

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09462

研究課題名(和文) PACAPによる角膜上皮創傷治癒効果とその作用機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of corneal epithelial wound healing effect and wound healing mechanism by PACAP

研究代表者

柴藤 淳子 (SHIBATO, JUNKO)

星薬科大学・先端生命科学研究所・寄附講座等客員助教

研究者番号：10611121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： PACAPの角膜上皮創傷治癒作用の解明を目的に、治癒関与因子の同定を目指した。マイクロアレイ解析の結果、PACAP群はERK系遺伝子、PACAP + scratch群ではJNK系遺伝子の変動が多かった。PACAPの主な創傷治癒作用は細胞増殖であったことから、MAP系遺伝子群を調査したところ創傷治癒に重要なNr4a1を選定した。損傷で核内NR4A1のリン酸化が促進したが、PACAPは核内NR4A1のリン酸化を抑制した。NR4A1核内リン酸化は転写活性を失い、核外移行による細胞死促進の報告がある。よってPACAPはNR4A1の核局在化転写活性を維持し、細胞生存・増殖を促進することが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でPACAPによる角膜上皮創傷治癒作用にNR4A1が関与し、さらにPACAPのNR4A1の脱リン酸化作用が角膜上皮細胞の増殖や細胞死を制御している可能性が明らかになった。今後さらなるPACAPとNR4A1の相互作用が明らかになれば、視力喪失のリスクを低減させる有効な角膜治療法の開発に役立つと考える。NR4A1は細胞増殖だけでなく線維症、抗血栓作用、血管新生、腫瘍形成制御など様々な細胞活動を制御に関わる分子である。よって本研究の成果は様々な疾患治療につながる可能性があると思われる。

研究成果の概要(英文)： To elucidate the effect of neuropeptide PACAP on corneal epithelial wound healing, the factors involved in wound healing were investigated in this study. Results of DNA microarray and pathway analyses of corneal epithelial cells showed greater variability of the ERK genes in the PACAP group and JNK genes in the PACAP + scratch group. Since the main effect of PACAP on wound healing was cell proliferation, we selected Nr4a1, which is important for wound healing. It has been reported that nuclear phosphorylation of NR4A1 leads to loss of transcriptional activity and promotes cell death by nuclear export. Therefore, PACAP may contribute to cell survival and wound healing by maintaining the nuclear-localized transcriptional activity of NR4A1.

研究分野：オミックス解析

キーワード：PACAP 角膜上皮細胞 創傷治癒 マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

角膜障害の原因にはドライアイ、コンタクトレンズ、異物や紫外線などによる外傷性、感染や免疫反応、薬剤性などがある。これらは角膜上皮障害の原因であり同時に角膜上皮創傷治癒を阻害あるいは遅延させるものでもある。特に最近ではカラーコンタクトレンズ装用者の急増や VDT 作業の長時間化などに伴う眼障害が若年層において増加する傾向にある。角膜に傷ができると、通常傷自体は修復されるが、損傷修復の遅延が生じると角膜実質に不可逆性の瘢痕を形成し角膜に混濁を残すことがある。よって症状は軽くても眼球の内部に異常や機能障害により視力が低下する疾患の発症に繋がることから予防や早期治療が大切である。

角膜上皮障害の治療には、角膜上皮保護薬、ステロイド剤、抗菌薬、自己血清、人工涙液などの点眼があるが、副作用や短期間に創傷を完全に治癒することができない問題なども多く、薬品治療で効果が得られず創傷を完治できない場合もある。最近では白内障の術後に眼表面の損傷が生じるドライアイの症状が多発したり悪化したりすることが分かってきている。よって既存の薬剤とは異なる新しい作用機序を有する効果的な治療薬の創出が切望されている。我々はこれまでに PACAP の神経保護作用や神経分化誘導作用を明らかにしてきた(1,2)。その研究の過程で PACAP-KO マウスの涙液分泌量が減少し角膜が肥厚するドライアイ様症状を見出し、PACAP による涙液分泌および唾液分泌亢進作用を確認した。さらに角膜上皮細胞に PACAP 受容体の発現が確認できたことから、傷害後のマウス角膜上皮組織に PACAP を点眼させたところ、創傷治癒が促進された(3)。よって PACAP は涙液分泌促進効果だけでなく、角膜治癒効果も有することが示唆されたが、PACAP による創傷治癒促進作用については不明な点が多いため、有効性や分子レベルでの作用メカニズムに関する科学的知見はまだ十分とは言えない。

