

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16991

研究課題名(和文) MMP9を標的とした翼状片発症機構の解明と予防薬の開発に関する研究

研究課題名(英文) Study of the pterygium onset mechanism that assumed MMP9 a target on elucidation and development of the prevention

研究代表者

柴田 奈央子 (SHIBATA, Naoko)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：20534647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：翼状片は結膜が角膜に侵入し視力低下をきたす疾患である。本研究では、ヒト翼状片組織からヒト初代培養翼状片細胞(HPF)を樹立することに成功した。また、HPFへの紫外線照射実験によりMMP9とケラチン24の発現を測定した結果、UVB照射強度が上昇するほどMMP9の発現がみられた。次に、MMP9抑制実験によりMMP9を抑制すると SMA, Prdx6も抑制されることがわかった。

HPFは翼状片線維芽細胞と似た特性があり、翼状片研究に役立つ可能性がある。また、UVB照射によってMMP9の発現が上昇した結果は、MMP9が紫外線に関連して翼状片の発症と伸展に関係している可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

翼状片は結膜が角膜に侵入する疾患で、乱視の増加や充血など美容上の問題を引き起こす。翼状片発症機序については、紫外線が関与しているのは疫学的にも明らかだがまだ不明の点も多い。以前の研究では翼状片関連遺伝子と考えられるケラチン24、マトリックスメタロプロテアーゼ9であることに注目した。本研究ではヒト翼状片組織からヒト初代培養翼状片細胞(HPF)を樹立し、より翼状片に近い形で実験に使用することができた。このことは動物モデルを有しない翼状片研究にとって意義のあることである。HPFに紫外線照射実験をしたところMMP9発現亢進がみられたため、MMP9を抑制する物質が翼状片進展を抑制する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Pterygium is a wing shaped growth on the ocular surface causing visual loss. In this study, human primary pterygium fibroblasts (HPF) were derived from human pterygium conjunctival tissue cultured. Expression levels of MMP9 and KRT24 in HPF were measured using real-time RT-PCR exposure to UV-B. In HPF, MMP 9 mRNA expression increased with UVB dose. After MMP9 siRNA (si-MMP9) was transfected into HPF, change in MMP9, alpha-smooth muscle action SMA, and Prdx6 expression levels were examined by real-time RT-PCR. In HPF transfected with si-MMP9, expression levels of SMA and Prdx6 were decreased with suppression of MMP9 gene expression.

Since HPF has properties akin to human pterygium fibroblasts, HPF may be useful in fundamental research of pterygium. Increased expression of MMP9 by UVB irradiation suggests MMP9 may be involved in the onset and progression of UV-related pterygium.

研究分野：眼形成 角結膜疾患

キーワード：翼状片 MMP9 KRT24

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

翼状片は、結膜が線維性血管組織を伴って角膜側にゆっくりと侵入していく疾患であり、美容上の問題や、角膜乱視を誘発し、大きくなり瞳孔縁にかかるとう高度の視力低下をきたす。翼状片発症機序には紫外線暴露が関与していることが、臨床的にも疫学的にも証明されている。<sup>1)</sup> 基礎研究に依りては、紫外線がそのトリガーとなりサイトカインや成長因子が翼状片で増加し、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)発現に関与していることが報告されている。<sup>2)</sup>

翼状片治療は現時点では手術しか方法はないが、再発もある疾患であるため、有効な治療薬や進行予防薬の開発が必要とされる。

我々は、以前の研究でヒト翼状片組織の DNA マイクロアレイ解析にてマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 9 とケラチン(KRT) 24 の発現が上昇しているとう結果を得ている。また、ヒト培養結膜線維芽細胞 (HConF) とヒト培養角膜上皮細胞 (HCEpC) において、紫外線照射により前者は MMP9 発現亢進、後者は KRT24 発現が亢進している結果を得ている。翼状片研究を進めていく上で、現状動物モデルを作成することは困難なため、このようなヒト翼状片組織や正常角結膜組織培養細胞を用いて行われているのが一般的である。

### 2. 研究の目的

翼状片の発症機構および進行予防薬の開発を検討するために以下の実験を計画した。

(1) ヒト初代翼状片培養線維芽細胞 (Human Primary Pterygium Fibroblast cells:HPF) を樹立する。

(2) ヒト初代翼状片培養線維芽細胞(HPF)に対する紫外線暴露による遺伝子発現変化(MMP9, KRT24)を検討する。

(3) MMP9 の発現抑制実験

HPF へ MMP9 siRNA (si-MMP9)をトランスフェクションし、MMP9 の発現を抑制させ、MMP9,KRT24, smooth muscle actin ( SMA), peroxiredoxin 6 (Prdx6) mRNA の発現変化をリアルタイム RT-PCR 法で解析する。

