

令和元年6月7日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20334

研究課題名(和文) NSAIDsによる角膜上皮傷害はロイコトリエンB4第二受容体経路の阻害に起因する

研究課題名(英文) Regulation of leukotriene B4 receptor2(BLT2) accelerates corneal wound by NSAIDs

研究代表者

岩本 怜 (Iwamoto, Satoshi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10568207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：日常生活でよく使われる非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)点眼で、角膜の創傷治癒が遅延するという報告がされているが、メカニズムはわかっていなかった。我々はロイコトリエンB4第二受容体(BLT2)とそのリガンドである12HHTがそのメカニズムに関与すると仮説を立て研究を行った。その結果、12HHT/BLT2経路が角膜における創傷治癒の促進に関与することが判明した。この研究は、新規の角膜治療薬として12HHT点眼の可能性を示唆する研究である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日常生活でよく使われる非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)点眼の副作用のメカニズムの一端を解明した。今後NSAIDs点眼の使用には注意を喚起すると共に、使用に注意を要する症例などがあるため、その情報を発信してゆく。また、新規の角膜治療薬の発見に結びつく研究であり、今後のさらなる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：We often use non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs). Past reports show NSAIDs eye drops delay corneal wound healing. But the mechanism was not clear. We focused on the leukotriene B4 receptor2 (BLT2) and 12HHT(BLT2 ligand). The result shows that 12HHT/BLT2 pathway accelerate corneal wound healing. This research make a new eye drops for corneal wound healing.

研究分野：角膜創傷治癒

キーワード：角膜創傷治癒 ロイコトリエンB4受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ロイコトリエン B₄ はアラキドン酸カスケードによって産生される炎症性脂質メディエーターである。本研究室では、ロイコトリエン B₄ に対する2つの受容体 (BLT1, BLT2) を世界に先駆けて分子同定し、生体内での役割について研究を行ってきた (Yokomizo T., *et al. Nature*, 1997, Yokomizo T., *et al. J Exp Med.*, 2000)。その中でもロイコトリエン B₄ 第二受容体 BLT2 は、当初、ロイコトリエン B₄ に対する低親和性受容体として同定されたが、実は、アラキドン酸の COX 代謝物で、トロンボキサン A₂ 産生時の副産物として考えられていた脂肪酸 12-HHT が BLT2 の内因性のリガンドであることを、当研究室の奥野らが明らかにした (Okuno T. *et al. J. Exp. Med.*, 2008, 右図 1)。さらに本研究室では、BLT2 が腸管上皮細胞に発現し、腸管のバリア機能を増強することや、皮膚ケラチノサイトに発現し、皮膚の創傷治癒を促進することも明らかにした (Iizuka Y. *et al. FASEB J.*, 2010, Liu M. *et al. J. Exp. Med.*, 2014, 上図 1)。しかしながら、他の臓器における 12-HHT/BLT2 経路の役割は、いまだに全く不明である。

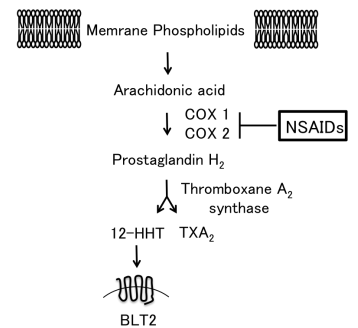
眼球は、腸管や皮膚と同様に、外界と直接接する臓器であり、眼におけるバリア機能の維持や創傷の治癒は、その恒常性を維持するために不可欠な機能である。一方で、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) を点眼薬として投与されている患者が角膜上皮障害を起こすことは、眼科臨床上市しばしば経験することであり、実際にそのような報告もなされている (Guidera AC. *et al. Ophthalmology.*, 2001)。しかしながら、その分子機序は長年不明であった。そこで申請者は、「12-HHT/BLT2 経路が眼球におけるバリア機能の維持や創傷治癒の促進に寄与しており、NSAIDs 点眼によって 12-HHT の産生が阻害されると、眼表面の恒常性が破綻し、様々な障害を引き起こす」との仮説を立て、検証を行うことにした。これまでに行った予備実験の結果、野生型マウスの眼球には、腸管や皮膚と同様に BLT2 mRNA の発現が認められた (図 2)。次に質量分析計を用いてマウス眼球の生理活性脂質の一斉定量を行なったところ、マウス眼球に、BLT2 を十分に活性化できる濃度の 12-HHT が存在することが判明した (図 3)。さらに、BLT2 遺伝子欠損マウスと野生型マウスを用いて角膜上皮創傷モデルを作成し、経時的に創傷領域を計測することで治癒過程を追跡したところ、BLT2 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比べて角膜創傷治癒が有意に遅延した (図 4)。