## 2. 研究の目的

神経ペプチド PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide: 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド)の角膜上皮創傷治癒促進作用メカニズムの解明を目的に、正常ヒト角膜上皮細胞を用いた創傷治癒モデルに PACAP を滴下し、治癒創生過程での網羅的遺伝子発現解析を行う。本研究では PACAP の創傷治癒促進作用への関与を分子レベルで明らかにすることで創薬に向けた基盤データを蓄積し、涙液分泌促進効果だけでなく、角膜創傷治癒効果も有する PACAP を用いた新規治療薬や再生医療の開発への貢献を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 正常ヒト角膜上皮創傷治癒 In vitro モデル:スクラッチアッセイ

正常ヒト角膜上皮細胞 HCEC2 (KC-4009; KURABO) を  $8 \times 10^3$  cells/well (96-well plate) となるように播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件でコンフルエントになるまで約 10 時間培養した後、ピペットチップでスクラッチ創傷パターンを作製した。PACAP を添加してから創傷パターンへ向かって周りから細胞が遊走する過程を経時的に蛍光位相差顕微鏡 BZ-X710 (キーエンス社)で観測し、創傷パターンの面積を画像解析ソフト imageJ で定量化することで細胞遊走能を評価した。

### (2) 細胞増殖能および細胞遊走能の測定

#### EdU 陽性細胞の測定

HCEC2 細胞を EdU Imaging Kit (C10639; Thermo Fisher Scientific)を用いて染色し、蛍光位相差顕微鏡 BZ-X710 で EdU ポジティブ細胞をカウントし、総細胞数を 100 として、EdU 陽性率 (%)を求めた。測定はそれぞれ 6 回繰り返し、平均値を算出した。

#### MTT assay

HCEC2 細胞を細胞増殖キット I (Roche)の MTT 標識試薬で標識し、可溶化溶液を添加しインキュベート後、iMark マイクロプレートリーダー (BIO-RAD)を用いてリファレンス波長 650 nm として 570 nm の吸光度を測定した。評価試料を添加しない場合の生細胞数を 100 として、評価試料を添加した場合の細胞生存率 (%)を求めた。測定はそれぞれ 6 回繰り返し、平均値を算出した。

### (3) DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現解析

HCEC2 細胞から RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いてトータル RNA を抽出した。Dye-Swap 法 (Hori et al. Genomics Data, 2015) に従いアジレント社 マイクロアレイ 4x44K を用い遺伝子発現解析を行った。

### (4) マイクロアレイデータの統合的解析

DNA マイクロアレイにより得られた結果から、PACAP により遺伝子発現量に変化があった遺伝子をリスト化し、DAVID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases)を使用してオンロジーおよびパスウェイ解析を行った。PACAP によって変動した遺伝子の生物学的機能やシグナル経路を同定し、PACAP による創傷治癒における重要な因子を試みた。

### ( 5 ) NR4A1 局在性およびリン酸化解析

10cm ディッシュで培養した HCEC2 細胞を Nuclear Protein Extraction – Isolation (Fractionation-Translocation) Kit (NPI-1; Fivephoton Biochemicals) で処理することで Cytoplasmic と Nuclear 画分に分画し、各分画液は ProteoExtract Protein Precipitation Kit (539180; Calbiochem) で精製濃縮した。濃縮サンプルは SDS-PAGE ( e-PAGEL HR 5~20% ) で電気泳動し、Trans blot Turbo(BIO-RAD) でメンブレン転写後に TBS-T 溶液(5% スキムミルク)ブロッキングした。NR4A1(1:5000, ab109180; Abcam)、p-Ser351-NR4A1(1:5000, 12376; Signalway Antibody) を 1 次抗体とした。Cytoplasmic 分画は GAPDH (1:10000, 016-25523; FujiFilm Wako)、Nuclear 画分は ASH2L (1:10000, ab176334; Abcam) をハウスキーピングとした。HRP 標識 2 次抗体 (GE Healthcare) 反応後、Clarity Western ECL Substrate (BIO-RAD) で反応させ、ChemiDoc XRS Plus (BIO-RAD) でバンド検出および定量分析を行った。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) PACAP による角膜上皮細胞修復作用効果

