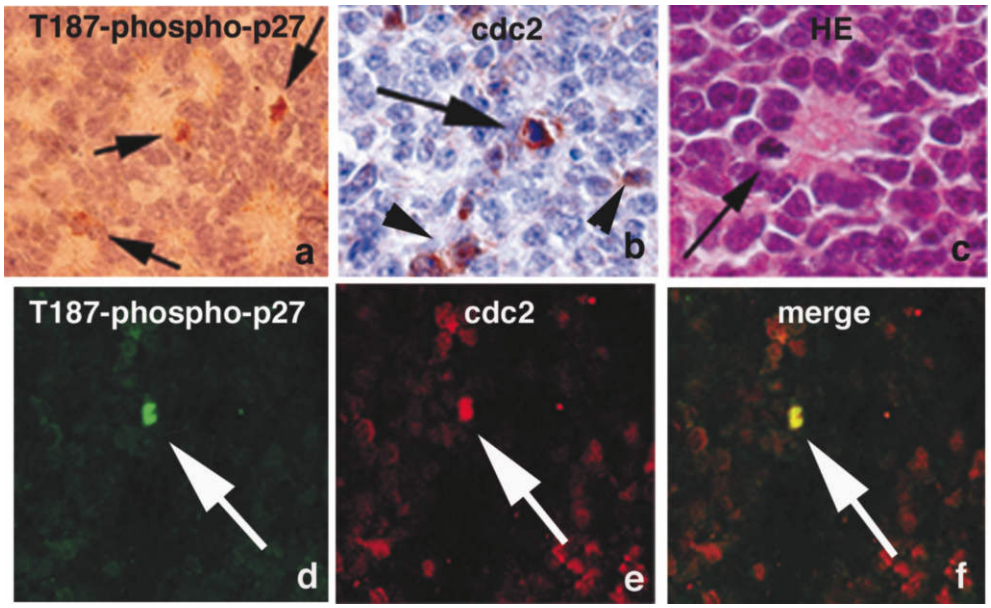

図 5　ヒト RB 組織における p27 スレオニンリン酸化(T187-phospho-p27)，および cdc2 の発現.
RB の核分裂細胞に T187-phospho-p27(a，矢印)および cdc2(b，矢印)の免疫活性が見出される．形態学的に，RB の腫瘍組織内に核分裂像(c，矢印)を確認することができる．Cdc2 は散在性に，非核分裂腫瘍細胞の核にも陽性反応を示している(b，矢頭)．RB 組織における T187-phospho-p27 と cdc2 の蛍光二重染色法を示す(d〜e)．T-187-phospho-p27 陽性腫瘍細胞(d)は緑色，cdc2 陽性細胞は赤色で発色され(e)，両者の同一の局在を示す腫瘍細胞が黄色調に発色される(f，矢印)．(文献 27 より引用，一部改変)

が誘発され，他方アマクリン(前駆)細胞は発達過程において細胞周期の逸脱，細胞死が起こらず，RB の発症に寄与することが示唆されている[36]．一方最近では，正常と思われていた p53 の経路の不活化が，この細胞死抵抗性の獲得よりも RB の発症に関与しているとの報告がある[1]．これらの報告は，RB における細胞周期の機能解析は，腫瘍細胞の浸潤や転移を予防する新しい治療法の開発に貢献し得ることを示唆している．本報告では，RB における p27 の関与，細胞周期関連蛋白質の変化についてもう少し詳しく考察してみる．*RB1* 遺伝子産物は Rb 蛋白質を発現し，Rb は G1 期において cyclin E/CDK 2 複合体に作用し，細胞増殖制御にかかわる．さらに *in vitro* の研究で，Rb は p27 と協調して G1-S 期の進行を制御していることが示唆された[37]．近年，$Rb^{-/-}$マウスおよび *in vitro* の解析にて，Rb および p107 は Spk2—p27 の経路に作用し，Spk2 による p27 のユビキチン化，分解を阻害することにより，p27 の安定化，S 期への進行を制御していることも示された[38][39]．一方，ヒト RB 組織の解析では，大多数の腫瘍細胞は PCNA の免疫活性を有しており，S 期に存在することが明らかとなっている[40][41]．また我々は，正常網膜と腫瘍部の境界を観察すると，p27 蛋白質はヒト正常網膜