(4) ノビレチンとその化合物の MMP9 発現抑制作用の検討

### 3. 研究の方法

(1)ヒト HPF 樹立方法

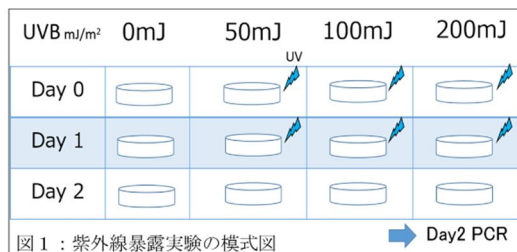
翼状片手術予定患者の同意を得て切除された検体を採取し、採取された翼状片組織を半割し Fibroblast Medium™ [以下 FM]を入れた容器に一旦保存する。同日、実験室に持ち帰り 35 cm<sup>2</sup>シャーレに眼球接着面が下になるように置き、FM500 μl を入れ 24 時間 CO2 インキュベーター37 に静置する。24 時間後 F M1.5ml 追加しさらに培養を 2 日継続。2 日おきに F Mを交換した。また、角膜上皮細胞培養に使用される Oculife™(LIFE LINE)を medium として用いて同様の方法で培養を施行した。

(2)HPF への紫外線暴露実験の方法

HPF を 35 cm<sup>2</sup>シャーレに播種する。

312nm の紫外線 UV-B 波を 2 日間照射する。(0mJ, 50mJ, 100mJ, 200mJ/cm<sup>2</sup>)(Day0, Day1)

3 日目(Day2)に MMP9, KRT24 をリアルタイム PCR 法で測定した(図 1)



(3) MMP9 発現抑制実験の方法

MMP9 をノックダウンした細胞作製のため、HPF へ MMP9 発現を抑制する siRNA(si-MMP9)をトランスフェクションした。上記と同様の方法で紫外線照射(100mJ)を行い、MMP9, SMA や Prdx6 の発現変化をリアルタイム PCR 法で解析した。

(4) MMP9 抑制物質(ノビレチン)の検討方法

スクリーニングしたフラボン化合物として 4 デメチルノビレチンを使用し、ヒト翼状片線維芽細胞に添加し、紫外線照射(100mJ)を行い照射前後での MMP9 阻害作用をリアルタイム RT-PCR 法にて測定した。同様の方法で化合物ではないノビレチンを添加した場合においても検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト初代翼状片培養線維芽細胞 (HPF) の樹立

Fibroblast Medium を用いて培養した結果、切除したヒト翼状片から線維芽細胞を培養し継代することに成功した。また、OculifeTM (LIFE LINE) を medium として用いた方法では培養不可であった。(図 2,3)

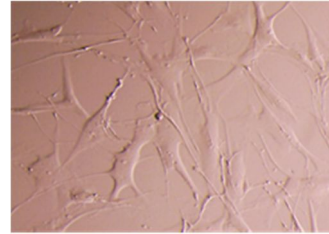
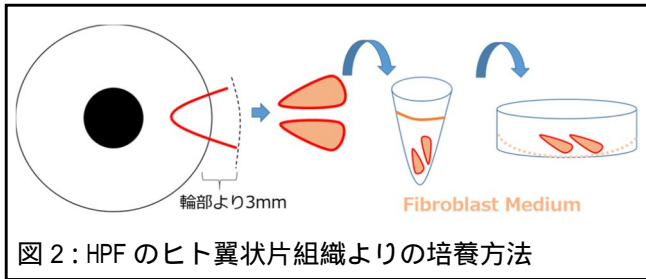


図 3: 樹立した HPF の位相差顕微鏡像

HPF の細胞形態は紡錘形の線維芽細胞であり、我々が以前の研究で使用していたヒト初代培養結膜線維芽細胞 (HConF) と類似していた。このため、翼状片研究を行っていくうえで、HPF の方が HConF を用いるよりも、翼状片の病態により近い結果が得られることが期待された。

##### (2) HPF への紫外線照射実験結果

HPF に強度の異なる紫外線を照射し、翼状片への関連が示唆される遺伝子、MMP9 と KRT24 についてリアルタイム PCR で発現確認を行った。

その結果、HPF では紫外線強度を強くするほど MMP9 発現亢進がみられた ( $P < 0.05$ ) (図 4) HConF における同様の実験でも同様に紫外線強度を強くするほど MMP9 発現亢進がみられることを我々は以前報告している。(図 5)

紫外線の影響をより多く受けているであろうグレードの高い翼状片で、MMPs 発現量が正比例する報告<sup>3)</sup>もあり本研究の結果に矛盾しない。

翼状片組織では、角膜創傷治癒過程でみられる炎症や細胞外基質リモデリング、過形成、細胞遊走がみられており、創傷治癒や炎症、癌の進行でみられる MMPs はこの過程に関与していると考えられる。KRT24 の発現に関しては HPF、HConF 両者とも発現がみられなかった。この遺伝子はヒト初代培養角膜上皮細胞では紫外線照射によって発現が亢進する結果を以前報告している。