スクラッチアッセイの結果、PACAP 投与により創傷面積の減少が確認できたことから PACAP による創傷治癒効果が示唆された。この創傷治癒効果は細胞の増殖性及び走化性によるものと推定されたが、増殖阻害剤 AraC を添加した条件では創傷面積の減少が抑制された ( 図 1 )。

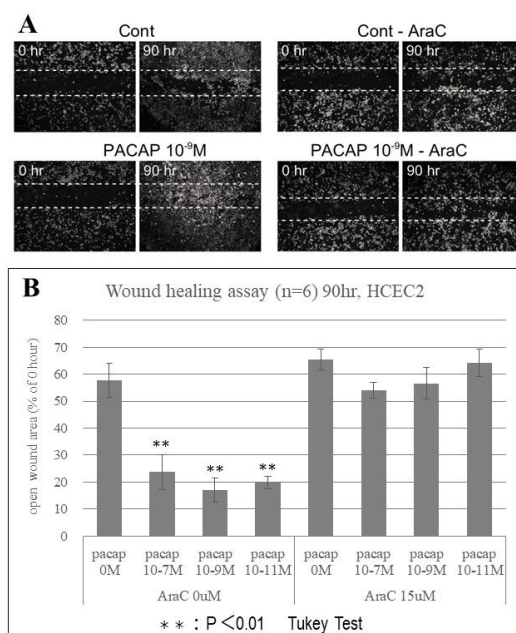


図1. スクラッチアッセイによるPACAPの角膜上皮細胞創傷治癒作用の評価  
A: PACAP添加90時間後の創傷部位面積の変化、B:創傷部位面積のグラフ化

PACAP による増殖細胞数の測定を EdU 標識で行った結果、PACAP は細胞増殖を有意に促進させた。増殖阻害剤 AraC を添加した条件では EdU ポジティブが殆ど無くなったことから ( 図 2 )、以上のことから PACAP による創傷治癒効果は主に細胞増殖によることが考えられた。

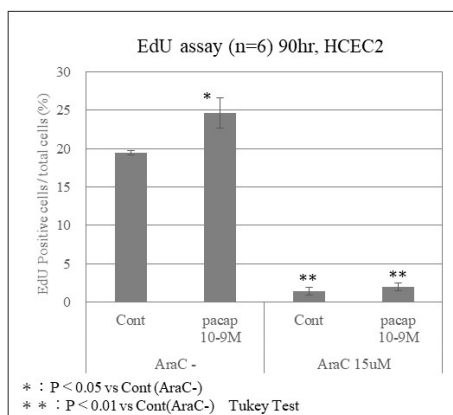


図2. EdU アッセイによる角膜上皮細胞増殖細胞の測定

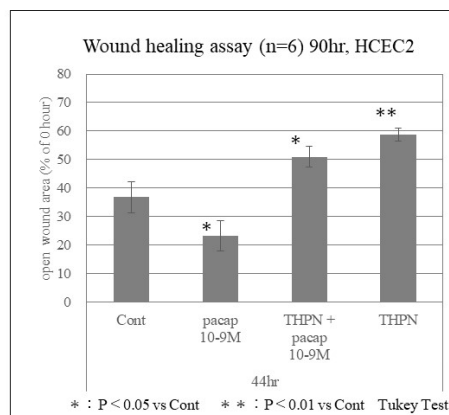


図3. NR4A1阻害剤THPNの角膜上皮細胞創傷治癒作用への影響評価

( 2 ) PACAP による角膜上皮修復に關する遺伝子の解析

角膜上皮細胞のスクラッチアッセイで PACAP による創傷治癒作用に關する遺伝子を検討するために DNA マイクロアレイを行った。PACAP 添加から 3、6、18、20 時間での変動した遺伝子数は PACAP 群では遺伝子 2518 種 ( 増加 853、減少 1665 )、PACAP + scratch 群では遺伝子 2402 種 ( 増加 464、減少 1937 ) であった。さらに PACAP による創傷治癒効果のメカニズムを明らかにするため生物学的機能やパスウェイ解析を行ったところ、細胞増殖に關する ERK/MAPK パスウェイにカテゴライズされた NR4A1 ( Nur77 ) 遺伝子に注目した。神経成長因子 IB ( NGFIB ) としても知られる NR4A1 は炎症やアポトーシスなどに關することが示されているが、最近の研究で角膜創傷治癒にも關係すると発表されている(4)。