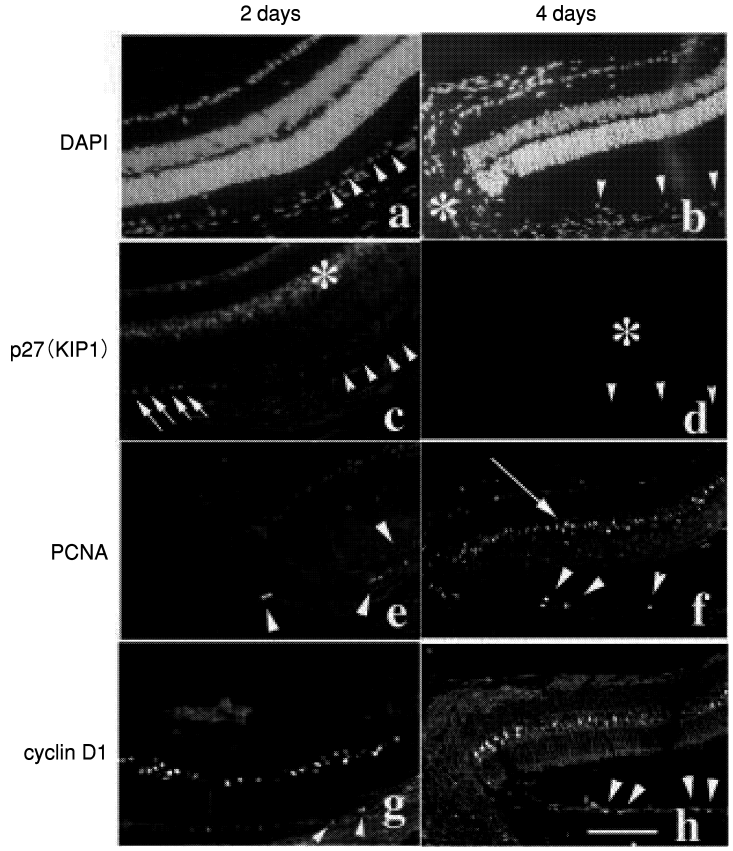

図 6 マウス網膜剝離作製2日後(a，c，e，g)および4日後(b，d，f，h)における DAPI 核染色(a，b)，p27(KIP1)(c，d)，PCNA(e，f)および cyclin D1(g，h)の発現.
DAPI 核染色にて，マウス感覚網膜が網膜色素上皮より剝離しているのが確認できる(a，b，矢頭)．網膜剝離2日後では，網膜 Müller 細胞(c，星印)，RPE(c，矢頭)に p27 が陽性であるが，PCNA はほとんどの細胞に陰性である(e)．p27 は剝離4日後で発現は消失し(d)，PCNA は大部分の Müller 細胞(f，矢印)および RPE(f，矢頭)に陽性となる．cyclin D1 は2日(g)から4日後(h)にかけて Müller 細胞および RPE の核に陽性となっている．
バーは約 50 μm を示唆する．(文献 43 より引用，一部改変)

では高発現しており，腫瘍部への移行で免疫活性が低下し，腫瘍細胞には検出感度以下であった(図 4)．以上より，今回のヒト RB 組織を解析した結果は，過去の *in vitro* の結果に矛盾するものでなかった．これまでの研究結果により，RB 細胞の増殖機構に p27 が潜在的に関与している可能性が示唆された．