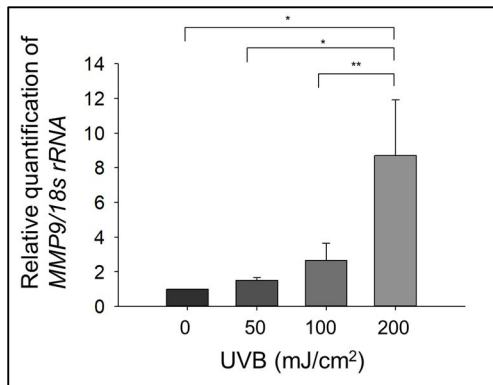


図 4 HPF への紫外線照射実験結果 (MMP9)

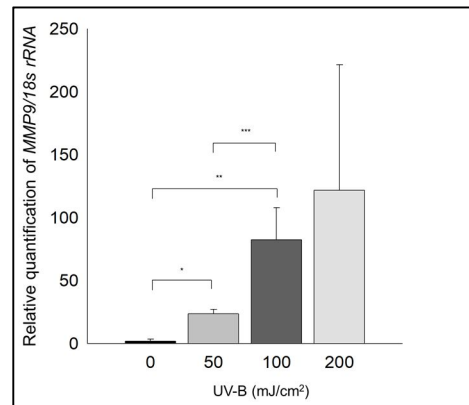


図 5 HConF への紫外線照射実験結果 (MMP9)

##### (3) MMP9 発現抑制実験結果

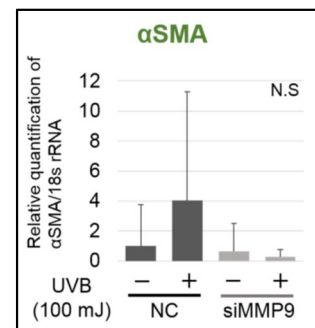
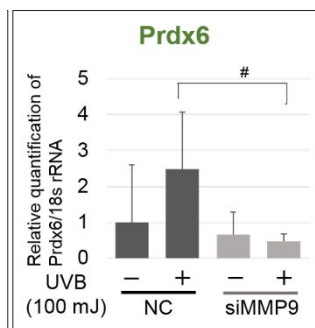
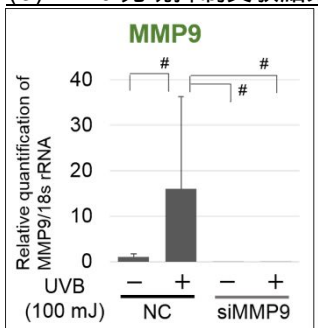


図 6: HPF の MMP9 抑制における MMP9, Prdx6, SMA mRNA 発現の変化

コントロールではUV照射後にMMP9発現が亢進する。si-MMP9をトランスフェクションさせたHPFにUV照射をしても発現亢進はみられない。( # P<0.05)

コントロールではUV照射後にPrdx6発現上昇がみられた。si-MMP9をトランスフェクションさせたHPFにUV照射をしてもPrdx6の発現亢進はみられなかった。( # P<0.05)

コントロールではUV照射後にSMA発現上昇がみられた。si-MMP9をトランスフェクションさせたHPFにUV照射をしても発現上昇はみられなかった。

この結果より、HPFにおいてMMP9を抑制することにより、上皮間葉系移行に關与するSMAやPrdx6遺伝子の発現も抑制される傾向にあり、MMP9抑制により翼状片発症伸展を予防できる可能性が示唆された。

#### (4) MMP9抑制物質(ノビレチン)の検討結果

我々はMMP9抑制物質のノビレチンに注目し、その抑制効果についてHPFを用いて検討した。ノビレチンは柑橘類の果皮等に多く含まれる有機化合物フラボンを骨格に持つポリメトキシフラボノイド(0-メチル化フラボノイド)の一種であり、ノビレチンの後発白内障抑制効果などの報告もされている物質である。<sup>4)</sup>

結果、紫外線照射によりコントロール群はMMP9の発現が増加したが、4デメチルノビレチンを添加した群は、照射前よりも照射後にMMP9発現抑制効果がみられた。ノビレチンを添加した群にはMMP9発現抑制効果はみられなかった。このことにより、ノビレチン化合物のMMP9抑制効果の可能性が示唆された。

#### <引用文献>

- 1) Coroneo MT.Br J. Ophthalmol 1993;77:734-39
- 2) N.Dushku et al. Arch Ophthalmol. 2001;199(5)
- 3)S.F.Yang IOVS October2009,Vol.50,No10
- 4)Miyata Y, et al. Bioorg Med Chem Lett. 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 柴田 奈央子
2. 発表標題 Comparison of gene expression profiles in human pterygium and UV-induced gene expressions in human conjunctival epithelium.
3. 学会等名 ARVO Annual meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柴田 奈央子
2. 発表標題 ヒト翼状片培養細胞におけるマトリックスメタプロテアーゼ9発現と紫外線照射の影響
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田 奈央子
2. 発表標題 Effect of UVB exposure on expression of MMP9 in human pterygium fibroblasts.
3. 学会等名 ARVO Annual meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	久保 江理  (KUBO Eri)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	宮田 佳樹  (MIYATA Yoshiki)		