( 3 ) NR4A1 の創傷治癒作用の検討

NR4A1 の角膜上皮創傷治癒作用を確認するために PACAP 受容体である PAC1r、VPAC1r、VPAC2r のアンタゴニストを使用した場合の発現変化を調べた。その結果 VIP6-28 ( VPAC1R と VPAC2R アンタゴニスト ) では発現に変化はなかったが、PA8 ( PAC1r アンタゴニスト ) が添加されると NR4A1 のタンパク発現が抑制された。よって NR4A1 が PAC1r を介して作用を受けていることが示唆された。この結果を受け、アンタゴニストである THPN を添加した条件でスクラッチアッセイを行ったところ、THPN による創傷面積減少の抑制が確認された ( 図 3 )。さらに THPN を添加した EdU アッセイでは ( 図 4-A ) EdU ポジティブが殆ど無くなり、またこの結果が細胞死でないことが MTT アッセイ ( 図 4-B ) から確認できた。よって NR4A1 の主な創傷治癒効果は細胞増殖によるものであることが明らかになった。

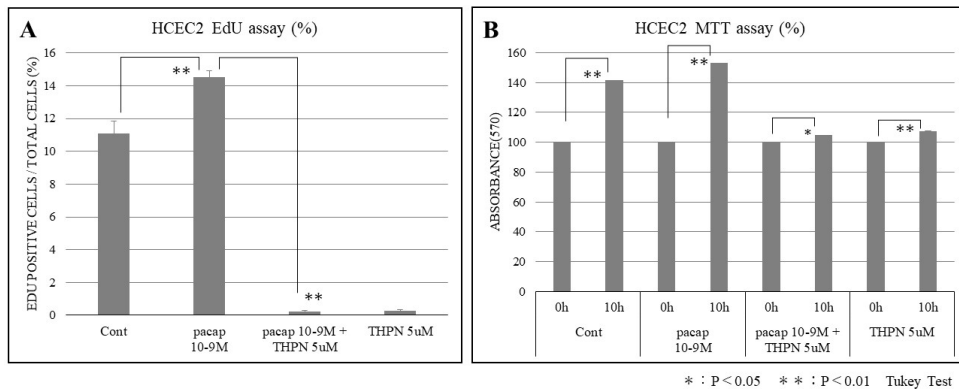


図4. NR4A1阻害剤THPNの角膜上皮細胞増加への影響 A; EdUアッセイ、B; MTTアッセイ

( 4 ) NR4A1 局在性およびリン酸化解析

NR4A1 は細胞局在性とリン酸化の状態が活性化に關している報告が多い。今回の角膜上皮細胞を使用した分画では、NR4A1 の殆どが Nuclear 画分に存在し、スクラッチ損傷によりリン酸化 NR4A1 が増加するが、PACAP がそのリン酸化を抑制する可能性が示唆された ( 図 5 )。リン酸化は NR4A1 の核外輸送を誘導し、細胞増殖を阻害する研究がいくつか報告されている (5,6,7,8,9,10,11)。これらの結果は、PACAP は NR4A1 の核局在化転写活性を維持することで、細胞生存や創傷治癒に貢献すると考えられた。