RB は病理組織学的には，比較的分化度の高い症例では，Flexner-Wintersteiner rosette をはじめとするロゼット形成が観察され，その内腔には核分裂像が混在している[42]．組織切片のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色にて，核分裂細胞を確認することが可能である(図 5 c，矢印)．我々は，これらの核分裂細胞に T187-phospho-p27 があることを確認した(図 5 a，矢印)．さらに近年，T187-phospho-p27 には G2-M 期の進行制御にかかわる cdc 2(図 1)が，重要な役割を果たすことが示されてきた．RB 組織では，cdc 2 は散在性に腫瘍細胞の核に免疫活性があり(図 5 b，矢印および矢頭)，興味深いことに RB の核分裂細胞にも陽性になった(図 5 b，矢印)．我々は RB 組織を使用し，cdc 2 と T187-phospho-p27 との二重染色法により解析を行った．これらの cdc 2 陽性核分裂細胞(図 5 e，矢印)は T-187-phospho-p27(図 5 d，矢印)の免疫活性をも有していた[27](図 5 f，矢印)．これらの報告により，RB 細胞の M 期への進行に cdc 2 および p27 のリン酸化が関与することが明らかとなった．実際過去には，cyclooxygenase-2 (COX-2)を発現する腫瘍細胞に COX-2 選択的阻害剤処理し，G2/M 期の進行に作用する cyclin B の発現低下を誘導し，G2/M 期で細胞周期の進行を停止させることが可能であることを経験した[28]．これらのことは今後，RB の M 期制御における p27 の役割を解明することにより，新規蛋白酵素阻害剤が腫瘍の核分裂，増殖を抑制し得る可能性を示唆している．

VI PVR と p27 のかかわり

網膜剝離は臨床的には裂孔原性，牽引性，滲出性などに分類されるが，いずれも時間経過とともに Müller 細

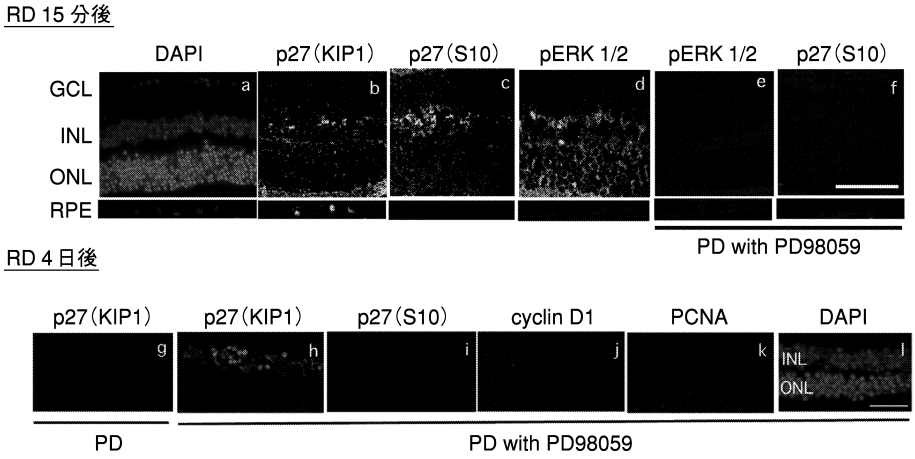

図 7　マウス網膜剝離(RD)後の ERK 阻害剤(PD98059)処理による細胞周期関連蛋白質の発現変化.
上段は RD 15 分後(a～f)，下段は RD 4 日後(g～l)の結果を示す．上段 a，および下段 l は DAPI 核染色を示す．RD 後 15 分では p27(上段，b)およびセリンリン酸化 p27〔p27(S10)〕(上段，c)は，内顆粒層(INL)細胞(本文より Müller 細胞)の核に免疫活性がみられる．このとき，Müller 細胞に ERK のリン酸化も検出される(上段，d)．一方，p27 リン酸化および ERK リン酸化は外顆粒層(ONL)および網膜色素上皮層(RPE)ではみられない(上段，c，d)．PD98059 を硝子体注入することにより，ERK リン酸化(上段，e)，および p27 セリンリン酸化(上段，f)が阻害される．RD 4 日後では，Müller 細胞における p27 は分解され，免疫活性が消失している(下段，g)．PD98059 処理することにより，p27 の分解が抑制され(下段，h)，p27 のリン酸化(下段，i)，cyclin D1(下段，j)，PCNA(下段，k)の発現はみられない．
上段のバーは 50 μm を示唆する．(文献 47 より引用，改変)