また、野生型マウスに NSAID であるジクロフェナクを 1 日 4 回、2 日間点眼後に角膜上皮を剥離し、創傷治癒過程を経時的に観察した。その結果、ヒトに用いる濃度と同じ 0.1 %ジクロフェナク点眼により、角膜上皮創傷治癒の遅延が認められた (図 5)。この際、眼球における 12-HHT の産生は 90%以上抑制されており、ジクロフェナクによる創傷治癒遅延が 12-HHT 産生の阻害により引き起こされた可能性が示唆された。

2. 研究の目的

NSAIDs 点眼によって引き起こされる角膜傷害と 12-HHT/BLT2 経路の関連を明らかにする

図 1



腸管上皮の恒常性維持 (Iizuka, *FASEB* 2010)
皮膚の創傷治癒促進 (Liu, *JEM* 2014)
角膜の創傷治癒促進?

図 2



図 3

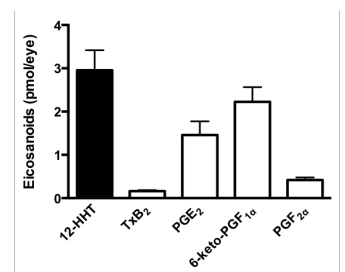


図 4

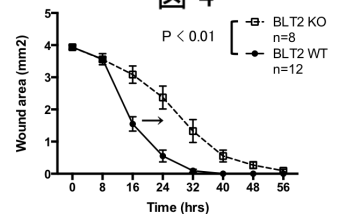
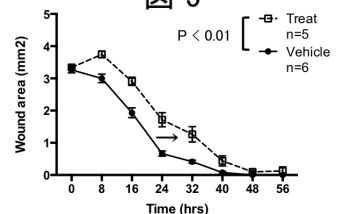


図 5



3. 研究の方法

(1) 野生型マウスと BLT2 受容体欠損マウスにおける、角膜の組織学的な違いを検討する

BLT2 受容体欠損マウスで角膜創傷治癒が遅延する原因として、BLT2 受容体を欠損させることで角膜上皮の層構造が破綻していたり、菲薄化しているかを HE 染色と電子顕微鏡を用いて野生型マウスと比較する。また、接着因子であるデスモソームの数に違いがあるかを検討する。

(2) 12-HHT/BLT2 経路が角膜上皮細胞の細胞移動を促進するか否か IncuCyte を用いたスクラッチアッセイで検討する

ヒト角膜上皮不死化細胞を 96 ウェルにプレーティングし、コンフルエント状態の細胞でスクラッチを行い、3 時間おきに細胞の移動を観察する。撮影したデータはエクセルデータとして回収し、定量化を行い、12-HHT あるいは合成 BLT2 作働薬の効果を検証する。また、12-HHT/BLT2 経路が増殖と移動のどちらに影響するのかを検討するため、細胞増殖阻害剤であるマイトマイシン C 処理後の角膜上皮細胞を用いてスクラッチアッセイを行う。