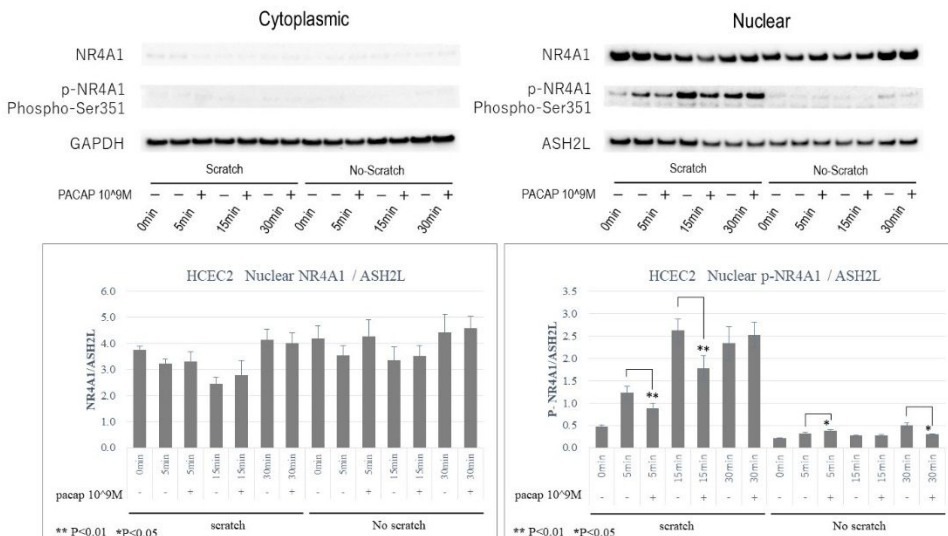


図5. NR4A1の角膜上皮細胞における局在性とPACAPによるリン酸化の変化

## 参考文献

1. Shioda et al. Prevention of delayed neuronal cell death by PACAP and its molecular mechanism. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2004 Apr;123(4):243-52.7.
2. Ohtaki et al. Role of PACAP in ischemic neural death. *J Mol Neurosci*. 2008 Nov;36(1-3):16-25.
3. Nakamachi et al. PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. *Nat Commun*. 2016 Jun 27;7:12034.
4. Katrin Palumbo-Zerr et al. Orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transforming growth factor- $\beta$  signaling and fibrosis. *Nature Medicine* volume21, 150–158 (2015)
5. Evan Delgado et.al. High Expression of Orphan Nuclear Receptor NR4A1 in a Subset of Ovarian Tumors with Worse Outcome. *Gynecol Oncol*. 2016 May; 141(2): 348–356.
6. Safe SKK, Li X, Lee S. NR4A orphan receptors and cancer. *Nucl Recept Signal*. 2011:9.
7. Kolluri SK, Bruey-Sedano N, Cao X, Lin B, Lin F, Han YH, et al. Mitogenic effect of orphan receptor TR3 and its regulation by MEKK1 in lung cancer cells. *Molecular and cellular biology*. 2003;23:8651–67.
8. Li H, Kolluri SK, Gu J, Dawson MI, Cao X, Hobbs PD, et al. Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science*. 2000;289:1159–64.
9. Yang H, Nie Y, Li Y, Wan YJ. ERK1/2 deactivation enhances cytoplasmic Nur77 expression level and improves the apoptotic effect of fenretinide in human liver cancer cells. *Biochemical pharmacology*. 2011;81:910–6.
10. Lee SO, Li X, Khan S, Safe S. Targeting NR4A1 (TR3) in cancer cells and tumors. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2011;15:195–206.
11. Zhan Y, Du X, Chen H, Liu J, Zhao B, Huang D, et al. Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nature chemical biology*. 2008;4:548–56.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomoya Nakamachi
2. 発表標題 Relation between ADNP and PACAPon tissue distribution, protective effect and trophic effect in neural tissue.
3. 学会等名 ADNP Family Conference and Scientific Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoya Nakamachi
2. 発表標題 Effect of PACAP on corneal epithelial repair
3. 学会等名 The Akira Arimura Memorial VIP/PACAP and Related Peptides Symposium: 30 years after PACAP Discovery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川満理奈、柴藤淳子、平林敬浩、石野菜由子、山下道生、竹ノ谷文子、塩田清二
2. 発表標題 神経ペプチドPACAPによる角膜上皮の新生・再生作用
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川満理奈、柴藤 淳子、中町 智哉、平林敬浩、竹ノ谷 文子、塩田 清二
2. 発表標題 神経ペプチドPACAPによる角膜上皮の新生・再生作用
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2020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
研究分担者	中町 智哉 (NAKAMACHI TOMOYA) (30433840)	富山大学・学術研究部理学系・講師  (13201)	
研究分担者	RAK WAL RANDEEP (RAKWAL RANDEEP) (70590850)	筑波大学・体育系・教授  (12102)	
研究分担者	塩田 清二 (SHIODA SEIJI) (80102375)	星薬科大学・先端生命科学研究所・教授  (32676)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------