胞および RPE 細胞が増殖活性を有することが明らかになっている[3)~5)]．これらの増殖活性の獲得が，難治性の PVR の発症に関与するが，細胞周期関連蛋白質の役割は十分に解明されていない．成人の網膜 Müller 細胞および RPE 細胞は核に p27 の免疫活性があるが，細胞周期の進行に寄与する cyclin D1(図 1)の免疫活性はなく，増殖活性も有していない(図 3 d，h)．しかしながら，マウス実験的網膜剝離モデルを作製すると，剝離網膜 Müller および RPE 細胞に p 27 の発現が消失し(図 6 c，d)，cyclin D1(図 6 g，h)および PCNA(図 6 e，f)の発現が誘導される[43)](図 6)．これらの結果は p27，cyclin D1 の発現変化が，PVR の発生病理に関与する可能性を示唆している．

近年，メラノーマ細胞などある種の細胞株では，p27 のリン酸化および分解に extracellular signal-regulated kinase(ERK)1/2 の経路が関与していることが報告された[23)44)45)]．さらに ERK は cyclin D1 のプロモーター活性を誘導することも知られており[46)]，ERK のリン酸化(活性化)はこの 2 つの経路を介し細胞周期を進行させることが示されている．実際，正常の網膜では，網膜 Müller 細胞に ERK のリン酸化はみられず，網膜剝離にて剝離網膜の Müller 細胞に p27 のリン酸化(S 10-phospho-p27)，p27 の分解，PCNA の誘導があり，これらは ERK のリン酸化に伴い検出されることが確かめられた[47)](図 7 b～d)．さらに，ERK 1/2 リン酸化の選択的阻害剤である PD 98059 を硝子体内注入することにより，*in vivo* にて剝離網膜の Müller 細胞における p27 のリン酸化および p27 の分解阻害，併せて細胞増殖活性を低下させることに成功した[47)](図 7 h)．これらは，細胞周期関連蛋白質を標的とした眼増殖性疾患の新しい治療戦略になる可能性を示唆している．

これらの *in vivo* での実験的網膜剝離の変化をさらに裏付けるために，*in vitro* での解析も重要であることはいうまでもない．Geller らは，網膜剝離に伴い，fibroblast growth factor(FGF)受容体が Müller 細胞にて活性化されることを報告した[48)]．Hollborn らは，basic FGF(bFGF：10 ng/ml)を培養 Müller 細胞に処理すると，24 時間後に細胞増殖活性が約 50% 上昇し，PD 98059 処理にて増殖活性を著しく低下させることに成功した[49)]．これらの結果は，bFGF を培養 Müller 細胞に処理することにより，*in vitro* における網膜剝離モデルに準ずる環境を設定できる可能性を示唆している．これに従い，マウス Müller 細胞を培養し[50)]，bFGF にて処理することにより，Western blot 解析にて p27 の発現低下，および cyclin D1 の発現誘導が確認された[47)]．以上より，網膜剝離に伴う Müller 細胞の増殖活性の獲得に，p27 および cyclin D1 の発現変化を伴うことが，*in vivo* および *in vitro* の系で明らかとなった．

正常の RPE は Müller 細胞と同様に核に p27 の免疫活性が見出せるが，ERK のリン酸化はない．しかしながら，マウス網膜剝離では RPE においても p27 が分解され，PCNA が誘導されるが，Müller 細胞と異なり ERK リン酸化はみられなかった[47)]．一方，ネコやウサギを使用した網膜剝離実験では，剝離作製 15 分で Mül-

ler細胞のみならずRPEにERKのリン酸化が検出された[48]．これは，解析された動物種の相違によるものか，あるいはMüller細胞とRPEでp27の分解経路が異なるのか，今後も注意深く解析を進め，明らかにする必要があろう．