(3) NSAIDs 点眼により生じる角膜創傷治癒遅延が、12-HHT/BLT2 経路の阻害によるものか検討する

図 5 で示すように、NSAIDs 点眼は野生型マウス角膜の創傷治癒の遅延を引き起こす。そこで NSAIDs 点眼が BLT2 欠損マウスにおいても、野生型マウスと同様の角膜創傷治癒を遅延させるかどうかを観察する。期待される結果は、BLT2 欠損マウスにおいては、NSAIDs 点眼による角膜創傷治癒遅延効果が観察されないというものである。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスと BLT2 受容体欠損マウスにおける、角膜の組織学的な違いを検討する HE 染色で野生型と BLT2 受容体欠損マウスを比較すると、角膜の厚みや層構造に明らかな違いは認めなかった。また、電子顕微鏡を用いて角膜上皮層を観察したが、明らかな違いは認めなかった。さらに接着因子であるデスモソームの数もカウントしたが、両者で有意差は認めなかった。つまり、BLT2 受容体を欠損させることでマウスの角膜上皮創傷治癒の遅延が認められるが、形態学的な変化による結果ではないことを意味している。

(2) 12-HHT/BLT2 経路が角膜上皮細胞の細胞移動を促進するか否か IncuCyte を用いたスクラッチアッセイで検討する

ヒト角膜上皮不死化細胞に BLT2 受容体を過剰発現させ、スクラッチアッセイを行うと、BLT2 受容体を過剰発現させた細胞で創部閉鎖の促進が見られた。また、初代培養のヒト角膜上皮細胞を用いて、12HHT を添加した後に創部閉鎖を見ると、ヒトの角膜上皮細胞においても創部閉鎖の促進が確認できた。

(3) NSAIDs 点眼により生じる角膜創傷治癒遅延が、12-HHT/BLT2 経路の阻害によるものか検討する

BLT2 受容体欠損マウスに NSAIDs 点眼とコントロール点眼を創部作成 3 日前から使用し、その後の創傷治癒過程を検討した。NSAIDs 点眼群とコントロール点眼群では創傷治癒過程に差は認められなかった。つまり、BLT2 受容体欠損マウスにおいては NSAIDs 点眼による創傷治癒遅延効果がキャンセルされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Satoshi Iwamoto, Tomoaki Koga, Mai Ohba, Toshiaki Okuno, Masato Koike, Akira Murakami, Akira Matsuda, Takehiko Yokomizo. Non-steroidal anti-inflammatory drug delays corneal wound healing by reducing production of 12-hydroxyheptadecatrienoic acid, a ligand for leukotriene B₄ receptor 2. *Sci Rep*. doi: 10.1038/s41598-017-13122-8, 2017
査読あり

Jobu Sugita, Yosuke Asada, Waka Ishida, Satoshi Iwamoto, Katsuko Sudo, Hajime Suto, Toru Matsunaga, Ken Fukuda, Atsuki Fukushima, Norihiko Yokoi, Tatsukuni Ohno, Miyuki Azuma, Nobuyuki Ebihara, Hirohisa Saito, Masato Kubo, Susumu Nakae, Akira Matsuda. Contributions of Interleukin-33 and TSLP in a papain-soaked contact lens-induced mouse conjunctival inflammation model. *Immun Inflamm Dis*. doi: 10.1002/iid3.189, 2017
査読あり

〔学会発表〕(計6件)

Satoshi Iwamoto, Mikiko Okano, Takehiko Yokomizo, Akira Matsuda. Effect of resolvin on allergic conjunctivitis in mouse. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Baltimore, Maryland, May7-11, 2017

Satoshi Iwamoto, Tomoaki Koga, Toshiaki Okuno, Akira Murakami, Akira Matsuda, Takehiko Yokomizo. NSAIDs causes corneal epithelial damage by inhibition of leukotriene B₄ receptor 2 signaling. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Seattle, Washington, May1-5, 2016

岩本怜、古賀友紹、奥野利明、村上晶、横溝岳彦、松田彰、NSAIDsによる角膜創傷治癒遅延の分子メカニズムの解析 第120回日本眼科学会総会, 仙台, 日本 4月7-10日, 2016

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：横溝 岳彦

ローマ字氏名：(YOKOMIZO, takehiko)

研究協力者氏名：松田 彰

ローマ字氏名：(MATSUDA, akira)

研究協力者氏名：奥野 利明

ローマ字氏名：(OKUNO, toshiaki)

研究協力者氏名：古賀 友紹

ローマ字氏名：(KOGA, tomoaki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。