Ⅶ その他の病態とp27のかかわり

網膜は障害を受けると，グリア細胞(主としてMüller細胞)が増殖，浸潤し，障害された組織の修復に寄与する．これは病理学的にグリオーシス(gliosis)といわれる．Dyerらは，この網膜障害に伴うMüller細胞によるグリオーシスに，p27が重要な働きを示すことを明らかにした[51]．また，網膜の血管形成にp27が関与しており，p27の発現異常により，糖尿病網膜症にみられる血管周皮細胞の異常が誘導されるという興味深い報告もある[51]．特発性網膜上膜はグリア細胞やRPEなどの由来が示唆される細胞成分を有しており，増殖活性が観察されるが，p27の免疫活性は検出されなかった[52]．これらの報告は，代表的な眼底疾患の発症メカニズムにも，p27が潜在的な役割を果たすことを示唆している．

Ⅷ おわりに

本稿では，網膜における細胞周期制御蛋白質p27の機能，病態との関与について述べてきた．p27は網膜の領域では，主に発生における役割についての解析が行われてきたが，最近の研究では，網膜芽細胞腫や網膜上膜，糖尿病網膜症，網膜剝離といった主要な眼底疾患の病理にも関与していることが明らかにされつつある．これらのp27を介する経路の解析は，新しい分子治療標的となる可能性があり，将来のさらなる研究が期待される．

文 献

1) **Laurie NA, Donovan SL, Shih CS, Zhang J, Mills N, Fuller C,** et al：Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. Nature 444：61—66, 2006.
2) **Dyer MA, Bremner R**：The search for the retinoblastoma cell of origin. Nat Rev Cancer 5：91—101, 2005.
3) **Asaria RH, Charteris DG**：Proliferative vitreoretinopathy：developments in pathogenesis and treatment. Compr Ophthalmol Update 7：179—185, 2006.
4) **Pastor JC**：Proliferative vitreoretinopathy：an overview. Surv Ophthalmol 43：3—18, 1998.
5) **Charteris DG**：Proliferative vitreoretinopathy：pathobiology, surgical management, and adjunctive treatment. Br J Ophthalmol 79：953—960, 1995.
6) **Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM,** et al：p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. Genes Dev 8：9—22, 1994.
7) **Bravo R, Macdonald-Bravo H**：Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle：association with DNA replication sites. J Cell Biol 105：1549—1554. 1987.
8) **Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM**：Expression of proliferating cell nuclear antigen(PCNA)/cyclin during the cell cycle. Exp Cell Res 166：209—219, 1986.
9) **Yoshiki A, Hanazono M, Oda S, Wakasugi N, Sakakura T, Kusakabe M**：Developmental analysis of the eye lens obsolescence(Elo) gene in the mouse：cell proliferation and Elo gene expression in the aggregation chimera. Development 113：1293—1304, 1991.
10) **吉田和彦，原田高幸，原田知加子，加瀬 諭，池田裕美，酒井正春，**他：角膜上皮剝離後および発生過程の水晶体の細胞増殖における細胞周期調節蛋白の役割．日眼会誌 107：678—686, 2003.
11) **Kase S, Yoshida K, Ikeda H, Harada T, Harada C, Imaki J,** et al：Disappearance of p27(KIP1) and increase in proliferation of the lens cells after extraction of most of the fiber cells of the lens. Curr Eye Res 30：437—442, 2005.
12) **Kase S, Yoshida K, Ohgami K, Shiratori K, Ohno S, Nakayama KI**：Phosphorylation of p27(KIP1) in the mitotic cells of the corneal epithelium. Curr Eye Res 31：307—312, 2006.
13) **Yoshida K, Nakayama K, Kase S, Nagahama H, Harada T, Ikeda H,** et al：Involvement of p27(KIP1) in proliferation of the retinal pigment epithelium and ciliary body. Anat Embryol(Berl) 208：145—150, 2004.
14) **Yoshida K, Nakayama K, Nagahama H, Harada T, Harada C, Imaki J,** et al：Involvement of p27(KIP1) degradation by Skp2 in the regulation of proliferation in response to wounding of corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 43：364—370, 2002.
15) **Yoshida K, Kase S, Nakayama K, Nagahama H, Harada T, Ikeda H,** et al：Involvement of p27 KIP1 in the proliferation of the developing corneal endothelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 45：2163—2167, 2004.
16) **Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P,** et al：Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. Cell 78：59—66, 1994.
17) **Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V,** et al：Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p

27. Science 269：682—685, 1995.
18) **Tsvetkov LM, Yeh KH, Lee SJ, Sun H, Zhang H**：p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. Curr Biol 9：661—664, 1999.
19) **Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M**：SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. Nat Cell Biol 1：193—199, 1999.
20) **Sutterluty H, Chatelain E, Marti A, Wirbelauer C, Senften M, Muller U,** et al：p45 SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. Nat Cell Biol 1：207—214, 1999.
21) **Yang ES, Burnstein KL**：Vitamin D inhibits G1 to S progression in LNCaP prostate cancer cells through p27Kip1 stabilization and Cdk2 mislocalization to the cytoplasm. J Biol Chem 278：46862—46868, 2003.
22) **Ishida N, Kitagawa M, Hatakeyama S, Nakayama K**：Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27Kip1, increases its protein stability. J Biol Chem 275：25146—25154, 2000.
23) **Foster JS, Fernando IR, Ishida N, Nakayama KI, Wimalasena J**：Estrogens down-regulate p27 Kip1 in breast cancer cells through SKP2, and through nuclear export mediated by the extracellular signal-regulated kinase(Erk) pathway. J Biol Chem 17：41355—41366, 2003.
24) **Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N,** et al：Mice lacking p27 (Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. Cell 85：707—720, 1996.
25) **Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K,** et al：Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. EMBO J 19：2069—2081, 2000.
26) **Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Miyake S, Ishida N, Hatakeyama S,** et al：Skp 2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. Dev Cell 6：661—672, 2004.
27) **Kase S, Yoshida K, Ohgami K, Shiratori K, Suzuki Y, Nakayama KI,** et al：Expression of cdc2 and p27(KIP1) phosphorylation in mitotic cells of the human retinoblastoma. Int J Mol Med 17：465—468, 2006.
28) **Kase S, Osaki M, Honjo S, Takeda A, Adachi K, Araki K,** et al：A selective cyclooxygenase-2 inhibitor, NS398, inhibits cell growth and induces cell cycle arrest in the G2/M phase in human esophageal squamous cell carcinoma cells. J Exp Clin Cancer Res 23：301—307, 2004.
29) **Levine EM, Close J, Fero M, Ostrovsky A, Reh TA**：p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina. Dev Biol 219：299—314, 2000.
30) **Kase S, Yoshida K, Nakayama KI, Nakayama K, Ikeda H, Harada T,** et al：Phosphorylation of p27(KIP1) in the developing retina and retinoblastoma. Int J Mol Med 16：257—262, 2005.
31) **Young RW**：Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. Brain Res 353：229—239, 1985.
32) **Green ES, Stubbs JL, Levine EM**：Genetic rescue of cell number in a mouse model of microphthalmia：interactions between Chx10 and G1-phase cell cycle regulators. Development 130：539—552, 2003.
33) **Aerts I, Lumbroso-Le Rouic L, Gauthier-Villars M, Brisse H, Doz F, Desjardins L**：Retinoblastoma. Orphanet J Rare Dis 1：31, 2006.
34) **Takano J, Akiyama K, Imamura N, Sakuma M, Amemiya T**：Incidence of retinoblastoma in Nagasaki Prefecture, Japan. Ophthalmic Paediatr Genet 12：139—144, 1991.
35) **Hamel PA, Phillips RA, Muncaster M, Gallie BL**：Speculations on the roles of RB1 in tissue-specific differentiation, tumor initiation, and tumor progression. FASEB J 7：846—854, 1993.
36) **Chen D, Livne-bar I, Vanderluit JL, Slack RS, Agochiya M, Bremner R**：Cell-specific effects of RB or RB/p107 loss on retinal development implicate an intrinsically death-resistant cell-of-origin in retinoblastoma. Cancer Cell 5：539—551, 2004.
37) **Zhang P, Wong C, DePinho RA, Harper JW, Elledge SJ**：Cooperation between the Cdk inhibitors p27(KIP1) and p57(KIP2) in the control of tissue growth and development. Genes Dev 12：3162—3167, 1998.
38) **Ji P, Jiang H, Rekhtman K, Bloom J, Ichetovkin M, Pagano M,** et al：An Rb-Skp2-p27 pathway mediates acute cell cycle inhibition by Rb and is retained in a partial-penetrance Rb mutant. Mol Cell 16：47—58, 2004.
39) **Rodier G, Makris C, Coulombe P, Scime A, Nakayama K, Nakayama KI,** et al：p107 inhibits G1 to S phase progression by down-regulating expression of the F-box protein Skp 2. J Cell Biol 168：55—66, 2005.
40) **Kase S, Yoshida K, Ohgami K, Shiratori K, Harada T, Ohno S**：Expression of p27(KIP1) and cell proliferation in human retina and retinoblastoma. Anticancer Res 25：3843—3846, 2005.
41) **Prelich G, Kostura M, Marshak DR, Mathews MB, Stillman B**：The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro. Nature 326：471—475, 1987.
42) **Sato K, Tanaka T, Fujikura T, Saruya S**：Retinoblastoma--histopathological study of eight

cases with special reference to rosette formation. Acta Pathol Jpn 21：271—284, 1971.
43) **Yoshida K, Kase S, Nakayama K, Nagahama H, Harada T, Ikeda H,** et al：Distribution of p27 (KIP1), cyclin D1, and proliferating cell nuclear antigen after retinal detachment. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 242：437—441, 2004.
44) **Delmas C, Aragou N, Poussard S, Cottin P, Darbon JM, Manenti S**：MAP kinase-dependent degradation of p27Kip1 by calpains in choroidal melanoma cells. Requirement of p27Kip1 nuclear export. J Biol Chem 278：12443—12451, 2003.
45) **Wolf G RR, Zahner G, Stahl RA, Shankland SJ**：Erk 1,2 phosphorylates p 27(Kip 1)：Functional evidence for a role in high glucose-induced hypertrophy of mesangial cells. Diabetologia 46：1090—1099, 2003.
46) **Ramakrishnan M, Musa NL, Li J, Liu PT, Pestell RG, Hershenson MB**：Catalytic activation of extracellular signal-regulated kinases induces cyclin D1 expression in primary tracheal myocytes. Am J Respir Cell Mol Biol 18：736—740, 1998.
47) **Kase S, Yoshida K, Harada T, Harada C, Namekata K, Suzuki Y,** et al：Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and p27 (KIP1) after retinal detachment. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 244：352—358, 2006.
48) **Geller SF, Lewis LG, Fisher SK**：FGFR 1, signaling, and AP-1 expression after retinal detachment：reactive Müller and RPE cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 42：1363—1369, 2001.
49) **Hollborn M, Jahn K, Limb GA, Kohen L, Wiedemann P, Bringmann A**：Characterization of the basic fibroblast growth factor-evoked proliferation of the human Müller cell line, MIO-M1. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 242：414—422, 2004.
50) **Harada T, Harada C, Nakayama N, Okuyama S, Yoshida K, Kohsaka S,** et al：Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. Neuron 26：533— 541, 2000.
51) **Dyer MA, Cepko CL**：Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. Nat Neurosci 3：873—880, 2000.
52) **Kase S, Saito W, Yokoi M, Yoshida K, Furudate N, Muramatsu M,** et al：Expression of glutamine synthetase and cell proliferation in human idiopathic epiretinal membrane. Br J Ophthalmol 90：96—98, 2006.